

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047305**

(13) **B1**

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

- | | | |
|---------------------------------------|---------------|-----------------------------|
| (45) Дата публикации и выдачи патента | (51) Int. Cl. | <i>C12N 9/02</i> (2006.01) |
| 2024.06.28 | | <i>C12P 7/00</i> (2006.01) |
| (21) Номер заявки | | <i>C12N 15/53</i> (2006.01) |
| 202290995 | | <i>C12P 13/00</i> (2006.01) |
| (22) Дата подачи заявки | | <i>C12Q 1/26</i> (2006.01) |
| 2020.09.24 | | <i>C07K 14/00</i> (2006.01) |
| | | <i>C12P 21/00</i> (2006.01) |

(54) **КЕТОРЕДУКТАЗНЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ И ПОЛИНУКЛЕОТИДЫ**

- | | |
|---|-----------------------|
| (31) 62/906,268 | (56) WO-A2-2010025238 |
| (32) 2019.09.26 | US-B2-8426178 |
| (33) US | US-A1-20130177962 |
| (43) 2022.07.12 | US-A1-20200095619 |
| (86) PCT/US2020/052396 | |
| (87) WO 2021/061915 2021.04.01 | |
| (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КОДЕКСИС, ИНК. (US) | |
| (72) Изобретатель:
Лян Джек, Субраманиан Нандхитха,
Чин Шарлин, Хоумен Дэвид Уилльям,
Уэйлен Кэти, Джоунз Мэттью Блэйк
(US) | |
| (74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU) | |

-
- (57) Настоящее изобретение относится к сконструированным кеторедуктазным ферментам, обладающим улучшенными свойствами по сравнению с природным кеторедуктазным ферментом дикого типа, а также к полинуклеотидам, кодирующим сконструированные кеторедуктазные ферменты; к клеткам-хозяевам, способным экспрессировать сконструированные кеторедуктазные ферменты; и к способам применения сконструированных кеторедуктазных ферментов для синтеза хирального спирта. Настоящее изобретение также относится к способам применения сконструированных ферментов.

B1

047305

047305
B1

В настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США рег. № 62/906268, поданной 26 сентября 2019 г., которая в полном объеме и во всех целях включена в настоящее описание посредством ссылки.

Ссылка на список последовательностей, таблицу или компьютерную программу

Настоящее изобретение также содержит Список последовательностей, представленный в соответствии со статьей 37 Кодекса законов США §1.821 в электронной форме (CRF) на сайте EFS-Web под именем файла CX8-195WO2_ST25.txt, и включенный в настоящее изобретение посредством ссылки. Электронная копия Списка последовательностей была создана 23 сентября 2020 г. в виде файла размером 664 килобайта.

Область, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к сконструированным кеторедуктазным ферментам, обладающим улучшенными свойствами по сравнению с природным кеторедуктазным ферментом дикого типа, а также к полинуклеотидам, кодирующим сконструированные кеторедуктазные ферменты, к клеткам-хозяевам, способным экспрессировать сконструированные кеторедуктазные ферменты, и к способам применения сконструированных кеторедуктазных ферментов.

Уровень техники

Ферменты, принадлежащие к классу кеторедуктаз (KRED) или карбонилредуктаз (EC1.1.1.184), могут быть использованы для синтеза оптически активных спиртов из соответствующего прохирального кетонового субстрата путем стереоселективного восстановления соответствующих рацемических альдегидных субстратов. KRED обычно превращают кетоновые и альдегидные субстраты в соответствующий спиртовой продукт, но могут также катализировать обратную реакцию, окисление спиртового субстрата до соответствующего кетонового/альдегидного продукта. Для восстановления кетонов и альдегидов и окисления спиртов ферментами, такими как KRED, требуется кофактор, чаще всего восстановленный никотинамид-аденин-динуклеотид (NADH) или восстановленный никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат (NADPH) и никотинамид-аденин-динуклеотид (NAD⁺) или никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат (NADP⁺) для реакции окисления. NADH и NADPH служат донорами электронов, а NAD⁺ и NADP⁺ служат акцепторами электронов. В большинстве случаев было замечено, что кеторедуктазы и алкогольдегидрогеназы акцептируют либо фосфорилированный, либо нефосфорилированный кофактор (в его окисленной и восстановленной форме), но чаще всего не оба.

Во избежание проведения многих реакций химического синтеза для получения ключевых соединений, кеторедуктазы все чаще используются для ферментативного превращения различных кето- и альдегидных субстратов в хиральные спиртовые продукты. В этих целях могут быть использованы целые клетки, экспрессирующие кеторедуктазу, для биокаталитического восстановления кетонов и альдегидов или для биокаталитического окисления спирта, или очищенные ферменты в тех случаях, когда присутствие нескольких кеторедуктаз в целых клетках негативно влияет на стереочистоту и выход желаемого продукта.

"Горечь" является ключевым вкусовым атрибутом пива, который обычно возникает из-за добавления хмеля (цветков растения *Humulus lupulus* L.). Изо- α -кислоты образуются в процессе пивоварения благодаря изомеризации гумулонов, которые представляют собой природные соединения в лупулиновых железах растения хмеля. В частности, за горький вкус ответственны шесть основных изо- α -кислот: цис-изогумулон, транс-изогумулон, цис-изокогумулон, транс-изокогумулон, цис-изоадгумулон и транс-изоадгумулон.

Однако, изо- α -кислоты не обладают светостойкостью, а индуцированное светом образование 3-метил-2-бутен-1-тиола (3-МБТ) придает пиву ярко выраженный легкий или горьковатый вкус и аромат. Это приводит к необходимости упаковки пива в коричневые бутылки или банки. Другое решение состоит в том, чтобы создать полностью светостойкое пиво путем восстановления карбонильной группы изо- α -кислоты с получением соответствующей дигидро-(γ h)-изо- α -кислоты. Эти восстановленные дигидро-(γ h)-изо- α -кислоты являются стабильными и могут быть разлиты в прозрачные или зеленые бутылки.

Однако, в настоящее время изо- α -кислоты можно превратить в дигидро-(γ h)-изо- α -кислоты только с использованием токсичных, опасных и непивоварных химических соединений (например, боргидрида натрия). Следовательно, безопасное и пригодное для пищевых продуктов превращение изо- α -кислот в дигидро-(γ h)-изо- α -кислоты могло бы иметь значительную коммерческую ценность.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к сконструированным кеторедуктазным ферментам, обладающим улучшенными свойствами по сравнению с природным кеторедуктазным ферментом дикого типа, а также к полинуклеотидам, кодирующим сконструированные кеторедуктазные ферменты, к клеткам-хозяевам, способным экспрессировать сконструированные кеторедуктазные ферменты, и к способам применения сконструированных кеторедуктазных ферментов.

Настоящее изобретение относится к сконструированным кеторедуктазным ферментам ("KRED") с улучшенной ферментативной активностью в отношении превращения изо- α -кислот в соответствующие

дигидро-(rho)-изо- α -кислоты по сравнению с встречающимися в природе кеторедуктазами дикого типа, происходящими от *Lactobacillus kefir* (SEQ ID NO: 2) или по сравнению с другими сконструированными кеторедуктазными ферментами, включая полипептиды сконструированной кеторедуктазы SEQ ID NO: 4, 6, 80, 104, 172, 186, 194, 252, 270, 272, 286, 328 и/или 330.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные ферменты обладают одним или несколькими улучшенными свойствами в дополнение к повышенной ферментативной активности. Улучшенными свойствами ферментов являются, но не ограничиваются ими, повышенная активность в диапазоне субстратов, повышенная активность при высокой концентрации субстрата и повышенная активность при низкой концентрации кофактора.

Настоящее изобретение относится к сконструированным вариантам кеторедуктазы, имеющим последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательностям SEQ ID NO: 4, 6, 80, 104, 172, 186, 194, 252, 270, 272, 286, 328 и/или 330.

Настоящее изобретение также относится к сконструированным вариантам кеторедуктазы, имеющим последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 4, и по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из положений 12, 21, 87, 93, 97, 110, 145, 148, 152, 153, 194, 196, 197, 200, 206, 212 и 226, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 4. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат по меньшей мере одну замену или набор замен, выбранных из 12I, 21R, 87L, 93D, 93M, 93T, 93V, 97G, 110I, 145C, 145G, 145M, 145S, 148I, 152G, 152S, 153C, 153R, 153V, 194H, 194N, 194R, 196H, 196K, 196R, 197G, 197R, 200L, 200Q, 200R, 206V, 212S и 226L, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 4. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат по меньшей мере одну замену или набор замен, выбранных из V12I, L21R, V87L, I93D, I93M, I93T, I93V, K97G, L110I, L145C, L145G, L145M, L145S, V148I, T152G, T152S, L153C, L153R, L153V, P194H, P194N, P194R, L196H, L196K, L196R, D197G, D197R, E200L, E200Q, E200R, M206V, T212S и I226L, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 4.

Настоящее изобретение также относится к сконструированным вариантам кеторедуктазы, имеющим последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 6, и по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или нескольких положениях, выбранных из положений 12/110/145/152, 12/145, 87/110/145, 87/110/145/194, 87/145/194, 110, 110/145/152/197, 110/145/194, 145, 145/152, 145/197/226 и 152, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат по меньшей мере одну замену или набор замен, выбранных из 12I/110I/145M/152G, 12I/145M, 87L/110I/145M, 87L/110I/145M/194H, 87L/110I/145M/194N, 87L/145M/194H, 110I, 110I/145M/152G/197G, 110I/145M/194H, 145M, 145M/152G, 145M/197G/226L и 152S, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 6. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат по меньшей мере одну замену или набор замен, выбранных из V12I/L110I/L145M/T152G, V12I/L145M, V87L/L110I/L145M, V87L/L110I/L145M/P194H, V87L/L110I/L145M/P194N, V87L/L145M/P194H, L110I, L110I/L145M/T152G/D197G, L110I/L145M/P194H, L145M, L145M/T152G, L145M/D197G/I226L и T152S, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 6.

Настоящее изобретение также относится к сконструированным вариантам кеторедуктазы, имеющим последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 80, и по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или нескольких положениях, выбранных из положений 17, 21, 46, 56, 72, 79, 95, 101, 110, 152, 162, 190, 198, 210, 211 и 227, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 80. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат по меньшей мере одну замену или набор замен, выбранных из 17Q, 17S, 21A, 46V, 56C, 72A, 79L, 95I, 101C, 101L, 101T, 110V, 152K, 152L, 162G, 190A, 198A, 198Q, 210F, 210W, 211R и 227V, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 80. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат по меньшей мере одну замену или набор замен, выбранных из L17Q, L17S, L21A, K46V, V56C, K72A, E79L, V95I, D101C, D101L, D101T, I110V, T152K, T152L, A162G, P190A, D198A, D198Q, T210F, T210W, L211R и C227V, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 80.

Настоящее изобретение также относится к сконструированным вариантам кеторедуктазы, имеющим последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 80, и по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или нескольких положениях, выбранных из положений 17, 79, 157, 159, 190/191/194, 190/194, 191/194, 194, 198 и 211, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID

NO: 80. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат по меньшей мере одну замену или набор замен, выбранных из 17M, 17Q, 17S, 79L, 157C, 159T, 190A/191T/194E, 190A/194E, 191T/194E, 194E, 198A, 198Q и 211R, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 80. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат по меньшей мере одну замену или набор замен, выбранных из L17M, L17Q, L17S, E79L, N157C, S159T, P190A/I191T/P194E, P190A/P194E, I191T/P194E, P194E, D198A, D198Q и L211R, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 80.

Настоящее изобретение также относится к сконструированным вариантам кеторедуктазы, имеющим последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 104, и по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из положений 17/46/190, 17/46/198/211, 17/96/194/198, 17/190/198, 46/190/194/198 и 46/194/198, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 104. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат по меньшей мере одну замену или набор замен, выбранных из 17M/46V/190A, 17M/46V/198A/211R, 17M/96V/194E/198Q, 17M/190A/198A, 17M/190A/198Q, 46V/190A/194E/198Q и 46V/194E/198Q, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 104. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат по меньшей мере одну замену или набор замен, выбранных из Q17M/K46V/P190A, Q17M/K46V/D198A/L211R, Q17M/I96V/P194E/D198Q, Q17M/P190A/D198A, Q17M/P190A/D198Q, K46V/P190A/P194E/D198Q и K46V/P194E/D198Q, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 104.

Настоящее изобретение также относится к сконструированным вариантам кеторедуктазы, имеющим последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 172, и по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или нескольких положениях, выбранных из положений 45, 101, 179, 194, 204, 226 и 231, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 172. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат по меньшей мере одну замену или набор замен, выбранных из 45L, 101R, 101Y, 179M, 194E, 204Q, 226V и 231G, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 172. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат по меньшей мере одну замену или набор замен, выбранных из E45L, D101R, D101Y, Y179M, P194E, E204Q, I226V и A231G, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 172.

Настоящее изобретение также относится к сконструированным вариантам кеторедуктазы, имеющим последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 186, и по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или нескольких положениях, выбранных из положений 95/96/97/150/153/205, 95/96/150/153/205/206/211/249, 95/97/143/145/150/153/202/205, 95/97/143/145/150/153/249, 95/97/150/153, 95/97/150/153/202/205/206, 95/150/153/205/206/211, 95/150/153/205/211, 95/150/153/206/249, 96/150/153, 96/150/153/206, 97/150/153, 97/150/153/205, 97/150/153/205/211, 97/150/153/206, 143/144/145/150/153/202/205/249, 143/145/150/153, 144/145/150/153/205/206, 144/150/153, 144/150/153/202/205/206, 145/150/153/206/249, 145/153/211, 150/153/202/206/249, 150/153/205/211, 150/153/206/211, 150/153/211 и 150/153/249, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 186. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат по меньшей мере одну замену или набор замен, выбранных из 95A/96A/97A/150A/153A/205A, 95A/96A/150A/153A/205A/206A/211A/249A, 95A/97A/143A/145A/150A/153A/202A/205A, 95A/97A/143A/145A/150A/153A/249A, 95A/97A/150A/153A, 95A/97A/150A/153A/202A/205A/206A, 95A/150A/153A/205A/206A/211A, 95A/150A/153A/205A/211A, 95A/150A/153A/206A/249A, 96A/150A/153A, 96A/150A/153A/206A, 97A/150A/153A, 97A/150A/153A/205A, 97A/150A/153A/205A/211A, 97A/150A/153A/206A, 143A/144A/145A/150A/153A/202A/205A/249A, 143A/145A/150A/153A, 144A/145A/150A/153A/205A/206A, 144A/150A/153A, 144A/150A/153A/202A/205A/206A, 145A/150A/153A/206A/249A, 145A/153A/211A, 150A/153A/202A/206A/249A, 150A/153A/205A/211A, 150A/153A/206A/211A, 150A/153A/211A и 150A/153A/249A, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 186. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат по меньшей мере одну замену или набор замен, выбранных из V95A/I96A/K97A/D150A/L153A/M205A, V95A/I96A/D150A/L153A/M205A/M206A/L211A/W249A, V95A/K97A/S143A/M145A/D150A/L153A/W202A/M205A, V95A/K97A/S143A/M145A/D150A/L153A/W249A, V95A/K97A/D150A/L153A, V95A/K97A/D150A/L153A/W202A/M205A/M206A, V95A/D150A/L153A/M205A/M206A/L211A, V95A/D150A/L153A/M205A/L211A, V95A/D150A/L153A/M206A/W249A, I96A/D150A/L153A,

I96A/D150A/L153A/M206A, K97A/D150A/L153A, K97A/D150A/L153A/M205A,
 K97A/D150A/L153A/M205A/L211A, K97A/D150A/L153A/M206A,
 S143A/I144A/M145A/D150A/L153A/W202A/M205A/W249A, S143A/M145A/D150A/L153A,
 I144A/M145A/D150A/L153A/M205A/M206A, I144A/D150A/L153A,
 I144A/D150A/L153A/W202A/M205A/M206A, M145A/D150A/L153A/M206A/W249A,
 M145A/L153A/L211A, D150A/L153A/W202A/M206A/W249A, D150A/L153A/M205A/L211A,
 D150A/L153A/M206A/L211A, D150A/L153A/L211A, и D150A/L153A/W249A, где положения
 пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 186.

Настоящее изобретение также относится к сконструированным вариантам кеторедуктазы, имеющим последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 186, и по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или нескольких положениях, выбранных из положений 7/147, 103/147, 110, 110/179/194, 147 и 249, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 186. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат по меньшей мере одну замену или набор замен, выбранных из 7Q/147I, 103R/147I, 110V, 110V/179M/194E, 147I и 249Y, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 186. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат по меньшей мере одну замену или набор замен, выбранных из H7Q/L147I, T103R/L147I, I110V, I110V/Y179M/P194E, L147I и W249Y, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 186.

Настоящее изобретение также относится к сконструированным вариантам кеторедуктазы, имеющим последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 194, и по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или нескольких положениях, выбранных из положений 7/12/54/110/150/153/194/205/211/249, 12/54/72/110/150/152/153/194/205/211/249, 12/72/101/103/110/152/249, 12/72/110/147/152/204, 45/54/72/110/152/194/204, 72/110/147/150/152/153/194/205/211/249 и 110/150/153/179/194/205/211/249, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 194. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат по меньшей мере одну замену или набор замен, выбранных из 7Q/12I/54S/110V/150D/153L/194E/205M/211L/249Y, 12I/54S/72T/110V/150D/152M/153L/194E/205M/211L/249Y, 12I/72S/101Y/103Q/110V/152M/249Y, 12I/72S/110V/147I/152M/204Q, 45L/54S/72S/110V/152M/194E/204Q, 72S/110V/147M/150D/152M/153L/194E/205M/211L/249Y и 110V/150D/153L/179M/194E/205M/211L/249Y, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 194. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат по меньшей мере одну замену или набор замен, выбранных из H7Q/V12I/T54S/I110V/A150D/A153L/P194E/A205M/A211L/W249Y, V12I/T54S/K72T/I110V/A150D/T152M/A153L/P194E/A205M/A211L/W249Y, V12I/K72S/R101Y/T103Q/I110V/T152M/W2V17S/T151M/W1249Y, V12I/K72S/I110V/L147I/T152M/E204Q, E45L/T54S/K72S/I110V/T152M/P194E/E204Q, K72S/I110V/L147M/A150D/T152M/A153L/P194E/A205M/A211L/W249Y и I110V/A150DV/A153L/Y179M/P194E/A205M/A211L/W249Y, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 194.

Настоящее изобретение также относится к сконструированным вариантам кеторедуктазы, имеющим последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 252, и по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или нескольких положениях, выбранных из положений 7/12/54/179/249, 7/152, 12/54/72/152/179/249, 40, 54/72, 72/147/152/179/249 и 249, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 252. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат по меньшей мере одну замену или набор замен, выбранных из 7Q/12I/54S/179Y/249Y, 7Q/152M, 12I/54S/72T/152M/179Y/249Y, 40E, 54S/72S, 72S/147M/152M/179Y/249Y и 249Y, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 252. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат по меньшей мере одну замену или набор замен, выбранных из H7Q/V12I/T54S/M179Y/W249Y, H7Q/T152M, V12I/T54S/K72T/T152M/M179Y/W249Y, H40E, T54S/K72S, K72S/L147M/T152M/M179Y/W249Y и W249Y, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 252.

Настоящее изобретение также относится к сконструированным вариантам кеторедуктазы, имеющим последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 270, и по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или нескольких положениях, выбранных из положений 92/93, 150/152, 150/152/153 и 194/195, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 270. В некоторых

дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат по меньшей мере одну замену или набор замен, выбранных из 92A/93E, 150D/152A/153L, 150Y/152A, 150Y/152S и 194S/195A, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 270. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат по меньшей мере одну замену или набор замен, выбранных из G92A/I93E, A150D/M152A/A153L, A150Y/M152A, A150Y/M152S и E194S/R195A, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 270.

Настоящее изобретение также относится к сконструированным вариантам кеторедуктазы, имеющим последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 272, и по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или нескольких положениях, выбранных из положений 92/93/95, 93, 93/95, 93/95/109, 93/95/109/114, 93/95/114, 93/109/114 и 114, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 272. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат по меньшей мере одну замену или набор замен, выбранных из 92A/93D/95R, 93A/95K/109R, 93A/95R/109D/114T, 93D/95R, 93E/109R/114A, 93M, 93R/95A/114T и 114A, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 272. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат по меньшей мере одну замену или набор замен, выбранных из G92A/I93D/V95R, I93A/V95K/K109R, I93A/V95R/K109D/N114T, I93D/V95R, I93E/K109R/N114A, I93M, I93R/V95A/N114T и N114A, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 272.

Настоящее изобретение также относится к сконструированным вариантам кеторедуктазы, имеющим последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 286, и по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или нескольких положениях, выбранных из положений 12/45/72/109/249, 12/45/93/249, 12/45/249, 12/109/249, 45/72/249, 45/109/249, 45/249, 96 и 145/150, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 286. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат по меньшей мере одну замену или набор замен, выбранных из 12I/45E/72T/109D/249Y, 12I/45E/93A/249Y, 12I/45E/249Y, 12I/109D/249Y, 45E/72T/249Y, 45E/109D/249Y, 45E/249Y, 96A и 145A/150A, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 286. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат по меньшей мере одну замену или набор замен, выбранных из V12I/L45E/S72T/K109D/W249Y, V12I/L45E/I93A/W249Y, V12I/L45E/W249Y, V12I/K109D/W249Y, L45E/S72T/W249Y, L45E/K109D/W249Y, L45E/W249Y, I96A и M145A/Y150A, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 286.

Настоящее изобретение также относится к сконструированным вариантам кеторедуктазы, имеющим последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 328, и по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или нескольких положениях, выбранных из положений 150, 150/151, 150/195 и 195, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 328. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат по меньшей мере одну замену или набор замен, выбранных из 150A, 150A/151A, 150A/195S, 195A и 195S, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 328. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат по меньшей мере одну замену или набор замен, выбранных из Y150A, Y150A/P151A, Y150A/R195S, R195A и R195S, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 328.

Настоящее изобретение также относится к сконструированным вариантам кеторедуктазы, имеющим последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 330, и по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или нескольких положениях, выбранных из положений 12/72/109/195, 17/73/200, 17/115, 68/72/101/152/205, 68/72/124, 68/72/124/152, 68/101/124/152/205, 68/124/205, 72/109/152/195, 72/109/195, 72/152, 72/152/195, 72/195, 73, 73/147, 79, 93, 93/95/145/195, 93/109/114/145/195, 93/195, 95/195, 96/108/147/200, 96/194/200, 101/205, 145/195, 147, 147/200, 192, 194, 194/200, 195, 198 и 200, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 330. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат по меньшей мере одну замену или набор замен, выбранных из 12V/72S/109K/195R, 17A/73V/200P, 17A/115Q, 68E/72D/101K/152Q/205L, 68R/72D/101Q/152Q/205L, 68R/72R/124E, 68R/72R/124E/152Q, 68R/101Q/124E/152Q/205L, 68R/124E/205L, 72D/152Q, 72K/152M/195R, 72K/195R, 72S/109K/152M/195R, 72S/109K/195R, 73V, 73V/147I, 79A, 93A, 93A/95R/145A/195R, 93A/109K/114T/145A/195R, 93A/195R, 95R/195R, 96P/108S/147I/200P, 96P/194N/200P, 101M/205L, 145A/195A, 147I, 147I/200P, 192R, 194N, 194N/200P, 195R, 198G, 198R и 200P, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 330. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат по меньшей мере

одну замену или набор замен, выбранных из I12V/T72S/D109K/S195R, M17A/L73V/E200P, M17A/L115Q, A68E/T72D/R101K/A152Q/A205L, A68R/T72D/R101Q/A152Q/A205L, A68R/T72R/L124E, A68R/T72R/L124E/A152Q, A68R/R101Q/L124E/A152Q/A205L, A68R/L124E/A205L, T72D/A152Q, T72K/A152M/S195R, T72K/S195R, T72S/D109K/A152M/S195R, T72S/D109K/S195R, L73V, L73V/L147I, E79A, I93A, I93A/V95R/M145A/S195R, I93A/D109K/N114T/M145A/S195R, I93A/S195R, V95R/S195R, I96P/R108S/L147I/E200P, I96P/E194N/E200P, R101M/A205L, M145A/S195A, L147I, L147I/E200P, K192R, E194N, E194N/E200P, S195R, Q198G, Q198R и E200P, где положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 330.

Настоящее изобретение также относится к сконструированным вариантам кеторедуктазы, содержащим полипептидные последовательности, включающие последовательности, которые по меньшей мере на 90% идентичны SEQ ID NO: 4, 6, 80, 104, 172, 186, 194, 252, 270, 272, 286, 328 и/или 330. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат полипептидные последовательности, содержащие последовательности, которые по меньшей мере на 95% идентичны последовательностям SEQ ID NO: 4, 6, 80, 104, 172, 186, 194, 252, 270, 272, 286, 328 и/или 330. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат полипептидные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 4, 6, 80, 104, 172, 186, 194, 252, 270, 272, 286, 328 и/или 330. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат варианты, кодирующие полипептидные последовательности, представленные в Таблицах 5-1, 6-1, 7-1, 8-1, 17-2, 18-1, 19-1, 19-2, 20-1, 20-2, 21-1, 22-1 и/или 24-1. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, сконструированные варианты кеторедуктазы содержат полипептидные последовательности, выбранные из последовательностей с четными номерами, представленных в SEQ ID NO: 6-412.

Настоящее изобретение также относится к сконструированным полинуклеотидным последовательностям, кодирующим сконструированные варианты кеторедуктазы, описанные в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированная полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности, выбранной из последовательностей с нечетными номерами, представленных в SEQ ID NO: 5-411. Настоящее изобретение также относится к векторам, содержащим сконструированные полинуклеотидные последовательности, кодирующие сконструированные варианты кеторедуктазы, представленные в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, векторы дополнительно содержат по меньшей мере одну регуляторную последовательность. В некоторых вариантах осуществления изобретения, векторы содержат SEQ ID NO: 413 и/или 414.

Настоящее изобретение также относится к клеткам-хозяевам, содержащим векторы, включающие полинуклеотиды, кодирующие описанные здесь сконструированные варианты кеторедуктазы.

Настоящее изобретение также относится к способам получения сконструированных вариантов кеторедуктазы, описанных в настоящей заявке, где указанные способы включают культивирование клеток-хозяев, описанных в настоящей заявке, в условиях, при которых сконструированный вариант кеторедуктазы продуцируется клеткой-хозяином. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способы дополнительно включают стадию выделения сконструированного варианта кеторедуктазы, продуцируемого клеткой-хозяином. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, способы получения сконструированных вариантов кеторедуктазы включают культивирование клетки-хозяина, содержащей вектор SEQ ID NO: 413 и/или 414.

Настоящее изобретение также относится к иммобилизованным сконструированным вариантам кеторедуктазы.

Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим по меньшей мере один сконструированный вариант кеторедуктазы, представленный в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиции содержат по меньшей мере один иммобилизованный сконструированный вариант кеторедуктазы, представленный в настоящей заявке.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлен типичный профиль ВЭЖХ-реакции, позволяющий сравнивать активность KRED полипептидов SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 80 при высокой концентрации субстрата.

На фиг. 2 представлены результаты экспериментов, описанных в примере 11, по оценке активности KRED (% превращения) выбранных вариантов при высокой концентрации субстрата и низкой концентрации NADP.

На фиг. 3 представлен типичный профиль ВЭЖХ-реакции, иллюстрирующий виды Rho, продуцируемые полипептидом SEQ ID NO: 194.

На фиг. 4 представлен типичный профиль ВЭЖХ-реакции, позволяющий сравнивать активность KRED полипептидов SEQ ID NO: 328 и SEQ ID NO: 330 при высокой концентрации субстрата и низкой концентрации NADP. На фиг. 4, сплошные линии=4 г/л фермента; пунктирные линии=1 г/л фермента; ромб=SEQ ID NO: 328; незаштрихованные квадраты=SEQ ID NO: 330.

На фиг. 5 представлен типичный профиль ВЭЖХ-реакции, позволяющий сравнивать активность KRED полипептидов SEQ ID NO: 270, SEQ ID NO: 328, SEQ ID NO: 330, SEQ ID NO: 348, SEQ ID NO: 346 и SEQ ID NO: 356 при высокой концентрации субстрата и низкой концентрации NADP. На фиг. 5, незаштрихованный треугольник=SEQ ID NO:270; заштрихованный треугольник=SEQ ID NO: 328; незаштрихованный круг=SEQ ID NO: 348; заштрихованный круг=SEQ ID NO: 356; незаштрихованный квадрат=SEQ ID NO: 330; заштрихованный квадрат=SEQ ID NO: 346.

Описание изобретения

Настоящее изобретение относится к сконструированным кеторедуктазным ферментам, обладающим улучшенными свойствами по сравнению с природным кеторедуктазным ферментом дикого типа, а также к полинуклеотидам, кодирующим сконструированные кеторедуктазные ферменты, к клеткам-хозяевам, способным экспрессировать сконструированные кеторедуктазные ферменты, и к способам применения сконструированных кеторедуктазных ферментов.

Определения

В настоящем изобретении, технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют общепринятые значения, понятные специалистам в данной области, если это не оговорено особо. Соответственно, встречающиеся здесь термины имеют значения, определенные ниже. Все патенты и публикации, включая все последовательности, раскрытые в таких патентах и публикациях, на которые делается ссылка в настоящей заявке, точно включены посредством ссылки. Если это не оговорено особо, то практическое применение настоящего изобретения включает применение стандартных методов, обычно используемых в молекулярной биологии, ферментации, микробиологии и в родственных областях, которые известны специалистам в данной области. Если это не оговорено особо, то все используемые здесь технические и научные термины имеют значения, понятные специалистам в области, к которой относится настоящее изобретение. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным здесь способам и материалам, могут быть использованы при осуществлении настоящего изобретения или проведении экспериментов согласно изобретению, однако, в настоящей заявке описаны предпочтительные способы и материалы. Действительно, предполагается, что настоящее изобретение не ограничивается конкретной методикой, протоколами и реагентами, описанными в настоящей заявке, поскольку они могут варьироваться в зависимости от контекста, в котором они используются. Представленные здесь заголовки не являются ограничениями различных аспектов или вариантов осуществления настоящего изобретения.

Тем не менее, для лучшего понимания настоящего изобретения, ниже приводится определение ряда терминов. Числовые диапазоны включают числа, определяющие данный диапазон. Таким образом, каждый числовой диапазон, раскрытый в настоящей заявке, охватывает каждый более узкий числовой диапазон, который входит в такой более широкий числовой диапазон, как если бы все такие более узкие числовые диапазоны были точно указаны в настоящей заявке. Также предполагается, что каждое максимальное (или минимальное) числовое ограничение, раскрытое в настоящей заявке, включает каждое более низкое (или более высокое) числовое ограничение, как если бы такое более низкое (или более высокое) числовое ограничение было точно указано в настоящей заявке.

Используемый здесь термин "содержащий" и родственные ему термины используются в их инклюзивном смысле (то есть эквивалентны термину "включая" и соответствующим родственным ему терминам).

Используемые здесь и в прилагаемой формуле изобретения артикли "a", "an" и "the", употребляемые с существительными в единственном числе, могут относиться и к объектам во множественном числе, если из контекста описания явно не следует иное. Таким образом, например, словосочетание "клетка-хозяин" может означать множество таких клеток-хозяев.

Если это не оговорено особо, то нуклеиновые кислоты записываются слева направо в ориентации от 5' к 3', а последовательности аминокислот записываются слева направо в ориентации от амино- до карбокси-концов, соответственно.

Представленные здесь заголовки не являются ограничениями различных аспектов или вариантов осуществления изобретения, которые в целом могут быть включены в описание посредством ссылки. Соответственно, термины, определенные ниже, будут более полно определены со ссылкой на описание в целом.

Используемые здесь термины "кеторедуктаза" и "KRED" являются синонимами и означают полипептид, обладающий ферментативной способностью восстанавливать карбонильную группу до соответствующего спирта. Более конкретно, кеторедуктазные полипептиды согласно изобретению способны восстанавливать смесь изо- α -кислот до соответствующих дигидро-(ρ)-изо- α -кислот, как показано на схеме 1. Кеторедуктазные ферменты согласно изобретению происходят от встречающейся в природе KRED *L. kefir* (SEQ ID NO: 2). Однако, термины KRED и кеторедуктаза не ограничиваются этими определениями и могут относиться к природным ферментам или к ферментам, полученным из различных видов бактерий, растений, водорослей и/или животных. Ферменты могут быть синтетическими, искусственными или полученными различными способами, известными специалистам в данной области.

Используемые здесь термины "изо- α -кислоты" или "изо" являются синонимами и означают изомеры, эпимеры, диастереомеры, таутомеры и энантиомеры изогумулона, соединения, полученного из хмеля, а именно, цветков растения хмеля, *Humulus lupulus* L. Термины "изо- α -кислоты" или "изо" включают цис-изогумулон, транс-изогумулон, цис-изокогумулон, транс-изокогумулон, цис-изоадгумулон и транс-изоадгумулон, но не ограничиваются ими. "Изо- α -кислоты" или "изо" также включают любые природные или синтетические изомеры, эпимеры, диастереомеры, таутомеры, энантиомеры или другие производные или аналогичные соединения, которые обладают сходными химическими свойствами, а в частности, придают горький вкус или горечь пиву или другим алкогольным или подобным напиткам. В это определение входят любые изомеры, эпимеры, диастереомеры, энантиомеры или таутомеры ядра изогумулонтетроновой кислоты.

Используемые здесь термины "дигидро-(rho)-изо- α -кислоты" или "rho" являются синонимами и относятся к соединениям, образованным восстановлением карбонильной группы "изо- α -кислоты" или "изо", как определено в настоящей заявке. "Дигидро-(rho)-изо- α -кислоты" или "rho" могут быть получены из "изо- α -кислот" или "изо" путем превращения под действием одного или нескольких полипептидов KRED, как описано в настоящей заявке.

Используемые здесь термины "белок", "полипептид" и "пептид" являются синонимами и означают полимер, состоящий по меньшей мере из двух аминокислот, ковалентно связанных амидной связью, независимо от длины или посттрансляционной модификации (например, гликозилирования, фосфорилирования, липидизации, миристоилирования, убихитинизации и т.п.). В это определение входят D- и L-аминокислоты и смеси D- и L-аминокислот.

Используемые здесь термины "полинуклеотид" и "нуклеиновая кислота" относятся к двум или более нуклеозидам, ковалентно связанным друг с другом. Полинуклеотид может полностью состоять из рибонуклеозидов (то есть РНК), полностью состоять из 2'-дезоксирибонуклеозидов (то есть ДНК) или из смесей рибо- и 2'-дезоксирибонуклеозидов. Нуклеозиды обычно связаны друг с другом посредством стандартных фосфодиэфирных связей, а полинуклеотиды могут включать одну или более нестандартных связей. Полинуклеотид может быть одноцепочечным или двухцепочечным, либо он может включать как одноцепочечные, так и двухцепочечные области. Более того, хотя полинуклеотид обычно состоит из природных кодирующих азотистых оснований (то есть аденина, гуанина, урацила, тимина и цитозина), однако, он может включать одно или более модифицированных и/или синтетических азотистых оснований (например, инозин, ксантин, гипоксантин и т.п.). Предпочтительно такие модифицированные или синтетические азотистые основания представляют собой кодирующие азотистые основания.

Используемый здесь термин "кодирующая последовательность" относится к той части нуклеиновой кислоты (например, к гену), которая кодирует аминокислотную последовательность белка.

Используемый здесь термин "природный" или "дикого типа" относится к форме, встречающейся в природе. Так, например, природная полипептидная или полинуклеотидная последовательность или полипептидная или полинуклеотидная последовательность дикого типа представляет собой последовательность, присутствующую в организме, которая может быть выделена из природного источника и которая не была специально модифицирована человеком.

Используемый здесь термин "не встречающийся в природе", "сконструированный" или "рекомбинантный", если он используется в настоящем изобретении применительно, например, к клетке, нуклеиновой кислоте или к полипептиду, относится к материалу или к материалу в его природной или нативной форме, которая была модифицирована так, чтобы она отличалась от природной формы, или была идентична этой форме, но была продуцирована или выделена из синтетических материалов и/или путем манипуляций с применением рекомбинантных методов. Неограничивающие примеры включают, помимо прочих, рекомбинантные клетки, экспрессирующие гены, которые отсутствуют в нативной (не рекомбинантной) форме клетки, или экспрессирующие нативные гены, которые экспрессируются иначе и на другом уровне.

Используемые здесь термины "процент идентичности последовательностей" и "процент идентичности" относятся к сравнению полинуклеотидных последовательностей или полипептидных последовательностей, и такой процент определяется путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, где часть полинуклеотидной или полипептидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (то есть пробелы) по сравнению с эталонной последовательностью для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент вычисляют путем определения числа положений, в которых идентичное основание нуклеиновой кислоты, или аминокислотный остаток встречается в обеих последовательностях, либо основание нуклеиновой кислоты или аминокислотный остаток выравнивают с пробелом так, чтобы получить количество совпадающих положений, а затем полученный результат делят на общее число положений в окне сравнения и полученный результат умножают на 100 с получением процента идентичности последовательностей. Оптимальное выравнивание и вычисление процента идентичности последовательностей проводят с использованием алгоритмов BLAST и BLAST 2.0 (см., например, Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 [1990]; и Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*

3389-3402 [1977]). Программа для проведения анализов BLAST является общедоступной на веб-сайте Национального Центра Биотехнологической информации.

Вкратце, анализ BLAST включает сначала идентификацию пар последовательностей с высокой оценкой (HSP) путем идентификации коротких слов длиной W в последовательности запроса, которые либо соответствуют, либо удовлетворяют некоторому положительному пороговому показателю T при сопоставлении со словом той же длины в последовательности базы данных. T упоминается как порог оценки соседнего слова (Altschul et al., см. выше). Эти начальные совпадения соседних слов служат в качестве исходных данных для инициации поиска более длинных последовательностей, содержащих эти HSP. Затем совпадения слов расширяются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности настолько, насколько может быть увеличена совокупная оценка выравнивания. Совокупные баллы вычисляются для нуклеотидных последовательностей с использованием параметров M (поощрительный балл за пару совпадающих остатков; всегда >0) и N (штрафной балл за несовпадающие остатки; всегда <0). Для аминокислотных последовательностей используется оценочная матрица для вычисления кумулятивной оценки. Расширение совпадений слов в каждом направлении прекращается, если: кумулятивный показатель выравнивания падает на величину X от максимально достигнутого значения; совокупная оценка становится равной нулю или ниже из-за накопления одного или нескольких выравниваний остатков с отрицательной оценкой; или достигнут конец любой последовательности. Параметры алгоритма BLAST W , T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) используются по умолчанию: длина слова (W), равная 11, ожидание (E), равное 10, $M=5$, $N=-4$ и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей, в программе BLASTP используются по умолчанию: длина слова (W), равная 3, математическое ожидание (E), равное 10, и оценочная матрица BLOSUM62 (см., например, Henikoff and Henikoff, Proc Natl Acad Sci USA 89:10915 [1989]).

Для определения процента идентичности двух последовательностей известны и доступны многие другие алгоритмы, которые функционируют аналогично BLAST. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть проведено с применением любого подходящего метода, известны специалистам в данной области (например, с помощью алгоритма локальной гомологии Смита и Уотермана, Adv. Appl. Math. 2:482 [1981]; с помощью алгоритма выравнивания гомологии Нидмана и Вюнша, J. Mol. Biol., 48:443 [1970], с применением метода поиска сходства Пирсона и Липмана, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 [1988] и/или с помощью компьютеризированной реализации этих алгоритмов [GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в программном пакете GCG Wisconsin]), или путем визуального осмотра с применением широко известных методов. Кроме того, для определения выравнивания последовательностей и процента идентичности последовательностей могут быть использованы программы BESTFIT или GAP в программном пакете GCG Wisconsin Software (Accelrys, Madison WI) с параметрами по умолчанию.

Используемый здесь термин "эталонная последовательность" относится к определенной последовательности, с которой сравнивается другая последовательность. Эталонная последовательность может быть частью более крупной последовательности, например, сегментом полноразмерного гена или полипептидной последовательности. Обычно, эталонная последовательность имеет длину по меньшей мере 20 нуклеотидных или аминокислотных остатков, по меньшей мере 25 остатков, по меньшей мере 50 остатков или представляет собой полноразмерную последовательность нуклеиновой кислоты или полипептида. Поскольку каждый из двух полинуклеотидов или полипептидов (1) может содержать последовательность (то есть часть полноразмерной последовательности), сходную для двух последовательностей, и (2) может дополнительно содержать последовательность, отличающуюся у этих двух последовательностей, то сравнение последовательностей двух (или более) полинуклеотидов или полипептидов обычно проводят путем сравнения последовательностей двух полинуклеотидов в окне сравнения для идентификации и сравнения локальных областей сходства последовательностей. Термин "эталонная последовательность" не ограничивается последовательностями дикого типа и может включать сконструированные или измененные последовательности. Так, например, в некоторых вариантах осуществления изобретения, "эталонная последовательность" может представлять собой ранее сконструированную или измененную аминокислотную последовательность.

Используемый здесь термин "окно сравнения" относится к концептуальному сегменту, состоящему по меньшей мере приблизительно из 20 последовательно расположенных положений нуклеотидов или аминокислотных остатков, где последовательность можно сравнивать с эталонной последовательностью, состоящей по меньшей мере из 20 последовательно расположенных нуклеотидов или аминокислот, и где часть последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (то есть пробелы) на 20 процентов или менее по сравнению с эталонной последовательностью (которая не содержит добавлений или делеций) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Окно сравнения может быть длиннее, чем 20 смежных остатков, и может включать, но необязательно, 30, 40, 50, 100 или более окон.

Используемые здесь термины "соответствует", "по отношению к" или "относительно", если они употребляются применительно к нумерации данной аминокислотной или полинуклеотидной

последовательности, относятся к нумерации остатков указанной эталонной последовательности, если данная аминокислотная или полинуклеотидная последовательность сравнивается с эталонной последовательностью. Другими словами, число остатков или положений остатков данного полимера обозначается по отношению к эталонной последовательности, а не по фактическому числу положений остатка в данной аминокислотной или полинуклеотидной последовательности. Так, например, данная аминокислотная последовательность, такая как последовательность сконструированной кеторедуктазы, может быть выровнена с эталонной последовательностью путем введения пробелов для оптимизации соответствия остатков между двумя последовательностями. В этих случаях, несмотря на наличие пробелов, нумерация остатков в данной аминокислотной или полинуклеотидной последовательности осуществляется по отношению к эталонной последовательности, с которой ее сравнивают. Используемый в настоящей заявке термин "положение остатка", такой как "X_n", как дополнительно описано ниже, должен толковаться как "остаток, соответствующий...", если это не оговорено особо. Так, например, "X₉₄" относится к любой аминокислоте в положении 94 в полипептидной последовательности.

Используемый здесь термин "стереоселективность" относится к предпочтительному образованию в химической или ферментативной реакции одного стереоизомера по сравнению с другим стереоизомером или с другим набором стереоизомеров. Стереоселективность может быть частичной, когда образование одного стереоизомера предпочтительнее другого, или полной, когда образуется только один стереоизомер. Если стереоизомеры представляют собой энантиомеры, то стереоселективность называют энантиоселективностью, то есть долей (обычно выражаемой в процентах) одного энантиомера в сумме обоих энантиомеров. Обычно, специалисты в данной области используют альтернативный термин "энантиомерный избыток" (выражаемый в процентах) (э.и.), рассчитанный по формуле [Основной энантиомер - второстепенный энантиомер]/[основной энантиомер+второстепенный энантиомер]. Если стереоизомеры представляют собой диастереоизомеры, то стереоселективность называется диастереоселективностью, то есть долей (обычно выражаемой в процентах) одного диастереомера в смеси двух диастереомеров, обычно также обозначаемой как диастереомерный избыток (д.и.). Энантиомерный избыток и диастереомерный избыток представляют собой типы стереомерных избытков. Следует также отметить, что стереоселективность не ограничивается отдельными стереоизомерами и может быть описана для наборов стереоизомеров.

Используемый здесь термин "в высокой степени стереоселективный" относится к химической или ферментативной реакции, которая способна превращать субстрат в соответствующий хиральный спиртовой продукт со стереомерным избытком, составляющим по меньшей мере приблизительно 75%.

Используемые здесь термины "повышенная ферментативная активность" и "повышенная активность" относятся к улучшенному свойству сконструированного фермента, которое может быть представлено увеличением удельной активности (например, количеством произведенного продукта/временем/массой белка) или увеличением процента превращения субстрата в продукт (например, процента превращения исходного количества субстрата в продукт за определенный период времени с использованием определенного количества кеторедуктазы) по сравнению с эталонным ферментом. Репрезентативные методы определения ферментативной активности приведены в примерах. Может быть рассмотрено любое свойство, относящееся к ферментативной активности, включая классические ферментативные свойства K_m , V_{max} или k_{cat} , изменение которых может приводить к повышению ферментативной активности. Кеторедуктазная активность может быть определена с помощью любого из стандартных анализов, проводимых для оценки уровней кеторедуктаз, таких как изменение концентрации субстрата или продукта или изменение концентрации кофактора (в отсутствие системы регенерации кофактора). Сравнения ферментативной активности проводят с использованием определенного препарата фермента, с помощью определенного анализа в заданных условиях и одного или нескольких определенных субстратов, как будет подробно описано ниже. Обычно, при сравнении ферментов в клеточных лизатах определяют число клеток и количество анализируемого белка, а также используют идентичные системы экспрессии и идентичные клетки-хозяева для того, чтобы свести к минимуму различия в количестве фермента, продуцируемого клетками-хозяевами и присутствующего в лизатах.

Используемый здесь термин "превращение" относится к ферментативному превращению субстрата в соответствующий продукт.

Используемый здесь термин "процент превращения" относится к проценту субстрата, который превращается в продукт в течение определенного периода времени при определенных условиях. Так, например, "ферментативная активность" или "активность" полипептида кеторедуктазы может быть выражена как "процент превращения" субстрата в продукт.

Используемые здесь термины "термоустойчивый" или "термостабильный" являются синонимами и относятся к полипептиду, который является резистентным к инактивации при воздействии ряда температурных условий (например, 40-80°C) в течение определенного периода времени (например, 0,5-24 ч) по сравнению с необработанным ферментом, что позволяет сохранять определенный уровень остаточной активности (например, более, чем 60-80%) после воздействия повышенных температур.

Используемый здесь термин "устойчивый к действию растворителя" относится к способности полипептида сохранять аналогичную активность (например, более чем, например, от 60% до 80%) после воздействия различных концентраций (например, 5-99%) растворителя по сравнению с активностью необработанного фермента.

Используемый здесь термин "различия аминокислот" или "различия остатков" означает, что аминокислотный остаток в положении полипептидной последовательности отличается от аминокислотного остатка в соответствующем положении эталонной последовательности. Положения, где имеется различие аминокислот, обычно обозначаются здесь "X_n", где n относится к соответствующему положению в эталонной последовательности, с которой проводят сравнение остатков. Так, например, "различие остатков в положении X40 по сравнению с SEQ ID NO: 2" относится к отличию аминокислотного остатка в положении полипептида, соответствующем положению 40 SEQ ID NO: 2. Таким образом, если эталонный полипептид SEQ ID NO: 2 имеет гистидин в положении 40, то "отличие остатка в положении X40 по сравнению с SEQ ID NO: 2" относится к аминокислотной замене любого остатка, отличающегося от гистидина, в положении полипептида, соответствующем положению 40 SEQ ID NO: 2. В большинстве случаев, в настоящей заявке, различие конкретных аминокислотных остатков в положении указано как "X_nY", где "X_n" означает соответствующее положение, как описано выше, а "Y" означает однобуквенный код аминокислоты, присутствующей в сконструированном полипептиде (то есть остаток, отличающийся от остатка в эталонном полипептиде). В некоторых случаях, в настоящем изобретении также представлены конкретные различия аминокислот, обычно обозначаемые "A_nB", где A представляет собой однобуквенный код остатка в эталонной последовательности, "n" означает номер положения остатка в эталонной последовательности, а B представляет собой однобуквенный код замены остатка в последовательности сконструированного полипептида. В некоторых случаях, полипептид согласно изобретению может включать одно или несколько отличий аминокислотных остатков по сравнению с эталонной последовательностью, на что указывает список определенных положений, в которых присутствуют отличия остатков по сравнению с эталонной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения, где в конкретном положении остатка полипептида может находиться более, чем одна аминокислота, различные аминокислотные остатки, которые могут быть использованы, разделены знаком "/" (например, X192A/G). Настоящее изобретение включает сконструированные полипептидные последовательности, содержащие одно или более отличий аминокислот, которые включают как консервативные, так и неконсервативные аминокислотные замены, либо ту или другую замену. Аминокислотные последовательности специфических полипептидов рекомбинантной кеторедуктазы, включенные в Список последовательностей согласно изобретению, содержат иницирующий остаток метионина (M) (то есть M представляет собой остаток в положении 1). Однако, квалифицированному специалисту известно, что этот иницирующий остаток метионина может быть удален по механизму биологического процессинга, например, в клетке-хозяине или в системе трансляции *in vitro*, с получением зрелого белка, не содержащего иницирующего остатка метионина, но в остальном сохраняющего свойства фермента. Следовательно, используемый здесь термин "отличие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 2 в положении X_n" может относиться к положению "X_n" или к соответствующему положению (например, положению (X-1)_n) в эталонной последовательности, которая была обработана так, чтобы она не содержала исходного метионина.

Используемый здесь термин "консервативные аминокислотные замены" относится к взаимозаменяемости остатков, имеющих сходные боковые цепи, и, таким образом, обычно включает замену аминокислоты в полипептиде аминокислотами, принадлежащими к тому же или аналогичному определенному классу аминокислот. В качестве неограничивающего примера, в некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислота с алифатической боковой цепью была заменена другой алифатической аминокислотой (например, аланином, валином, лейцином и изолейцином); аминокислота с гидроксильной боковой цепью была заменена другой аминокислотой с гидроксильной боковой цепью (например, серином и треонином); аминокислота, имеющая ароматическую боковую цепь, была заменена другой аминокислотой, имеющей ароматическую боковую цепь (например, фенилаланином, тирозином, триптофаном и гистидином); аминокислота с основной боковой цепью была заменена другой аминокислотой с основной боковой цепью (например, лизином и аргинином); аминокислота с кислотной боковой цепью была заменена другой аминокислотой с кислотной боковой цепью (например, аспарагиновой кислотой или глутаминовой кислотой); и/или гидрофобная или гидрофильная аминокислота была заменена другой гидрофобной или гидрофильной аминокислотой, соответственно. Примеры консервативных замен приводятся в табл. 1.

Примеры консервативных аминокислотных замен

Остаток	Возможные консервативные замены
A, L, V, I	Другие алифатические (A, L, V, I) Другие неполярные (A, L, V, I, G, M)
G, M	Другие неполярные (A, L, V, I, G, M)
D, E	Другие кислотные (D, E)
K, R	Другие основные (K, R)
N, Q, S, T	Другие полярные
H, Y, W, F	Другие ароматические (H, Y, W, F)
C, P	Неполярные

Используемый здесь термин "неконсервативная замена" относится к замене аминокислоты в полипептиде аминокислотой со значительно отличающимися свойствами боковой цепи. Неконсервативные замены могут включать замены аминокислот между определенными группами, а не внутри них, и влияют на (а) структуру пептидного остова в области замены (например, замену глицина на пролин), (б) заряд или гидрофобность, или (с) остов боковой цепи. В качестве неограничивающего примера, типичная неконсервативная замена может представлять собой кислотную аминокислоту, замененную основной или алифатической аминокислотой; ароматическую аминокислоту, замененную небольшой аминокислотой; и гидрофильную аминокислоту, замененную гидрофобной аминокислотой.

Как будет понятно специалистам в данной области, некоторые из определенных выше категорий, если это не оговорено особо, не являются взаимоисключающими. Таким образом, аминокислоты, имеющие боковые цепи, обладающие двумя или более физико-химическими свойствами, могут быть включены в несколько категорий. Соответствующая классификация любой аминокислоты или остатка будет очевидна специалистам в данной области, особенно в свете представленного здесь подробного описания изобретения.

Используемый здесь термин "делеция" означает модификацию полипептида путем удаления одной или нескольких аминокислот из эталонного полипептида. Делеции могут включать удаление 1 или более аминокислот, 2 или более аминокислот, 5 или более аминокислот, 10 или более аминокислот, 15 или более аминокислот или 20 или более аминокислот до 10% от общего количества аминокислот, или до 20% от общего количества аминокислот, составляющих полипептид, при сохранении ферментативной активности и/или сохранении улучшенных свойств сконструированного фермента. Делеции могут быть сделаны во внутренних участках и/или в концевых участках полипептида. В различных вариантах осуществления изобретения, делеция может включать непрерывный сегмент или может быть прерывистой.

Используемый здесь термин "инсерция" означает модификацию полипептида путем добавления одной или нескольких аминокислот к эталонному полипептиду. В некоторых вариантах осуществления изобретения, улучшенные сконструированные кеторедуктазные ферменты содержат инсерции одной или нескольких аминокислот в природном кеторедуктазном полипептиде, а также инсерции одной или нескольких аминокислот в сконструированных кеторедуктазных полипептидах. Инсерции могут присутствовать во внутренних частях полипептида или на карбокси- или амино-конце. Используемый здесь термин "инсерции" охватывает слитые белки, как известно специалистам в данной области. Инсерция может представлять собой непрерывный сегмент аминокислот, или она может быть разделена одной или несколькими аминокислотами в природном полипептиде.

Термин "набор аминокислотных замен" или "набор замен" относится к группе аминокислотных замен 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 более аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления изобретения, набор замен относится к набору аминокислотных замен, который присутствует в любом из вариантов KRED, перечисленных в Таблицах, приведенных в примерах.

Используемый здесь термин "фрагмент" относится к полипептиду, который имеет амино-концевую и/или карбокси-концевую делецию, но в котором оставшаяся аминокислотная последовательность идентична соответствующим положениям в последовательности. Фрагменты обычно могут содержать приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 98% или приблизительно 99% полноразмерного полипептида кеторедуктазы, например, полипептида SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагмент является "биологически активным" (то есть он обладает такой же ферментативной активностью, как и полноразмерная последовательность).

Используемый здесь термин "выделенный полипептид" относится к полипептиду, который в значительной степени отделен от других сопутствующих природных примесей, например, белков, липидов и полинуклеотидов. Этот термин охватывает полипептиды, которые были удалены или очищены от их природного окружения или экспрессионной системы (например, из клетки-хозяина или при синтезе *in vitro*). Кеторедуктазные ферменты с улучшенными свойствами могут присутствовать

внутри клетки, в клеточной среде или могут быть приготовлены в различных формах, таких как лизаты или выделенные препараты. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированные кеторедуктазные полипептиды согласно изобретению могут представлять собой выделенный полипептид.

Используемый здесь термин "практически чистый полипептид" относится к композиции, в которой полипептиды определенного вида являются преобладающими (то есть в молярном или массовом отношении, они более распространены, чем любые другие отдельные виды макромолекул в композиции), и обычно, этот термин относится, по существу, к очищенной композиции, где нужные виды включают по меньшей мере приблизительно 50% макромолекулярных видов, присутствующих в молярном отношении или % по массе. Обычно, практически чистая композиция сконструированного кеторедуктазного полипептида будет содержать приблизительно 60% или более, приблизительно 70% или более, приблизительно 80% или более, приблизительно 90% или более, приблизительно 91% или более, приблизительно 92% или более, приблизительно 93% или более, приблизительно 94% или более, приблизительно 95% или более, приблизительно 96% или более, приблизительно 97% или более, приблизительно 98% или более или приблизительно 99% всех видов макромолекул, присутствующих в композиции в молярном отношении или в % по массе. Растворители, небольшие молекулы (<500 Дальтон) и элементарные ионы не считаются макромолекулярными соединениями. В некоторых вариантах осуществления изобретения, выделенный кеторедуктазный полипептид с улучшенными свойствами представляет собой по существу чистую полипептидную композицию.

Используемый здесь термин "гетерологичный", если он употребляется применительно к нуклеиновой кислоте или к полипептиду, относится к последовательности, которая обычно не экспрессируется и не секретруется организмом (например, организмом дикого типа). В некоторых вариантах осуществления изобретения, этот термин охватывает последовательность, включающую две или более подпоследовательности, которые не обнаруживаются в таком же соотношении друг к другу, как это обычно наблюдается в природе, или были рекомбинантно сконструированы так, чтобы уровень их экспрессии или физическая взаимосвязь с другими нуклеиновыми кислотами или другими молекулами в клетке или в структуре обычно не встречались в природе. Так, например, гетерологичную нуклеиновую кислоту обычно получают рекомбинантным способом так, чтобы она имела две или более последовательностей неродственных генов, расположенных в определенном порядке, не встречающемся в природе (например, открытая рамка считывания нуклеиновой кислоты (ОРС) согласно изобретению может быть функционально связана с промоторной последовательностью, встроенной в экспрессионный кластер, такой как вектор). В некоторых вариантах осуществления изобретения, "гетерологичный полинуклеотид" означает любой полинуклеотид, который вводят в клетку-хозяина лабораторными методами, и включает полинуклеотиды, которые удаляют из клетки-хозяина, подвергают лабораторным манипуляциям, а затем повторно вводят в клетку-хозяина.

Используемый здесь термин "оптимизированные по кодонам" относится к замене кодонов полинуклеотида, кодирующего белок, на кодоны, которые предпочтительно используются в конкретном организме, так, чтобы кодируемый белок эффективно экспрессировался в представляющем интерес организме. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотиды, кодирующие кеторедуктазные ферменты, могут быть оптимизированы по кодонам для оптимального продуцирования из организма-хозяина, выбранного для экспрессии.

Используемый здесь термин "регуляторная последовательность" включает все компоненты, которые являются необходимыми или предпочтительными для экспрессии полинуклеотида и/или полипептида согласно изобретению. Каждая регуляторная последовательность может быть нативной или чужеродной для представляющего интерес полинуклеотида. Такие регуляторные последовательности включают, но не ограничиваются ими, лидерную последовательность, последовательность полиаденилирования, последовательность пропептида, промотор, последовательность сигнального пептида и терминатор транскрипции.

Используемый здесь термин "функционально связанный" определяется здесь как конфигурация, в которой регуляторная последовательность соответствующим образом расположена (то есть в функциональной взаимосвязи) в положении относительно представляющего интерес полинуклеотида, так что такая регуляторная последовательность направляет или регулирует экспрессию представляющего интерес полинуклеотида и/или полипептида.

Используемые здесь термины "система регенерации кофактора" и "система рециркуляции кофактора" относятся к набору реагентов, участвующих в реакции, которая восстанавливает окисленную форму кофактора (например, NADP+ до NADPH). Кофакторы, окисленные катализируемым кеторедуктазой восстановлением кето-субстрата, регенерируются в восстановленной форме посредством системы регенерации кофакторов. Системы регенерации кофактора содержат стехиометрический восстановитель, который является источником восстановления эквивалентов водорода и способен восстанавливать окисленную форму кофактора. Система регенерации кофактора может дополнительно включать катализатор, например, ферментный катализатор, который катализирует восстановление окисленной формы кофактора под действием восстановителя. Системы регенерации кофактора для

регенерации NADH или NADPH из NAD⁺ или NADP⁺, соответственно, известны специалистам в данной области и могут быть использованы в способах, описанных в настоящей заявке.

Используемый здесь термин "подходящие условия реакции" относится к таким условиям в биокаталитическом реакционном растворе (например, к диапазону загрузки фермента, загрузки субстрата, загрузки кофактора, температур, pH, буферов, соразвителей и т.п.), при которых кеторедуктазные полипептиды согласно изобретению способны стереоселективно восстанавливать соединение-субстрат до соединения-продукта. Типичные "подходящие условия реакции" описаны в настоящем изобретении и проиллюстрированы в примерах.

Используемый здесь термин "загрузка", например, "загрузка соединения", "загрузка фермента" или "загрузка кофактора", относится к концентрации или к количеству компонента в реакционной смеси в начале реакции.

Используемый здесь термин "субстрат", если он относится к процессу, опосредуемому биокатализатором, означает соединение или молекулу, на которую действует биокатализатор. Так, например, репрезентативный субстрат для биокатализатора кеторедуктазы в раскрытом здесь способе представляет собой изо- α -кислоту.

Используемый здесь термин "продукт", если он относится к процессу, опосредуемому биокатализатором, означает соединение или молекулу, образующиеся под действием биокатализатора.

Используемый здесь термин "уравновешивание" относится к процессу, приводящему к стационарной концентрации химических веществ в химической или ферментативной реакции (например, реакции взаимного превращения двух соединений А и В), включая взаимное превращение стереоизомеров, как было определено по константе прямой скорости и константе обратной скорости химической или ферментативной реакции.

Используемый здесь термин "оксо" означает =O.

Используемый здесь термин "окси" относится к двухвалентной группе -O-, которая может иметь различные заместители для образования различных оксигрупп, включая простые и сложные эфиры.

Используемый здесь термин "карбоксо" означает группу -COOH.

Используемый здесь термин "карбонил" означает группу -C(O)-, которая может иметь множество заместителей для образования различных карбонильных групп, включая кислоты, галогенангидриды, альдегиды, амиды, сложные эфиры и кетоны.

Используемый здесь термин "гидрокси" означает группу -OH.

Используемые здесь термины "необязательный" и "необязательно" означают, что описанное далее событие или обстоятельство может произойти, а может и не произойти, и этот термин включает случаи, когда событие или обстоятельство имеет место, и случаи, когда они не происходят. Специалисту в данной области будет понятно, что в отношении любой молекулы, описанной как содержащей один или несколько необязательных заместителей, подразумевается включение только стерически применимых и/или синтетически приемлемых соединений.

Используемый здесь термин "необязательно замещенный" относится ко всем последующим определениям терминов или к ряду химических групп. Так, например, термин "необязательно замещенный арилалкил" означает, что "алкильная" часть и "арильная" часть молекулы могут быть, а могут и не быть замещены, а термины "необязательно замещенный алкил, циклоалкил, арил и гетероарил" означают, что алкильная, циклоалкильная, арильная и гетероарильная группы независимо от других могут быть замещены, а могут и не замещены.

Сконструированные ферментные полипептиды

Кеторедуктазные (KRED) или карбонилредуктазные биокатализаторы (EC1.1.1.184) могут быть использованы для синтеза спиртов из альдегидов и кетонов и оптически активных вторичных спиртов из соответствующих простереоизомерных кетоновых субстратов. KRED могут также катализировать обратную реакцию (то есть окисление спиртового субстрата до соответствующего альдегидного/кетонного продукта). Для восстановления кетонов и альдегидов и окисления спиртов под действием KRED требуется кофактор, а чаще всего восстановленный никотинамид-аденин-динуклеотид (NADH) или восстановленный никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат (NADPH) и никотинамид-аденин-динуклеотид (NAD⁺) или никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат (NADP⁺) для реакции окисления. NADH и NADPH служат донорами электронов, а NAD⁺ и NADP⁺ служат акцепторами электронов.

KRED могут присутствовать в бактериях и в дрожжах широкого ряда как известно специалистам в данной области (см., например, Hummel and Kula Eur. J. Biochem., 184:1-13 [1989]). Существует множество сообщений о генах KRED и последовательностях ферментов, включая *Candida magnoliae* (Genbank Acc. No. JC7338; GI: 11360538); *Candida parapsilosis* (Genbank Acc. No. BAA24528.1; GI: 2815409), *Sporobolomyces salmonicolor* (Genbank Acc. No. AF160799; GI: 6539734), *Lactobacillus kefir* (Genbank Acc. No. AAP94029.1; GI: 33112056), *Lactobacillus brevis* (Genbank Acc. No. INXQ_A; GI: 30749782) и *Thermoanaerobium brockii* (Genbank Acc. No. P14941; GI: 1771790).

Стереоселективность кеторедуктаз применялась для получения представляющих интерес элементарных звеньев фармацевтических молекул (см., например, Broussy et al., Org. Lett., 11:305-308).

Было продемонстрировано конкретное применение природных или сконструированных KRED в биокаталитических процессах для получения полезных химических соединений для восстановления сложных эфиров 4-хлорацетоуксусной кислоты (см., например, Zhou, J. Am. Chem. Soc., 105: 5925-5926, Santaniello, J. Chem. Res., (S) 132-133; патент США № 5559030; патент США № 5700670 и патент США № 5891685), восстановления диоксокарбоновых кислот (см., например, патент США № 6399339), восстановления трет-бутил-(S)-хлор-5-гидрокси-3-оксогексаноата (см., например, патент США № 6645746 и WO 01/40450), восстановления соединений на основе пирролотриазина (см., например, публикацию заявки США № 2006/0286646); восстановления замещенных ацетофенонов (см., например, патенты США №№ 6800477 и 8748143); и восстановления кетотиололанов (WO 2005/054491).

Изо- α -кислоты ("изо") существуют в виде сложной смеси цис- и транс-эпимеров. Всего имеется три различных боковых цепи ("R" в изо), обычно обозначаемых как n-, ad- и co- (iBu, sBu и iPr, соответственно). Кроме того, ожидается, что ad-изо (R=s-Bu) существует в виде пары энантиомеров. Каждый из n-, ad- и co-изомеров также присутствует в виде соответствующей цис/транс-изомерной пары, а также потенциально энантиомерной пары, полученной из третичного спирта C4, смежного с восстанавливаемым кетоном. Всего, не считая таутомеров ядра тетроновой кислоты, существует до 16 изомеров изо- α -кислот (4 R, цис/транс и энантиомер).

Обычно, ферменты чрезвычайно избирательны в отношении субстрата, на который они воздействуют. Таким образом, неожиданно было обнаружено, что один фермент или даже простая смесь двух ферментов могут полностью превратить все 16 изомеров изо- α -кислот в соответствующие дигидро-(rho)-изо- α -кислоты. Неожиданно было обнаружено, что способ согласно изобретению может включать превращение изо- α -кислот в дигидро-(rho)-изо- α -кислоты посредством простой смеси фермента(ов) и кофактора. Кроме того, биотрансформация с использованием ферментов (KRED) позволяет получить дигидро-(rho)-изо- α -кислоты из изо- α -кислот, которые должны быть помечены/сертифицированы как "природные".

Настоящее изобретение относится к сконструированным кеторедуктазам, способным восстанавливать любые 16 основных изомеров изо- α -кислот до соответствующих дигидро-(rho)-изо- α -кислот посредством региоселективного восстановления только кетона в изопренильной боковой цепи, смежной с третичным спиртом, как показано на схеме 1.

Схема 1.



Кеторедуктазный полипептид SEQ ID NO: 4 был выбран в качестве исходной основы для разработки ферментов с улучшенными свойствами согласно изобретению. Фермент SEQ ID NO: 4 происходит от кеторедуктазы дикого типа *Lactobacillus kefir* (SEQ ID NO: 2). Полипептид SEQ ID NO: 4 был выбран в качестве исходной основы из-за его высокой активности в превращении изо- α -кислот в соответствующие дигидро-(rho)-изо- α -кислоты, а также его относительной неспецифичности к субстрату и способности к превращению ряда изомеров и эпимеров изогумулону в соответствующие продукты дигидро-(rho)-изо- α -кислоты. Кроме того, полипептид SEQ ID NO: 4 обладает активностью в различных условиях реакции. Было обнаружено, что последовательность дикого типа SEQ ID NO: 2 не обладает детектируемой активностью в превращении изо- α -кислот в соответствующие дигидро-(rho)-изо- α -кислоты.

Сконструированные кеторедуктазные полипептиды согласно изобретению представляют собой кеторедуктазы, сконструированные так, чтобы они обладали улучшенными свойствами по сравнению со сконструированной кеторедуктазой из SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированные кеторедуктазные полипептиды согласно изобретению обладают повышенной активностью превращения изо- α -кислот в соответствующие дигидро-(rho)-изо- α -кислоты по сравнению со сконструированным полипептидом SEQ ID NO: 4. В некоторых других вариантах осуществления изобретения, сконструированные кеторедуктазные полипептиды согласно изобретению обладают повышенной активностью в отношении ряда субстратов изо- α -кислот по сравнению со сконструированным полипептидом SEQ ID NO: 4. В некоторых других вариантах осуществления

изобретения, сконструированные кеторедуктазные полипептиды согласно изобретению обладают повышенной активностью в отношении концентрации ряда субстратов и кофакторов по сравнению со сконструированным полипептидом SEQ ID NO: 4. В некоторых других вариантах осуществления изобретения, сконструированные кеторедуктазные полипептиды согласно изобретению обладают повышенной активностью в отношении высоких концентраций субстратов по сравнению со сконструированным полипептидом SEQ ID NO: 4. В некоторых других вариантах осуществления изобретения, сконструированные кеторедуктазные полипептиды согласно изобретению обладают повышенной активностью в отношении низких концентраций кофактора по сравнению со сконструированным полипептидом SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированные кеторедуктазные полипептиды обладают повышенной активностью в отношении одного или нескольких субстратов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, субстрат содержит смесь изо- α -кислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения, субстрат содержит цис-изогумулон. В некоторых вариантах осуществления изобретения, субстрат содержит транс-изогумулон. В некоторых вариантах осуществления изобретения, субстрат содержит цис-изокогумулон. В некоторых вариантах осуществления изобретения, субстрат содержит транс-изокогумулон. В некоторых вариантах осуществления изобретения, субстрат содержит цис-изоадгумулон. В некоторых вариантах осуществления изобретения, субстрат содержит транс-изоадгумулон.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированные кеторедуктазные полипептиды обладают повышенной активностью в отношении одного или нескольких субстратов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированные кеторедуктазные полипептиды обладают повышенной активностью в отношении смеси изо- α -кислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированные кеторедуктазные полипептиды обладают повышенной активностью в отношении цис-изогумулона. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированные кеторедуктазные полипептиды обладают повышенной активностью в отношении транс-изогумулона. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированные кеторедуктазные полипептиды обладают повышенной активностью в отношении цис-изокогумулона. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированные кеторедуктазные полипептиды обладают повышенной активностью в отношении транс-изокогумулона. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированные кеторедуктазные полипептиды обладают повышенной активностью в отношении цис-изоадгумулона. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированные кеторедуктазные полипептиды обладают повышенной активностью в отношении транс-изоадгумулона.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированные кеторедуктазные полипептиды превращают соединения-субстраты в соединения-продукты в присутствии системы рециркуляции кофакторов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, система рециркуляции кофактора негативно влияет на второй фермент, такой как глюкозодегидрогеназа. В некоторых вариантах осуществления изобретения, система рециркуляции кофактора содержит изопропанол.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированные кеторедуктазные полипептиды способны превращать соединения-субстраты в соединения-продукты с активностью, которая по меньшей мере приблизительно в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или 100 раз превышает активность эталонных полипептидов SEQ ID NO: 4, 6, 80, 104, 172, 186, 194, 252, 270, 272, 286, 328 и/или 330 в подходящих условиях проведения реакции. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированные кеторедуктазные полипептиды способны превращать соединения-субстраты в соединения-продукты с процентом превращения по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80% или по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99%, при времени реакции приблизительно 48 ч., приблизительно 36 ч., приблизительно 24 ч. или даже за меньший период времени при подходящих условиях проведения реакции.

Подходящие условия реакции могут включать комбинацию параметров реакции, которые обеспечивают биокаталитическое превращение соединений-субстратов в соответствующие соединения-продукты. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления такого способа, комбинация параметров реакции включает: (a) приблизительно от 0,1 до 220 г/л соединения(й) субстрата; (b) приблизительно от 0,5 до 50 г/л сконструированного полипептида; (c) приблизительно от 0,01 до 10 г/л NADP^+ приблизительно в 10-60% изопропанола; (d) приблизительно от 5 до 200 мМ триэтанолamina* H_2SO_4 ; (e) приблизительно от 0 до 5 мМ MgSO_4 или MgCl_2 ; (f) температуру приблизительно от 25°C до 60°C; и (g) pH от 6 до 10. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления такого способа, комбинация параметров реакции включает: (a) приблизительно от 10 до 220 г/л соединения(й) субстрата; (b) приблизительно от 0,5 до 50 г/л сконструированного полипептида;

(с) приблизительно от 0,01 до 10 г/л NADP^+ приблизительно в 10-60% изопропанола; (d) приблизительно от 5 до 200 мМ фосфата калия или натрия; (е) приблизительно от 0 до 5 мМ MgSO_4 или MgCl_2 ; (f) температуру приблизительно от 25°C до 60°C; и (g) pH от 6 до 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, комбинация параметров реакции включает: (а) приблизительно 80 г/л соединения субстрата; (b) приблизительно 20 г/л сконструированного полипептида; (с) приблизительно 0,01 г/л NADP^+ в 40% изопропанола; (d) приблизительно 100 мМ триэтанолamina* H_2SO_4 ; (е) приблизительно 2 мМ MgSO_4 ; (f) температуру приблизительно 40°C; и (g) pH приблизительно 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения, комбинация параметров реакции включает: (а) приблизительно 160 г/л соединений субстрата; (b) приблизительно 20 г/л сконструированного полипептида; (с) приблизительно 0,01 г/л NADP^+ в 40% изопропанола; (d) приблизительно 100 мМ фосфата калия; (е) приблизительно 2 мМ MgSO_4 ; (f) температуру приблизительно 40°C; и (g) pH приблизительно 8.

Дополнительные иллюстративные условия проведения реакции включают условия проведения анализа, описанные в примерах.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированные кеторедуктазные ферменты с улучшенными свойствами содержат делеции аминокислотных остатков, введенные в природные кеторедуктазные полипептиды или делеции аминокислотных остатков, введенные в другие сконструированные кеторедуктазные полипептиды. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, делеции включают одну или более аминокислот, 2 или более аминокислот, 3 или более аминокислот, 4 или более аминокислот, 5 или более аминокислот, 6 или более аминокислот, 8 или более аминокислот, 10 или более аминокислот, 15 или более аминокислот или 20 или более аминокислот, до 10% от общего количества аминокислот, до 20% от общего количества аминокислот или до 30% от общего количества аминокислот кеторедуктазных полипептидов при условии, что будет сохраняться функциональная активность кеторедуктазы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, делеции могут включать 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-11, 1-12, 1-14, 1-15, 1-16, 1-18, 1-20, 1-22, 1-24, 1-25, 1-30, 1-35 или приблизительно 1-40 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления изобретения, количество делеций может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 30, 35 или приблизительно 40 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения, делеции могут включать делеции 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18 или 20 аминокислотных остатков.

Как описано в настоящей заявке, кеторедуктазные полипептиды согласно изобретению могут быть получены в форме слитых полипептидов, в которых кеторедуктазы связаны с другими полипептидами, такими как метки антител (например, мус-эпитоп) или последовательности для очистки (например, метки His). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, кеторедуктазные полипептиды находят свое применение в форме полипептидов, связанных с другими полипептидами или не связанных с ними.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептиды, описанные в настоящей заявке, не ограничиваются генетически кодируемыми аминокислотами. В дополнение к генетически кодируемым аминокислотам, полипептиды, описанные в настоящей заявке, могут полностью или частично состоять из природных и/или синтетических не кодируемых аминокислот. Некоторые часто встречающиеся не кодируемые аминокислоты, из которых могут состоять описанные здесь полипептиды, включают, но не ограничиваются ими: D-стереомеры генетически кодируемых аминокислот; 2,3-диаминопропионовую кислоту (Dpr); α -аминоизомасляную кислоту (Aib); ϵ -аминогексановую кислоту (Aha); δ -аминовалериановую кислоту (Ava); N-метилглицин или саркозин (MeGly или Sar); орнитин (Orn); цитруллин (Cit); трет-бутилаланин (Bua); трет-бутилглицин (Bug); N-метилизолейцин (MeIle); фенилглицин (Phg); циклогексилаланин (Cha); норлейцин (Nle); нафтилаланин (Nal); 2-хлорфенилаланин (Ocf); 3-хлорфенилаланин (Mcf); 4-хлорфенилаланин (Pcf); 2-фторфенилаланин (Off); 3-фторфенилаланин (Mff); 4-фторфенилаланин (Pff); 2-бромфенилаланин (Obf); 3-бромфенилаланин (Mbf); 4-бромфенилаланин (Pbf); 2-метилфенилаланин (Omf); 3-метилфенилаланин (Mmf); 4-метилфенилаланин (Pmf); 2-нитрофенилаланин (Onf); 3-нитрофенилаланин (Mnf); 4-нитрофенилаланин (Pnf); 2-цианофенилаланин (Ocf); 3-цианофенилаланин (Mcf); 4-цианофенилаланин (Pcf); 2-трифторметилфенилаланин (Otf); 3-трифторметилфенилаланин (Mtf); 4-трифторметилфенилаланин (Ptf); 4-аминофенилаланин (Paf); 4-йодофенилаланин (Pif); 4-аминометилфенилаланин (Pamf); 2,4-дихлорфенилаланин (Opef); 3,4-дихлорфенилаланин (Mpcf); 2,4-дифторфенилаланин (Opff); 3,4-дифторфенилаланин (Mpf); пирид-2-илаланин (2pAla); пирид-3-илаланин (3pAla); пирид-4-илаланин (4pAla); нафт-1-илаланин (1nAla); нафт-2-илаланин (2nAla); тиазолилаланин (taAla); бензотиенилаланин (bAla); тиенилаланин (tAla); фурилаланин (fAla); гомофенилаланин (hPhe); гомотирозин (hTyr); гомотриптофан (hTrp); пентафторфенилаланин (5ff); стирилкаланин (sAla); аутрилаланин (aAla); 3,3-дифенилаланин (Dfa); 3-амино-5-фенилпентановую кислоту (Afp); пеницилламин (Pen); 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновую кислоту (Tic); β -2-тиенилаланин (Thi); сульфоксид метионина (Mso); N(w)-нитроаргинин (nArg); гомолизин (hLys); фосфонOMETИЛфенилаланин (pmPhe); фосфосерин (pSer); фосфотреонин (pThr); гомоаспарагиновую кислоту (hAsp); гомоглутаминовую кислоту (hGlu); 1-

аминоциклопент-(2 или 3)-ен-4-карбоновую кислоту; пипеколиновую кислоту (PA), азетидин-3-карбоновую кислоту (ACA); 1-аминоциклопентан-3-карбоновую кислоту; аллилглицин (aOly); пропаргилглицин (pgGly); гомоаланин (hAla); норвалин (nVal); гомолейцин (hLeu), гомовалин (hVal); гомоизолейцин (hIle); гомоаргинин (hArg); N-ацетиллизин (AcLys); 2,4-диаминомасляную кислоту (Dbu); 2,3-диаминомасляную кислоту (Dab); N-метилвалин (MeVal); гомоцистеин (hCys); гомосерин (hSer); гидроксипролин (Hyp) и гомопролин (hPro). Дополнительные некодируемые аминокислоты, из которых могут состоять описанные здесь полипептиды, известны специалистам в данной области. Эти аминокислоты могут присутствовать в L-конфигурации или в D-конфигурации.

Специалистам в данной области будет очевидно, что аминокислоты или остатки, несущие защитные группы боковой цепи, также могут включать описанные здесь полипептиды. Неограничивающие примеры таких защищенных аминокислот, которые в данном случае относятся к ароматической группе, включают (защитные группы указаны в скобках), но не ограничиваются ими: Arg(tos), Cys(метилбензил), Cys(нитропиридинсульфенил), Glu(δ -бензиловый эфир), Gln(ксантил), Asn(N- δ -ксантил), His(bom), His(бензил), His(tos), Lys(fmoc), Lys(tos), Ser(O-бензил), Thr(O-бензил) и Tyr(O-бензил).

Конформационно стерические некодирующие аминокислоты, из которых могут состоять описанные здесь полипептиды, включают, но не ограничиваются ими, N-метиламинокислоты (в L-конфигурации); 1-аминоциклопент-(2 или 3)-ен-4-карбоновую кислоту; пипеколиновую кислоту; азетидин-3-карбоновую кислоту; гомопролин (hPro); и 1-аминоциклопентан-3-карбоновую кислоту.

Как описано выше, различные модификации, введенные в природный полипептид для создания сконструированного кеторедуктазного фермента, могут быть нацелены на конкретное свойство фермента.

Полинуклеотиды, кодирующие сконструированные ферменты

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим сконструированную кеторедуктазу. Полинуклеотиды могут быть функционально связаны с одной или несколькими гетерологичными регуляторными последовательностями, которые регулируют экспрессию гена с образованием рекомбинантного полинуклеотида, способного экспрессировать полипептид. Экспрессионные конструкции, содержащие гетерологичный полинуклеотид, кодирующий сконструированную кеторедуктазу, могут быть введены в соответствующие клетки-хозяева для экспрессии соответствующего кеторедуктазного полипептида.

Благодаря информации о кодонах, соответствующих различным аминокислотам, доступность белковой последовательности позволяет выявить все полинуклеотиды, способных кодировать последовательность белка у индивидуума. Вырожденность генетического кода, при которой одни и те же аминокислоты кодируются альтернативными или синонимичными кодонами, позволяет получить чрезвычайно большое количество нуклеиновых кислот, каждая из которых кодирует описанные здесь кеторедуктазные ферменты с улучшенными свойствами. Таким образом, после идентификации конкретной аминокислотной последовательности, специалисты в данной области могут получить любое количество различных нуклеиновых кислот путем простой модификации последовательности одного или более кодонов так, чтобы не изменялась аминокислотная последовательность белка. В соответствии с этим, в настоящем изобретении конкретно рассматривается каждый и все возможные варианты полинуклеотидов, которые могут быть получены путем выбора комбинаций на основе возможного выбора кодонов, и все такие варианты следует рассматривать как варианты, специально раскрытые для любого описанного здесь полипептида, включая аминокислотные последовательности, представленные в таблицах в разделе "Примеры". В различных вариантах осуществления изобретения, кодоны предпочтительно выбирают так, чтобы они соответствовали клетке-хозяину, в которой продуцируется белок. Так, например, предпочтительные кодоны, присутствующие в бактериях, используют для экспрессии гена в бактериях; предпочтительные кодоны, присутствующие в дрожжах, используют для экспрессии в дрожжах; а предпочтительные кодоны, присутствующие у млекопитающих, используют для экспрессии в клетках млекопитающих.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую природную аминокислотную последовательность кеторедуктазного полипептида, представленную SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид имеет последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательностям нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 3, 5, 79, 103, 171, 185, 193, 251, 269, 271, 285, 327 и/или 329, каждая из которых кодирует идентичные полипептидные последовательности SEQ ID NO: 4, 6, 80, 104, 172, 186, 194, 252, 270, 272, 286, 328 и/или 330, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид фермента кодирует сконструированный полипептид, обладающий ферментативной активностью со свойствами, раскрытыми в настоящей заявке, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична эталонной последовательности, выбранной из SEQ ID NO,

представленных в настоящей заявке, или аминокислотную последовательность любого варианта (например, последовательности, которые представлены в примерах), и одно или более отличий остатков по сравнению с эталонным(и) полинуклеотидом(ами), или аминокислотную последовательность любого варианта, раскрытого в примерах (например, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более положениях аминокислотных остатков). В некоторых вариантах осуществления изобретения, эталонная полипептидная последовательность выбрана из SEQ ID NO: 4, 6, 80, 104, 172, 186, 194, 252, 270, 272, 286, 328 и/или 330.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид, кодирующий сконструированную кеторедуктазу, содержит полинуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 3, 5, 79, 103, 171, 185, 193, 251, 269, 271, 285, 327 и/или 329. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид, кодирующий сконструированную кеторедуктазу, содержит SEQ ID NO: 5, 79, 103, 171, 185, 193, 251, 269, 271, 285, 327 и/или 329. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид, кодирующий сконструированную кеторедуктазу, содержит полинуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 5-411. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид, кодирующий сконструированную кеторедуктазу, содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 5-411.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированные последовательности кеторедуктазы содержат последовательности, которые включают положения, идентифицированные как предпочтительные, как описано в примерах.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, выделенные полинуклеотиды, кодирующие кеторедуктазу с улучшенными свойствами, обрабатывают различными способами для обеспечения улучшенной экспрессии и/или продуцирования полипептидов. Манипуляции с выделенным полинуклеотидом перед его встраиванием в вектор могут быть желательны или необходимы в зависимости от используемого экспрессионного вектора. Методы модификации полинуклеотидов и последовательностей нуклеиновых кислот с применением методов рекомбинантных ДНК хорошо известны специалистам в данной области.

Для бактериальных клеток-хозяев, подходящими промоторами для регуляции транскрипции конструкций нуклеиновых кислот согласно изобретению являются промоторы, полученные из *lac*-оперона *E. coli*, гена агаразы *Streptomyces coelicolor* (*dagA*), гена левансахаразы *Bacillus subtilis* (*sacB*), гена альфа-амилазы *Bacillus licheniformis* (*amyL*), гена мальтогенной амилазы *Bacillus stearothermophilus* (*amyM*), гена альфа-амилазы *Bacillus amyloliquefaciens* (*amyQ*), гена пенициллиназы *Bacillus licheniformis* (*penP*), генов *xylA* и *xylB* *Bacillus subtilis* и гена прокариотической бета-лактамазы (см. например, Villa-Komaroff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3727-3731 [1978]), а также промотор *tac* (см., например, DeBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21-25 [1983]). Дополнительные подходящие промоторы известны специалистам в данной области.

Для клеток-хозяев нитчатых грибов, подходящими промоторами для регуляции транскрипции конструкций нуклеиновых кислот согласно изобретению являются промоторы, полученные из генов амилазы ТАКА *Aspergillus oryzae*, аспарагин-протеиназы *Rhizomucor miehei*, нейтральной альфа-амилазы *Aspergillus niger*, стабильной кислой альфа-амилазы *Aspergillus niger*, глюкоамилазы (*glaA*) *Aspergillus niger* или *Aspergillus awamori*, липазы *Rhizomucor miehei*, щелочной протеазы *Aspergillus oryzae*, триозофосфатизомеразы *Aspergillus oryzae*, ацетамидазы *Aspergillus nidulans* и трипсиноподобной протеазы *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), а также промотор NA2-*trp* (гибрид промоторов генов нейтральной альфа-амилазы *Aspergillus niger* и триозофосфатизомеразы *Aspergillus oryzae*), и их мутантные, усеченные и гибридные промоторы.

В дрожжевом хозяине, подходящими промоторами являются, но не ограничиваются ими, промоторы генов энлазы *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), галактокиназы *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), алкогольдегидрогеназы/глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP) и 3-фосфоглицераткиназы *Saccharomyces cerevisiae*, а также другие промоторы, подходящие для дрожжевых клеток-хозяев (см., например, Romanos et al., Yeast 8:423-488 [1992]).

Регуляторная последовательность может также представлять собой подходящую последовательность терминатора транскрипции, последовательность, распознаваемую клеткой-хозяином для терминации транскрипции. Последовательность терминатора функционально связана с 3'-концом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. Любой терминатор, функционирующий в выбранной клетке-хозяине, может быть использован в настоящем изобретении.

Так, например, типичные терминаторы транскрипции для клеток-хозяев нитчатых грибов могут быть получены из генов амилазы ТАКА *Aspergillus oryzae*, глюкоамилазы *Aspergillus niger*, антранилатсинтазы *Aspergillus nidulans*, альфа-глюкозидазы *Aspergillus niger* и трипсиноподобной протеазы *Fusarium oxysporum*.

Типичные терминаторы для дрожжевых клеток-хозяев могут быть получены из генов энлазы *Saccharomyces cerevisiae*, цитохрома С (CYC1) *Saccharomyces cerevisiae* и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *Saccharomyces cerevisiae*, а также могут быть использованы и другие подходящие терминаторы для дрожжевых клеток-хозяев, известные специалистам в данной области (см., например, Romanos et al., см. выше).

Регуляторная последовательность может также представлять собой подходящую лидерную последовательность, нетранслируемую область мРНК, играющую важную роль в трансляции клеткой-хозяином. Лидерная последовательность функционально связана с 5'-концом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. При этом, может быть использована любая лидерная последовательность, которая является функциональной в выбранной клетке-хозяине. Примерами лидерных последовательностей для клеток-хозяев нитчатых грибов являются лидерные последовательности, выделенные из генов амилазы ТАКА *Aspergillus oryzae* и триозофосфатизомеразы *Aspergillus nidulans*. Подходящие лидерные последовательности для дрожжевых клеток-хозяев получают из генов энлазы *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), 3-фосфоглицераткиназы *Saccharomyces cerevisiae*, альфа-фактора *Saccharomyces cerevisiae* и алкогольдегидрогеназы/глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).

Регуляторная последовательность может также представлять собой последовательность полиаденилирования, последовательность, функционально связанную с 3'-концом последовательности нуклеиновой кислоты, которая при транскрипции распознается клеткой-хозяином как сигнал для присоединения остатков полиаденозина к транскрибируемой мРНК. Любая последовательность полиаденилирования, которая является функциональной в выбранной клетке-хозяине, может быть использована в настоящем изобретении. Типичные последовательности полиаденилирования для клеток-хозяев нитчатых грибов могут происходить от генов амилазы ТАКА *Aspergillus oryzae*, глюкоамилазы *Aspergillus niger*, антранилатсинтазы *Aspergillus nidulans*, трипсиноподобной протеазы *Fusarium oxysporum* и альфа-глюкозидазы *Aspergillus niger*, а также могут быть использованы и другие подходящие последовательности полиаденилирования для дрожжевых клеток-хозяев, известные специалистам в данной области (см., например, Guo et al., *Mol. Cell. Biol.*, 15:5983-5990).

Регуляторная последовательность может также представлять собой область, кодирующую сигнальный пептид, которая кодирует аминокислотную последовательность, связанную с амино-концом полипептида, и направляет кодируемый полипептид в секреторный путь клетки. 5'-конец кодирующей последовательности нуклеиновой кислоты может по своей природе содержать область, кодирующую сигнальный пептид, которая по своей природе связана с сегментом кодирующей области, которая кодирует секреторируемый полипептид с сохранением трансляционной рамки считывания. Альтернативно, 5'-конец кодирующей последовательности может содержать область, кодирующую сигнальный пептид, которая является чужеродной для этой кодирующей последовательности. Чужеродная область, кодирующая сигнальный пептид, может потребоваться в том случае, если кодирующая последовательность по своей природе не содержит область, кодирующую сигнальный пептид.

Альтернативно, чужеродная область, кодирующая сигнальный пептид, может просто заменять природную область, кодирующую сигнальный пептид, для усиления секреции полипептида. Однако, в настоящем изобретении может быть использована любая область, кодирующая сигнальный пептид, которая направляет экспрессируемый полипептид на секреторный путь выбранной клетки-хозяина.

Области, кодирующие сигнальный пептид и эффективные для бактериальных клеток-хозяев, представляют собой области, кодирующие сигнальный пептид и полученные из генов мальтогенной амилазы *Bacillus* NCIB 11837, альфа-амилазы *Bacillus stearothermophilus*, субтилизина *Bacillus licheniformis*, бета-лактамазы *Bacillus licheniformis*, нейтральных протеаз *Bacillus stearothermophilus* (nprT, nprS), nprM) и prsA *Bacillus subtilis*, а также дополнительные области, кодирующие сигнальные пептиды и известные специалистам в данной области (см., например, Simonen et al., *Microbiol. Rev.*, 57: 109-137).

Области, кодирующие сигнальный пептид и эффективные для клеток-хозяев нитчатых грибов, включают, но не ограничиваются ими, области, кодирующие сигнальный пептид и полученные из генов амилазы ТАКА *Aspergillus oryzae*, нейтральной амилазы *Aspergillus niger*, глюкоамилазы *Aspergillus niger*, аспарагин-протеиназы *Rhizomucor miehei*, целлюлазы *Humicola insolens* и липазы *Humicola lanuginosa*. Подходящие сигнальные пептиды для дрожжевых клеток-хозяев могут происходить от генов альфа-фактора *Saccharomyces cerevisiae* и инвертазы *Saccharomyces cerevisiae*, а также от дополнительных подходящих областей, кодирующих сигнальный пептид (см., например, Romanos et al., 1992, см. выше).

Регуляторная последовательность может также представлять собой область, кодирующую пропептид, которая кодирует аминокислотную последовательность, расположенную на амино-конце полипептида. Полученный полипептид известен как профермент или прополипептид (или в некоторых случаях, зимоген). Пропептид обычно является неактивным и может быть превращен в зрелый активный полипептид путем каталитического или аутокаталитического отщепления пропептида от прополипептида. Область, кодирующая пропептид, может быть получена из генов щелочной протеазы *Bacillus subtilis* (aprE), нейтральной протеазы *Bacillus subtilis* (nprT), альфа-фактора *Saccharomyces*

cerevisiae, аспарагин-протеиназы *Rhizomucor miehei* и лактазы *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836).

Если области сигнального пептида и пропептида присутствуют на amino-конце полипептида, то область пропептида расположена рядом с amino-концом полипептида, а область сигнального пептида расположена рядом с amino-концом области пропептида.

Также может оказаться желательным присоединение регуляторных последовательностей, которые позволяют регулировать экспрессию полипептида в отношении роста клетки-хозяина. Примерами регуляторных систем являются системы, которые вызывают включение или выключение экспрессии гена в ответ на химический или физический раздражитель, включая присутствие регуляторного соединения. В прокариотических клетках-хозяевах, подходящие регуляторные последовательности включают операторные системы *lac*, *tac* и *trp*. В дрожжевых клетках-хозяевах, подходящие регуляторные системы включают, например, систему *ADH2* или систему *GAL1*. В нитчатых грибах, подходящие регуляторные последовательности включают промотор альфа-амилазы *TAKA*, промотор глюкоамилазы *Aspergillus niger* и промотор глюкоамилазы *Aspergillus oryzae*.

Другими примерами регуляторных последовательностей являются последовательности, которые обеспечивают амплификацию генов. В эукариотических системах, к ним относятся ген дигидрофолатредуктазы, который амплифицируется в присутствии метотрексата, и гены металлотioneина, которые амплифицируются в присутствии тяжелых металлов. В этих случаях, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид *KRED* согласно изобретению, должна быть функционально связана с регуляторной последовательностью.

Таким образом, в некоторых своих вариантах, настоящее изобретение также относится к рекомбинантному экспрессионному вектору, содержащему полинуклеотид, кодирующий сконструированный кеторедуктазный полипептид или его вариант, и одну или несколько областей, регулирующих экспрессию, таких как промотор и терминатор, ориджин репликации и т.п., в зависимости от типа хозяев, в которые они должны быть введены. Различные последовательности нуклеиновой кислоты и регуляторные последовательности, описанные выше, могут быть объединены вместе для получения рекомбинантного экспрессионного вектора, который может включать один или несколько подходящих рестрикционных сайтов для обеспечения встраивания или замены последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, в таких сайтах. Альтернативно, последовательность нуклеиновой кислоты согласно изобретению может быть экспрессирована путем встраивания последовательности нуклеиновой кислоты или конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей эту последовательность, в подходящий вектор для экспрессии. При создании экспрессионного вектора, кодирующую последовательность помещают в вектор так, чтобы кодирующая последовательность была функционально связана с соответствующими последовательностями регуляции экспрессии.

Рекомбинантный экспрессионный вектор может представлять собой любой вектор (например, плазмиду или вирус), который может быть легко подвергнут обработке в соответствии с методами рекомбинантных ДНК, и который может стимулировать экспрессию полинуклеотидной последовательности. Выбор вектора обычно зависит от совместимости вектора с клеткой-хозяином, в которую должен быть введен этот вектор. Векторы могут представлять собой линейные или замкнутые кольцевые плазмиды.

Экспрессионный вектор может представлять собой автономно реплицирующийся вектор (то есть вектор, который существует как внехромосомный элемент), репликация которого не зависит от репликации в хромосоме (например, в плазмиде, внехромосомном элементе, минихромосоме или в искусственной хромосоме). Вектор может содержать любые средства для обеспечения ауторепликации. Альтернативно, вектор может представлять собой вектор, который при его введении в клетку-хозяина интегрируется в геном и реплицируется вместе с хромосомой(ами), в которую он был интегрирован. Кроме того, могут быть использованы отдельный вектор или отдельная плаزمиды или два или более векторов или плазмид, которые вместе содержат всю ДНК для введения в геном клетки-хозяина, или транспозон.

Экспрессионный вектор согласно изобретению предпочтительно содержит один или несколько селективных маркеров, которые облегчают отбор трансформированных клеток. Селективный маркер может представлять собой ген, продукт которого обеспечивает устойчивость к биоцидам или вирусам, устойчивость к тяжелым металлам, прототрофность к ауксотрофам и т.п. Примерами бактериальных селективных маркеров являются гены *dal* от *Bacillus subtilis* или *Bacillus licheniformis*, или маркеры, которые сообщают резистентность к антибиотикам, например, резистентность к ампициллину, канамицину, хлорамфениколу или тетрациклину. Подходящими маркерами для дрожжевых клеток-хозяев являются *ADE2*, *HIS3*, *LEU2*, *LYS2*, *MET3*, *TRP1* и *URA3*.

Селективные маркеры для использования в клетке-хозяине нитчатых грибов включают, но не ограничиваются ими, *amdS* (ацетамидазу), *argB* (орнитинкарбамоилтрансферазу), *bar* (фосфинотрицинацетилтрансферазу), *hph* (гигромицинофосфотрансферазу), *niaD* (нитратредуктазу), *rugG* (оротидин-5'-фосфатдекарбоксилазу), *sC* (сульфатаденилтрансферазу) и *trpC* (антранилатсинтазу), а также их эквиваленты. Варианты для использования в клетке *Aspergillus* включают гены *amdS* и *rugG* *Aspergillus nidulans* или *Aspergillus oryzae* и ген *bar* *Streptomyces hygrosopicus*.

Экспрессионные векторы согласно изобретению могут содержать элемент(ы), который(е) обеспечивает(ют) интеграцию вектора в геном клетки-хозяина или автономную репликацию вектора в клетке независимо от генома. Для интеграции в геном клетки-хозяина, вектор может быть получен на основе последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, или любого другого элемента для интеграции вектора в геном посредством гомологичной или негомологичной рекомбинации.

Альтернативно, экспрессионный вектор может содержать дополнительные последовательности нуклеиновых кислот для регуляции интеграции посредством гомологичной рекомбинации в геном клетки-хозяина. Дополнительные последовательности нуклеиновых кислот позволяют интегрировать вектор в геном клетки-хозяина в конкретном(ых) участке(ах) в хромосоме(ах). Для повышения вероятности интеграции в конкретном участке, элементы интеграции предпочтительно должны содержать достаточное количество нуклеиновых кислот, например, от 100 до 10000 пар оснований, предпочтительно от 400 до 10000 пар оснований, а наиболее предпочтительно от 800 до 10000 пар оснований, которые в высокой степени гомологичны соответствующей последовательности-мишени для повышения вероятности гомологичной рекомбинации. Элементами интеграции могут быть любые последовательности, гомологичные целевой последовательности в геноме клетки-хозяина. Кроме того, элементы интеграции могут представлять собой некодирующие или кодирующие последовательности нуклеиновых кислот. С другой стороны, вектор может быть интегрирован в геном клетки-хозяина посредством негомологичной рекомбинации.

Для автономной репликации, вектор может дополнительно содержать ориджин репликации, позволяющий вектору автономно реплицироваться в рассматриваемой клетке-хозяине. Примерами бактериальных ориджинов репликации являются P15A ori или ориджины репликации плазмид pBR322, pUC19, pACYC177 (которая имеет P15A ori) или pACYC184, допускающие репликацию в *E. coli*, и pUB110, pE194, pTA1060 или pAM β 1, допускающие репликацию в *Bacillus*. Примерами ориджинов репликации для использования в дрожжевой клетке-хозяине являются 2-микронные ориджины репликации, ARS1, ARS4, комбинация ARS1 и CEN3 и комбинация ARS4 и CEN6. Ориджином репликации может быть ориджин, имеющий мутацию, которая делает его термочувствительным в клетке-хозяине (см., например, Ehrlich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1433 [1978]).

Более, чем одна копия последовательности нуклеиновой кислоты согласно изобретению может быть встроена в клетку-хозяина для повышения уровня продуцирования продукта гена. Увеличение количества копий последовательности нуклеиновой кислоты может быть достигнуто путем интеграции по меньшей мере одной дополнительной копии последовательности в геном клетки-хозяина или путем включения гена амплифицируемого селективного маркера в последовательность нуклеиновой кислоты, где клетки, содержащие амплифицированные копии селективного маркерного гена и, таким образом, дополнительные копии последовательности нуклеиновой кислоты, могут быть отобраны путем культивирования клеток в присутствии соответствующего селективного агента.

При этом, не предусматривается, что настоящее изобретение ограничивается раскрытыми здесь экспрессионными векторами. Специалистам в данной области будет очевидно, что в настоящем изобретении может быть использован любой подходящий экспрессионный вектор. Многие экспрессионные векторы для их использования в настоящем изобретении имеются в продаже. Подходящие коммерчески доступные экспрессионные векторы включают, но не ограничиваются ими, экспрессионные векторы p3xFLAGTMTM (Sigma-Aldrich), которые включают промотор CMV и сайт полиаденилирования hGH для экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающих, а также маркеры ориджина репликации pBR322 и маркеры резистентности к ампициллину для амплификации в клетках *E. coli*. Другие коммерчески доступные подходящие экспрессионные векторы включают, но не ограничиваются ими, векторы pBluescriptII SK(-) и pBK-CMV (Stratagene) и плазмиды, полученные из pBR322 (Gibco BRL), pUC (Gibco BRL), pREP4, pCEP4 (Invitrogen) или pPoly (см. Lathe et al., Gene 57:193-201).

Клетки-хозяева для экспрессии сконструированных полипептидов

Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей полинуклеотид, кодирующий кеторедуктазный полипептид с улучшенными свойствами согласно изобретению, где полинуклеотид функционально связан с одной или несколькими регуляторными последовательностями для экспрессии кеторедуктазного фермента в клетке-хозяине. Клетки-хозяева для экспрессии полипептидов KRED, кодируемых экспрессионными векторами согласно изобретению, хорошо известны специалистам в данной области и включают, но не ограничиваются ими, бактериальные клетки, такие как клетки *E. coli*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus minor*, *Streptomyces* и *Salmonella typhimurium*; клетки грибов, такие как дрожжевые клетки (например, *Saccharomyces cerevisiae* или *Pichia pastoris* (номер доступа ATCC 201178)); клетки насекомых, такие как клетки *Drosophila S2* и *Spodoptera Sf9*; клетки животных, такие как CHO, COS, BHK, 293 и клетки меланомы Боуэса; и клетки растений. Подходящие культуральные среды и условия роста для вышеописанных клеток-хозяев хорошо известны специалистам в данной области.

Полинуклеотиды для экспрессии кеторедуктазы могут быть введены в клетки различными

известными способами. Такие способы включают, но не ограничиваются ими, электропорацию, бомбардировку биобаллистическими частицами, трансфекцию, опосредованную липосомами, трансфекцию хлоридом кальция и слияние протопластов. Специалисту в данной области известны различные способы введения полинуклеотидов в клетки.

Escherichia coli W3110 представляет собой штамм-хозяин, который может быть использован в настоящем изобретении, хотя настоящее изобретение не ограничивается этим конкретным штаммом-хозяином. Экспрессионный вектор был создан путем функционального связывания полинуклеотида, кодирующего фермент с улучшенными свойствами, с получением плазмиды pCK110900, функционально связанной с промотором *lac* под контролем репрессора *lacI*. Экспрессионный вектор также содержит ориджин репликации P15a и ген резистентности к хлорамфениколу. Клетки *Escherichia coli* W3110, содержащие рассматриваемый полинуклеотид, могут быть выделены путем отбора клеток на резистентность к хлорамфениколу.

Способы получения сконструированных кеторедуктазных полипептидов

В некоторых вариантах осуществления изобретения, для получения полинуклеотидов и полипептидов KRED согласно изобретению с улучшенными свойствами, природный кеторедуктазный фермент, который катализирует реакцию восстановления, получают (или он происходит) от *Lactobacillus kefir*. В некоторых вариантах осуществления изобретения, исходная полинуклеотидная последовательность была оптимизирована по кодомам для усиления экспрессии кеторедуктазы в указанной клетке-хозяине. В качестве иллюстрации, исходная полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид KRED дикого типа *Lactobacillus kefir*, был сконструирован из олигонуклеотидов, полученных на основе известной полипептидной последовательности KRED *Lactobacillus kefir*, доступной в базе данных Genbank. Исходную полинуклеотидную последовательность оптимизировали по кодомам для экспрессии в *E. coli*, и полинуклеотид с оптимизированными кодомами клонировали в экспрессионный вектор путем помещения гена кеторедуктазы для экспрессии под контролем промотора *lac* и гена-репрессора *lacI*. Были идентифицированы клоны, экспрессирующие активную кеторедуктазу в *E. coli*, и были секвенированы гены для подтверждения их идентичности.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированные кеторедуктазы получают путем мутагенеза полинуклеотида, кодирующего природную кеторедуктазу и/или методами направленной эволюции, как обсуждалось выше. Мутагенез может быть осуществлен в соответствии с любым из методов, известных специалистам в данной области, включая неспецифический и сайт-специфический мутагенез. Направленная эволюция может быть осуществлена любым из методов, известных специалистам в данной области, для скрининга вариантов промотора с улучшенными свойствами, включая перестановку. Мутагенез и направленные методы эволюции хорошо известны специалистам в данной области (см. например, патенты США № 5605793, 5811238, 5830721, 5834252, 5837458, 5928905, 6096548, 6117679, 6132970, 6165793, 6180406, 6251674, 6265201, 6277638, 6287861, 6287862, 6291242, 6297053, 6303344, 6309883, 6319713, 6319714, 6323030, 6326204, 6335160, 6335198, 6344356, 6352859, 6355484, 6358740, 6358742, 6365377, 6365408, 6368861, 6372497, 6337186, 6376246, 6379964, 6387702, 6391552, 6391640, 6395547, 6406855, 6406910, 6413745, 6413774, 6420175, 6423542, 6426224, 6436675, 6444468, 6455253, 6479652, 6482647, 6483011, 6484105, 6489146, 6500617, 6500639, 6506602, 6506603, 6518065, 6519065, 6521453, 6528311, 6537746, 6573098, 6576467, 6579678, 6586182, 6602986, 6605430, 6613514, 6653072, 6686515, 6703240, 6716631, 6825001, 6902922, 6917882, 6946296, 6961664, 6995017, 7024312, 7058515, 7105297, 7148054, 7220566, 7288375, 7384387, 7421347, 7430477, 7462469, 7534564, 7620500, 7620502, 7629170, 7702464, 7747391, 7747393, 7751986, 7776598, 7783428, 7795030, 7853410, 7868138, 7783428, 7873477, 7873499, 7904249, 7957912, 7981614, 8014961, 8029988, 8048674, 8058001, 8076138, 8108150, 8170806, 8224580, 8377681, 8383346, 8457903, 8504498, 8589085, 8762066, 8768871, 9593326, и все родственные публикации, опубликованные не американскими коллегами; Ling et al., *Anal. Biochem.*, 254(2):157-78; Dale et al., *Meth. Mol. Biol.*, 57:369-74; Smith, *Ann. Rev. Genet.*, 19:423-462; Botstein et al., *Science*, 229:1193-1201; Carter, *Biochem. J.*, 237:1-7; Kramer et al., *Cell*, 38:879-887; Wells et al., *Gene*, 34:315-323; Minshull et al., *Curr. Op. Chem. Biol.*, 3: 284-290; Christians et al., *Nat. Biotechnol.*, 17: 259-264; Cramer et al., *Nature*, 391: 288-291; Cramer et al., *Nat. Biotechnol.*, 15:436-438; Zhang et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 94:4504-4509; Cramer et al., *Nat. Biotechnol.*, 14:315-319; Stemmer, *Nature*, 370:389-391; Stemmer, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91:10747-10751; WO 95/22625; WO 97/0078; WO 97/35966; WO 98/27230; WO 00/42651; WO 01/75767; and WO 2009/152336, которые включены в настоящее описание посредством ссылки).

Клоны, полученные после обработки мутагенезом, подвергают скринингу на наличие сконструированных кеторедуктаз, обладающих желаемым улучшенным ферментативным свойством. Оценка ферментативной активности исходя из экспрессионных библиотек, может быть осуществлена с применением стандартной биохимической методики мониторинга скорости снижения (посредством уменьшения поглощения или флуоресценции) концентрации NADH или NADPH по мере их превращения в NAD⁺ или NADP⁺. В этой реакции, NADH или NADPH утилизируются (окисляются) кеторедуктазой, поскольку кеторедуктаза восстанавливает кетоновый субстрат до соответствующей гидроксильной группы. Скорость снижения концентрации NADH или NADPH, измеренная по

уменьшению поглощения или флуоресценции за единицу времени, указывает на относительную (ферментативную) активность полипептида KRED в фиксированном количестве лизата (или лиофилизованного порошка, полученного из него). Стереохимия продуктов может быть определена различными известными способами, как указано в примерах. Если желательным улучшенным свойством фермента является термостабильность, то активность фермента может быть оценена после воздействия на ферментные препараты определенной температуры и измерения степени ферментативной активности, оставшейся после термообработки. Клоны, содержащие полинуклеотид, кодирующий кеторедуктазу, затем выделяют, секвенируют для выявления изменений нуклеотидной последовательности (если таковые имеются) и используют для экспрессии фермента в клетке-хозяине.

Если известна последовательность сконструированного полипептида, то полинуклеотиды, кодирующие фермент, могут быть получены стандартными твердофазными методами в соответствии с известными методами синтеза. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагменты приблизительно до 100 оснований могут быть синтезированы отдельно, а затем соединены (например, методами ферментативного или химического лигирования или методами, опосредованными полимеразой) с образованием любой желаемой непрерывной последовательности. Так, например, полинуклеотиды и олигонуклеотиды согласно изобретению могут быть получены путем химического синтеза (например, с применением классического фосфорамидитного метода, описанного Beaucage et al., Tet. Lett., 22:1859-69, или метода, описанного Matthes et al., EMBO J., 3:801-05, то есть обычно практикуемого автоматизированного метода синтеза). В соответствии с фосфорамидитным методом, олигонуклеотиды синтезируют (например, на автоматическом ДНК-синтезаторе), очищают, отжигают, лигируют и клонируют в соответствующие векторы. Кроме того, практически любая нуклеиновая кислота может быть получена из множества любых коммерчески доступных источников (см., например, The Midland Certified Reagent Company, Midland, TX, The Great American Gene Company, Ramona, CA, ExpressGen Inc. Chicago, IL, Operon Technologies Inc., Alameda, CA, и многие другие).

Сконструированные кеторедуктазные ферменты, экспрессированные в клетке-хозяине, могут быть выделены из клеток и/или из культуральной среды с применением одного или более хорошо известных методов очистки белков, включая, но не ограничиваясь ими, обработку лизоцимом, обработку ультразвуком, фильтрацию, высаливание, ультрацентрифугирование и хроматографию. Подходящие растворы для лизиса и высокоэффективной экстракции белков из бактерий, таких как *E. coli*, имеются в продаже под торговым названием CelLytic BTM (Sigma-Aldrich).

Хроматографические методы выделения кеторедуктазных полипептидов, включают, но не ограничиваются ими, обращенно-фазовую хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию, ионообменную хроматографию, гель-электрофорез и аффинную хроматографию. Условия очистки конкретного фермента будут отчасти зависеть от таких факторов, как суммарный заряд, гидрофобность, гидрофильность, молекулярная масса, форма молекулы и т.п., и они будут очевидны специалистам в данной области.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, для выделения кеторедуктазных ферментов с улучшенными свойствами применяют аффинные методы. Для очистки с помощью аффинной хроматографии может быть использовано любое антитело, которое специфически связывается с кеторедуктазным полипептидом. Для получения антител, различные животные-хозяева, включая, но не ограничиваясь ими, кроликов, мышей, крыс и т.п., могут быть иммунизированы путем инъекции кеторедуктазы. Кеторедуктазный полипептид может быть присоединен к подходящему носителю, такому как BSA, посредством функциональной группы боковой цепи или линкеров, присоединенных к функциональной группе боковой цепи. В зависимости от вида хозяина, для усиления иммунологического ответа могут быть использованы различные адъюванты, включая, но не ограничиваясь ими, адъюванты Фрейнда (полные и неполные), минеральные гели, такие как гидроксид алюминия, поверхностно-активные вещества, такие как лизолецитин, полиолы плуроники, полианионы, пептиды, масляные эмульсии, гемоцианин лимфы улитки, динитрофенол и потенциально эффективные для человека адъюванты, такие как BCG (бацилла Кальметта-Герена) и *Corynebacterium parvum*.

Кеторедуктазы могут быть получены и использованы в форме клеточных препаратов, экспрессирующих ферменты, в виде неочищенных экстрактов или в виде выделенных или очищенных препаратов. Кеторедуктазы могут быть приготовлены в виде лиофилизатов, в виде порошка (например, порошков на основе ацетона) или приготовлены в виде растворов ферментов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кеторедуктазы могут быть получены в форме по существу чистых препаратов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, кеторедуктазные полипептиды могут быть присоединены к твердому носителю. Носитель может представлять собой твердую фазу, поверхность и/или мембрану. Твердый носитель может состоять из органических полимеров, таких как полистирол, полиэтилен, полипропилен, полифторэтилен, полиэтиленоксида и полиакриламид, а также из их сополимеров и привитых полимеров. Твердый носитель может также представлять собой неорганическое вещество, такое как стекло, диоксид кремния, стекло с регулируемым размером пор (CPG), обращенно-фазовый диоксид кремния или металл, такой как золото или платина. Конфигурация носителя может

быть выполнена в виде шариков, сфер, частиц, гранул, геля, мембраны или поверхности. Поверхности могут быть плоскими, по существу плоскими или неплоскими. Твердые носители могут быть пористыми или непористыми и могут обладать набухающими или не набухающими свойствами. Твердый носитель может представлять собой лунку, углубление или контейнер другого типа, сосуд, его элемент или участок. Множество носителей может располагаться на массиве в различных участках, необходимых для роботизированной доставки реагентов или с применением способов и/или приборов для детектирования.

Как известно специалистам в данной области, реакции восстановления, катализируемые кеторедуктазой, обычно требуют наличия кофактора. Реакции восстановления, катализируемые сконструированными кеторедуктазными ферментами, описанными в настоящей заявке, также обычно требуют присутствия кофактора, хотя во многих вариантах осуществления изобретения, сконструированные кеторедуктазы требуют гораздо меньшее количество кофактора, чем с случае реакций, катализируемых кеторедуктазными ферментами дикого типа. Используемый здесь термин "кофактор" означает небелковое соединение, которое действует в комбинации с ферментом кеторедуктазой. Кофакторы, подходящие для использования вместе с сконструированными кеторедуктазными ферментами, описанными в настоящей заявке, включают, но не ограничиваются ими, NADP^+ (никотинамидадениндинуклеотидфосфат), NADPH (восстановленную форму NADP^+), NAD^+ (никотинамидадениндинуклеотид) и NADH (восстановленную форму NAD^+). Обычно, к реакционной смеси добавляют восстановленную форму кофактора. Восстановленная форма NAD(P)H может быть, но необязательно, регенерирована из окисленной формы NAD(P)^+ под действием системы регенерации кофактора. Термин "система регенерации кофактора" относится к набору реагентов, которые участвуют в реакции восстановления окисленной формы кофактора (например, из NADP^+ до NADPH). Кофакторы, окисленные катализируемым кеторедуктазой восстановлением кето-субстрата, регенерируются в восстановленной форме посредством системы регенерации кофакторов. Системы регенерации кофактора содержат стехиометрический восстановитель, который является источником восстановления эквивалентов водорода и способен восстанавливать окисленную форму кофактора. Система регенерации кофактора может дополнительно включать катализатор, например, ферментный катализатор, который катализирует восстановление окисленной формы кофактора восстановителем. Система регенерации кофактора может также содержать ко-субстрат, такой как изопропанол. Системы регенерации кофактора для регенерации NADH или NADPH из NAD^+ или NADP^+ , соответственно, известны специалистам в данной области и могут быть использованы в способах, описанных в настоящей заявке.

Экспериментальная часть

Различные признаки и варианты осуществления изобретения проиллюстрированы в нижеследующих репрезентативных примерах, которые предназначены лишь для иллюстрации и не должны рассматриваться как ограничение объема изобретения.

В приведенной ниже экспериментальной части используются следующие сокращения: м.д. (миллионные доли); М (моль); мМ (миллиомоль); мкМ (микромоль); нМ (наномоль); моль (моль); гм и г (граммы); мг (миллиграммы); мкг (микрограммы); Л и л (литр); мл (миллилитр); см (сантиметры); мм (миллиметры); мкм (микрометры); сек. (секунды); мин. (минута(ы)); ч.(часы); Ед. (единицы); мол.масса (молекулярная масса); об/мин (обороты в минуту); °С (градусы Цельсия); КТ (комнатная температура); CDS (кодирующая последовательность); ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота); РНК (рибонуклеиновая кислота); ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография); FIOPC (кратное улучшение по сравнению с позитивным контролем); НТР (высокая пропускная способность); LB (бульон Лурия); KPO_4 (фосфат калия); KPO_3 (фосфит калия); ТЕoА (триэтаноламин); РМBS (сульфат полимиксина В); 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, part of Life Technologies, Corp., Grand Island, NY), Agilent (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA); Thermo Scientific (part of Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA); Corning (Corning, Inc., Palo Alto, CA); and Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

При разработке настоящего изобретения были использованы следующие последовательности.

```
aacggcttgcgcccctctcacttccctgtaagtattctctgcatctccaggaatctccgcc
ccgttcgtaagccatttccgctcgcgcgagtcgaacgaccgagcgtagcagtcagtgagcaggaagcg
gaatatactctgtacacatattctgctgacgcaccggtgcagcctttttctctgccacatgaagcac
ttcactgacaccctcatcagtgaccaccgctggtagcgggttttttaggctatggcctttttt
ttgtggaaaccttcggtatggtatfaaacgcccgaagagagtcgaattcagggtggtgaatgtga
aaccagtaacggtatagatgctcagagatgctccggtgtctctatcagaccgttcccgcgtggtgaa
ccaggccagccacgtttctgcgaaacgcccgaagagtggaagcggc gatggcggagctgaattacatt
cccaaccgctggcacaacaactggcgggcaaacagtcgttctgattggcgttccacctccagctctgg
ccctgcacgcgcccgtcgaattgtcgcggcgattaatctcgcgccatcaactgggtgccagcgtggtg
ggtgctgatgtagaacgaagcggcgtcgaagcctgtaaacgcccggcggcgcacaaatctctcgcgcaacgc
gtcagttggctgatcattactatccgctggtgagaccaggtgacattgctggaagcgtgcctgcaacta
atgttccggcgttattctgtatgctctgaccagaccatcaacagattatttttcccatgaaga
```

cggtagcgactgggctgggagcatctggcgcattgggtcaccagcaaatcgcgctgftagcgggcca
 ttaagtctgtctcggcgcgtctgctggctggctggcataaatactcactcgaatcaaattcagc
 cgatagcgggaacgggaaggcactggagtgccatgtccggtttcaacaacatgcaaatgctgaatga
 gggcatcgtttccactgcgatgctggtgccaacgatcagatggcgtggcgcaatgcgcgccattacc
 gagtccgggctgcggtggtgcccacatctcggtagtgggatacgcgataaccgaagacagctcatgt
 atatcccgccgtaaccacatcaaacaggatttccgctgctggggcaaacaggcgtggaccgctgct
 gcaactctcagggccaggcggtaaggcaatcagctgtgccgctcactggtgaaaagaaaaacc
 accctggcggcccaaacgcaaacggcctctccccgcgctggccgattcattaatgcagctggcacgac
 aggttcccactggaaagcgggagtgagcgggtaccgataaaaggcgttctgacaggaggccggtt
 tgttctcaggttaatfaaggcagtgagcgcacaaftaatgtgagttagctcactcattaggcacc
 caggctttactttatgctccggctcgtatgtgtggaattgtgagcggataacaattcacacag
 gaaacggctatgacctgattacggattcactggcgtcgtttacaatctagaggccagcctggccata
 aggagatatacatatgattcaacattccgctgcgcccttattccctttctcggcattttgctt
 cctgttttgcaccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtg
 gttacatcgaactggaatcacaacgggtaagatccttgagagtttcccccgaagagcgtttccaat
 gatgagcactttaaagtctgctatgtggcgcgggtattatcccggttgacgcccggcaaggaactc
 ggtcggccatacactattctcagaatgactggtgagttactaccagtcacagaaaagcatcttaccg
 atggcatgacagtaagagaattatgagtgctgcccataaccatgagtgataaacactgcggccaacttact
 tctgacaacgatcggaggaccgaaggagcctaaccgttttttgcacaccatgggggatcatgtaactcgc
 ctgacgttgggaaaccggagctgaatgaagccatacacaacgacgagcgtgacaccagatgcttacag
 caatggcaacaacgttgcgcaactattaactggcgaactactactctagcttccggcaacaattaat
 agactggatggaggcggataaagtgcaggaccacttctgcgctcggccctccggctggctggttatt
 gctgataaactggagccggtagcgtgggtctcgcggatcattgcagcactggggccagatgtaagc
 cctccgctatcgtatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgtaatagacagatcgc
 tgagataggctcactgattaagcattggggccaaactggccaccatcaccatcaccatagggaaga
 gcagatgggcaagctgacctgtgaagtgaanaatggcgcacattgtgcgacattttttgaattcta
 cgtaaaaagcagccgatacctcggctgcttttttctgcagggtgaaacaaaacggttgaccacatga
 agtaaacacgggtacggctggtatgtatcacagttaaatgctaacgcagtcaggcaagtcacatgggt
 tttcttccgtaagcgaacttctggtaaccggtgtgccagcaaacatccatcgcctacgggtatcgtc
 aggcgatgcaccgcgaaggagctgaactggcattcaccatcaccagaacgacaactgaaaggccgctaga
 agaattggccctcaattgggtctgacatgctcagtgccgatgtgcagaagatgccagatcgcac
 accatgtcgtgaaactggggaagttggccgaaattgacgggtttgtacactctattgttttgac
 ctggcgtacagctggatggtgactatgtaacggcgttaccctgaaggctcaaaattgccacgacat
 cagctctacagcttctgtcaatggcaaaagcttccgctccatgctgaatcgggttctgcctgctg
 acccttctaccctggcgtgagcgcgctatccgaactacaacgttatgggtcggcaaaagcgtctc
 tggaaagcaacgtcgtctatggcgaacgcgatgggtccggaaggtgtcgtgtaaacgcatctctgc
 tggctcagatcgtactcggcggcctccggatcaaaagacttccgcaaaatgctggctcattgcgaagcc
 ttaccctgattcggcgtaccgttactattgaagatgtggtaactctgcggcattcctgtgctccgac
 tctctccggtatctccggtagaagtggtccacgttgacggcgggttcagcattgctgcaatgaacgaact
 cgaactgaaataactgcagagctcaaacagcagcctgtattcaggctgcttttagaaatatttatct
 gattaataagatgatctctgagatcgtttggtctgcgcgtattctctgctctgaaaacgaaaaaac
 cgcttgcaggcggcgttttgcgaaggtctctgagctaccaactcttgaaccgaggttaactggcttga
 ggagcgcagtcacaaaactgtcttctcagtttagccttaaccggcgcagctcaagactaactcct
 ctaaatcaattaccagtggtcgtccagtggtgcttttgcagcttccgggttgactcaagacgat
 agttaccggataaggcgcagcggctggactgaacggggggtcgtgcatacagtcagcttggagcgaac
 tgcctaccggaaactgagtgtagcgtggaatgagacaacgcggccataacagcggatgacaccggt
 aaaccgaaaggcaggaacagagagcgcacgagggagccgccaggggaaacgcctggtatctttatag
 cctgtcgggttccaccactgattgagcgtcagatttctgtagcttgcagggggcggagcctat
 ggaaa (SEQ ID NO: 413)

SEQ ID NO: 414:

aacggcttggccggccctctcacttccctgtaagtattcttggcatctccaggaaatctccgcc
 ccgttcgtaagccatttccgctcggcagtcgaacgaccgagcgtagcagtcagtgagcagggaagcg
 gaatatactctgatcacatattctgctgacgcaccggtgcagcctttttctcctgccacatgaagc
 ttactgacaccctcatcagtaaccaccgctgtagcgggttttttaggctatggcctttttt
 ttgtggaaaccttccgggtatggtatfaaagcggccggaagagatcaattcagggtggtgaatgta
 aaccagtaacgttatacgtcgcagatgtagcgggtgtctctatcagaccgttcccgctggtgaa
 ccaggccagccacgttctgcgaaacgcgggaaagtggaagcggcgtggcggagctgaattacatt
 cccaaccgctggcacaacaactggcgggcaaacagctgttctgattggcgttgcaccctcagctgg
 ccctgcacgcggcgtcgaatgtcggcgtgattaatctcgcggcagatcaactgggtgccagcgtggt
 ggtgtcgtgtagaacgaagcggcgtcgaagcctgtaaacggcgggtgcacaatctctcgcgcaacgc
 gtcagtggtgctgatcattaactatccgctgagatgaccaggtgaccattgtggaagcgtcctgacta
 atgttccggcgttattctgtagtctctgaccagacaccatcaacagatatttttcccatgaaga

cggtagcgactgggctgggagcatctggcgcattgggtcaccagcaaatcgcgctgtagcgggcca
 ttaagttctgtctcggcgcgtctgctggctggctggcdataaatactcactgcaatcaattcagc
 cgatagcgggaacgggaaggcactggagtgccatgctccggtttcaacaacatgcaaatgctgaatga
 gggcatcgtttccactgcgatgctggtgccaacgatcagatggcgtggcgcaatgcgcgccattacc
 gtagccgggctgctggtggtgacatctcggtagtgggatacgcgataaccgaagacagctcatgt
 atatcccgccgtaaccacatcaaacaggatttcgcctgctggggcaaacagcgtggaccgctgct
 gcaactctcagggccaggcggttaaggcaatcagctgtgccctcactggtgaaagaaaaacc
 accctggcggcccaaacgcaaacgcctctccccgcgctggccgattcattaatgcagctggcacgac
 aggttcccactggaaagcgggagtgagcgggtaccgataaaaggcttctgacaggaggccggtt
 gtttctcaggttaatgaaggcagtgagcgaacgcaatfaatgtgagttagctcactcattaggcacc
 caggctttactttatgctccggctcgtatgtgtggaattgtgagcgataacaattcacacag
 gaaacggctatgacctgattacggattcactggcgtcgtttacaatctagaggccagcctggccata
 aggagatatacatatgattcaacattccgtgctccccttattccctttctcggcattttgcctt
 cctgttttgcaccagaacgcgtggaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggtg
 gttacatcgaactggaatcacaacgggtaagatccttgagagtttcccccgaagagcgtttccaat
 gatgagcactttaaagtctgctatgtggcgcggtattatcccggttgacgcgggcaagagcaact
 ggtcggcgatacactattctcagaatgactggtgagtagtaccagtcacagaaaagcatcttaccg
 atggcatgacagtaagagaattatgagtgctgataaacatgagtgataaacactgcggccaacttact
 tctgacaacgatggaggaccgaaggagtaaccgttttttgcacacatgggggatcatgtaactcgc
 ctgacgttgggaaccggagctgaatgaagccatacaaacgacgagcgtgacaccagatgcttacag
 caatggcaacaactgtgcgaactattaactggcgaactactactctagcttccggcaacaataat
 agactggatggaggcgataaagtgcaggaccacttctgcgctggccctccggctggtgtttatt
 gctgataatctggagccggtagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatgtaagc
 cctccgctatcgtatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgtaatagacagatcgc
 tgagataggctcactgattaagcattggggccaaactggccaccatccatcaccattagggaaga
 gcagatgggcaagctgacctgtgaagtgaanaatggcgcaattgtgcgacattttttgaattcta
 cgtaaaaagcagccgatacgcgctgcttttttctcagggtgaaacaaaacggtgactacatga
 agtaaacacggtagcggtagttatcacagttaaatgctaacgcagtcaggcaagtcctgggt
 tttctccgtaagcgaacttctggtaaccggtgtgccagcaaacatccatcgcctacgggtatcgc
 aggcgatgcaccgcgaaggagctgaactggcattcaccagaacgacaactgaaaggccgcgtaga
 agaattggcctcaattgggttctgacatgctcagtgctgagtgatgagagaatgccagatcgcac
 accatgtcgtgaaactggggaagttggccgaaattgacgggtttgtacactctattgttttgac
 ctggcagcagctggatggtgactatgtaacgcccgttaccctgaaggctcaaaatgcccacgacat
 cagctctacagcttctgcaatggcaaaagcttccgctccatgctgaatcgggttctgcctgctg
 acccttctaccctggcgtgagcgcgctatcccgaactacaacgttatgggtctggcaaaagcgtc
 tggaaagcaacgtcgtatagggcaacgcgatgggtccggaaggtgctgctgtaacgccatctctgc
 tggctccgatcctgactcggcggcctccggtatcaagacttccgcaaaatgctggctcattgcgaagc
 gttaccggattcggcgtaccgttactattgaagatgtggtaactctgcggcatcctgtgctccgac
 tctctccggtatctccggtagtggaagtggtccacgttgacggcgggttcagcattgctgcaatgaacgaact
 cgaactgaaataactgcagagctcaaacagcagcctgtattcaggctgcttttagaaatatttatct
 gattaataagatgatctctgagatcgtttggtctgctgtaactctctgctetgaaaacgaaaaaac
 cgcttgcaggggcggttttgaaggctctgagctaccaactcttgaaccgaggttaactggcttga
 ggagcgcagtcacaaaactgtcttctcagtttagccttaaccggcgcagctcaagactaactcct
 ctaaatcaattaccagtggtgctgctccagtggtgcttttgcagctcttccgggttgactcaagacgat
 agttaccggataaggcgcagcggctggactgaacggggggtcgtgcatacagctcagcttggagcgaac
 tgcctaccggaaactgagtgtagcgtggaatgagacaacgcggccataacagcggatgacaccggt
 aaaccgaaaggcaggaacagagagcgcacgaggagccgccaggggaaacgcctggtatctttagt
 cctgtcgggttccaccactgattgagcgtcagatttcgtgatgcttgcagggggcgaggcctat
 gaaa (SEQ ID NO: 414)

Пример 1.

Клетки-хозяева *E. coli* для экспрессии, содержащие рекомбинантные гены KRED.

Исходные ферменты KRED, используемые для получения вариантов согласно изобретению, были взяты из коллекции Codexis коммерчески доступных наборов ферментов KRED. Во время начального скрининга, вариант SEQ ID NO: 4 продуцировал наибольшее количество продукта, как было определено с помощью ЖХ/МС. Гены, кодирующие KRED, клонировали в экспрессионную векторную систему, включая pСК110900 (см. фиг. 3 в публикации заявки на патент США № 2006/0195947), SEQ ID NO: 413 или SEQ ID NO: 414, функционально связанные с промотором *lac* под контролем репрессора *lacI*. Система экспрессионных векторов также содержит ориджин репликации P15a и ген резистентности к хлорамфениколу. При этом, не предполагается, что настоящее изобретение ограничивается описанными здесь экспрессионными векторами. Для специалистов в данной области будет очевидно, что в настоящем изобретении может быть использован любой подходящий экспрессионный вектор, включая, но не ограничиваясь ими, экспрессионные векторы p3xFLAGTM TM (Sigma-Aldrich), векторы pBluescriptII

SK(-) и pBK-CMV (Stratagene) и плазмиды, полученные из pBR322 (Gibco BRL), pUC (Gibco BRL), pREP4, pCER4 (Invitrogen) или pPoly (см. Lathe et al., Gene 57:193-201).

Полученные плазмиды трансформировали в *E. coli* W3110 известными стандартными методами. Трансформанты выделяли путем отбора клеток на резистентность к хлорамфениколу, как известно специалистам в данной области (см., например, патент США № 8383346 и WO 2010/144103).

Пример 2.

Приготовление сырых клеточных гранул, содержащих KRED НТР.

Клетки *E. coli*, содержащие рекомбинантные гены, кодирующие KRED, и выделенные из моноклональных колоний, инокулировали в 190 мкл среды LB, содержащей 1% глюкозы и 30 мкг/мл хлорамфеникола, в лунках 96-луночных микротитрационных планшетов с мелкими лунками. Планшеты закрывали кислородопроницаемыми герметиками, и культуры выращивали в течение ночи при 20°C, 200 об/мин и при влажности 85%. Затем, 20 мкл каждой клеточной культуры переносили в лунки 96-луночных планшетов с глубокими лунками, содержащих 380 мкл ТВ и 30 мкг/мл САМ. Планшеты с глубокими лунками закрывали кислородопроницаемыми герметиками и инкубировали при 30°C, при 250 об/мин и при влажности 85% до достижения OD_{600} 0,6-0,8. Затем, клеточные культуры индуцировали с помощью IPTG до конечной концентрации 1 мМ и инкубировали в течение ночи в тех же условиях, которые использовались ранее. Затем клетки осаждали центрифугированием при 4°C, 4000 об/мин в течение 10 мин. Супернатанты отбрасывали, а клеточный осадок замораживали при температуре -80°C, а затем подвергали лизису.

Пример 3.

Приготовление клеточных лизатов, содержащих KRED НТР.

Сначала, клеточный осадок, полученный, как описано в примере 2, подвергали лизису путем добавления 150 мкл буфера для лизиса, содержащего 100 мМ триэтанолamina*H₂SO₄ с pH 8 и 2 мМ MgSO₄ или 100 мМ фосфата калия с pH 8 вместе с 2 мМ MgSO₄, 1 г/л лизоцима и 0,5 г/л PMBS. Затем, клеточный осадок встряхивали при комнатной температуре в течение 2 часов на настольном шейкере. Планшеты центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин при 4°C для удаления клеточного дэбриса. Затем, супернатанты использовали в биокаталитических реакциях для определения уровня их активности.

Пример 4.

Приготовление лиофилизованных лизатов из культур в шейкерных колбах (SF).

Процедуры приготовления шейкерных колб могут быть применены для получения порошков полипептидов в шейкерных колбах содержащих сконструированный полипептид KRED (SFP), которые могут быть использованы для вторичного скрининга и/или для их использования в описанных здесь биокаталитических процессах. Приготовление ферментов в виде порошка в шейкерных колбах (SFP) обеспечивает получение более чистого препарата (например, до 30% от общего белка) сконструированного фермента по сравнению с клеточным лизатом, используемым в анализах НТР, а также позволяет использовать более концентрированные растворы ферментов. Для этого, выбранные культуры НТР, выращенные, как описано выше, высевали на планшеты с агаром LB с 1% глюкозы и 30 мкг/мл хлорамфеникола (САМ) и выращивали в течение ночи при 37°C. Одну колонию из каждой культуры переносили в 6 мл LB с 1% глюкозой и 30 мкг/мл САМ. Культуры выращивали в течение 18 ч при 30°C и при 250 об/мин и субкультивировали приблизительно 1:50 в 250 мл ТВ, содержащей 30 мкг/мл САМ, до конечной OD_{600} , равной 0,05. Культуры выращивали в течение приблизительно 3 часов при 30°C при 250 об/мин до OD_{600} , равной 0,8-1,0 и индуцировали 1 мМ IPTG. Затем, культуры выращивали в течение 20 ч при 30°C со скоростью 250 об/мин. Культуры центрифугировали (4000 об/мин в течение 20 мин при 4°C). Супернатант отбрасывали, и осадок ресуспендировали в 35 мл 50 мМ фосфата калия, pH 8, с 2 мМ MgSO₄. Ресуспендированные клетки центрифугировали (4000 об/мин в течение 20 мин при 4°C). Супернатант отбрасывали, и осадок ресуспендировали в 6 мл 50 мМ фосфата калия, pH 8, с 2 мМ MgSO₄, а затем клетки подвергали лизису с использованием дезинтегратора клеток от Constant Systems (One Shot). Лизаты осаждали (10000 об/мин в течение 60 мин при 4°C), а супернатанты замораживали и лиофилизовали для получения ферментов в шейкерных колбах (SF).

Пример 5.

Эволюция и скрининг сконструированных полипептидов, полученных из SEQ ID NO: 4, на повышенную активность KRED.

SEQ ID NO: 4 была выбрана в качестве исходного фермента на основании результатов скрининга вариантов на восстановление субстрата изо- α -кислоты. Библиотеки сконструированных генов были получены с использованием хорошо зарекомендовавших себя методов (например, мутагенеза с насыщением и рекомбинации ранее идентифицированных полезных мутаций). Полипептиды, кодируемые каждым геном, получали в виде НТР, как описано в примере 2, а растворимый лизат получали как описано в примере 3.

Сконструированный полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 4 (то есть SEQ ID NO: 3), обладающий активностью KRED, использовали для получения дополнительных сконструированных полипептидов, представленных в табл. 5-1. Эти полипептиды продемонстрировали улучшенное

образование дигидро-(rho)-изо- α -кислот из изо- α -кислот по сравнению с исходным полипептидом. Сконструированные полипептиды были получены из "основной" аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4 с применением методов направленной эволюции, как описано выше, и с проведением анализа НТР, а также с применением аналитических методов, описанных ниже в табл. 5-2.

Направленная эволюция начиналась с полинуклеотида, представленного в SEQ ID NO: 3. Затем, сконструированные полипептиды были выбраны в качестве исходных "основных" генных последовательностей. Библиотеки сконструированных полипептидов получали с применением различных хорошо известных методов (например, мутагенеза с насыщением, рекомбинации ранее идентифицированных полезных аминокислотных различий) и подвергнуты скринингу с помощью НТР-анализа и методов анализа, которые позволяют определять способность полипептидов превращать субстраты изо- α -кислоты в желаемый продукт дигидро-(rho)-изо- α -кислоты.

Ферментный анализ проводили в 96-луночном планшете с общим объемом 200 мкл на лунку, который включал 50% об./об. лизата фермента НТР, 8 г/л субстрата изо- α -кислоты (раствора изомеризованного экстракта хмеля Isolone®, Kalsec) и 0,1 г/л NADP в 40 об.% изопропанола (IPA) в 100 мМ триэтанолamina*H₂SO₄ с pH 8 и 2 мМ MgSO₄. Планшеты герметично закрывали и инкубировали при 40°C со встряхиванием при 600 об/мин в течение 20-24 ч.

Через 20-24 ч добавляли 1000 мкл ацетонитрила с 0,1% уксусной кислоты. Планшеты герметично закрывали и центрифугировали при 4000 об/мин при 4°C в течение 10 мин. Гашеный образец дополнительно разводили 4-5 раз смесью ацетонитрил:вода 50:50 перед ВЭЖХ-анализом. Параметры ВЭЖХ-анализа описаны ниже в табл. 5-2.

Таблица 5-1

Активность варианта KRED по сравнению с SEQ ID NO: 4

SEQ ID NO: (нк/а.к.)	Отличия аминокислот (по сравнению с SEQ ID NO: 4)	Кратное увеличение процента превращения (по сравнению с SEQ ID NO: 4) ¹
5/6	L196K	++++
7/8	L196R	+++
9/10	L153R	+++
11/12	L145S	+++
13/14	T152G	++
15/16	L196H	++
17/18	I93V	++
19/20	L145M	++
21/22	L145G	++
23/24	L145C	+
25/26	L153V	+
27/28	D197R	+
29/30	L21R	+
31/32	I93D	+
33/34	V148I	+
35/36	L153C	+
37/38	E200Q	+
39/40	P194R	+
41/42	E200R	+
43/44	M206V	+
45/46	I93M	+
47/48	D197G	+
49/50	P194N	+
51/52	E200L	+
53/54	L110I	+
55/56	I226L	+
57/58	I93T	+

59/60	T212S	+
61/62	P194H	+
63/64	T152S	+
65/66	V12I	+
67/68	K97G	+
69/70	V87L	+
¹ Уровни повышенной активности были определены по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 4 и были выражены как: "+" >1,0, но < 2,0, "++" >2, но <4, "+++" >4, но <8, "++++" >8		
Таблица 5-2. Параметры ВЭЖХ		
Устройство	ВЭЖХ-колонка Agilent 1100	
Колонка	30 × 50 мм 2,7 мкм-колонка Waters XBridge с фенилом	
Подвижная фаза	А: 0,1% уксусная кислота в воде, В: 0,1% уксусная кислота в ацетонитриле	
Параметры анализа	42:58 А/В, 1 мин; градиент 10:90 А/В, свыше 1 мин	
Скорость потока	1,5 мл/мин.	
Время анализа	2,0 мин.	
Время удерживания пика	Соединение время удерживания [мин] примечания Iso-1 0.6 смесь изомеров ко-Iso Iso-2 0.7 смесь изомеров п/ad-Iso Iso-3 0.8 смесь изомеров п/ad-Iso Rho-1 1.0 смесь изомеров со-Rho Rho-2 1.2 смесь изомеров п/ad-Rho Rho-3 1.4 смесь изомеров п/ad-Rho	
Температура колонки	50°C	
Объем впрыска	10 мкл	
Детекция	260 нм	

Пример 6.

Эволюция и скрининг сконструированных полипептидов, полученных из SEQ ID NO: 6, на повышенную активность KRED.

Библиотеки сконструированных генов были получены с использованием хорошо зарекомендовавших себя методов (например, мутагенеза с насыщением и рекомбинации ранее идентифицированных полезных мутаций). Полипептиды, кодируемые каждым геном, получали в виде НТР, как описано в примере 2, а растворимый лизат получали как описано в примере 3.

Сконструированный полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 6 (то есть SEQ ID NO: 5), обладающий активностью KRED, использовали для получения дополнительных сконструированных полипептидов, представленных в табл. 6-1. Эти полипептиды продемонстрировали улучшенное образование дигидро-(rho)-изо- α -кислот из изо- α -кислот по сравнению с исходным полипептидом. Сконструированные полипептиды были получены из "основной" аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6 с применением методов направленной эволюции, как описано выше, и с проведением анализа НТР, а также с применением аналитических методов, описанных ниже в табл. 5-2.

Направленная эволюция начиналась с полинуклеотида, представленного в SEQ ID NO: 5. Затем,

сконструированные полипептиды были выбраны в качестве исходных "основных" генных последовательностей. Библиотеки сконструированных полипептидов были созданы с применением различных хорошо известных методов (например, мутагенеза с насыщением, рекомбинации ранее идентифицированных полезных аминокислотных различий) и подвергнуты скринингу с помощью НТР-анализа и методов анализа, которые позволяют определять способность полипептидов превращать субстраты изо- α -кислоты в желаемый продукт дигидро-(ρ)-изо- α -кислоты.

Ферментный анализ проводили в 96-луночной планшете с общим объемом 200 мкл на лунку, который включал 50% об./об. лизата фермента НТР, 16 или 40 г/л субстрата изо- α -кислоты (раствора изомеризованного экстракта хмеля Isolone®, Kalsec) и 0,1 г/л NADP в 40 об.% изопропанола (IPA) в 100 мМ триэтанолamina*H₂SO₄ с pH 8 и 2 мМ MgSO₄. Планшеты герметично закрывали и инкубировали при 40°C со встряхиванием при 600 об/мин в течение 20-24 ч.

Через 20-24 ч добавляли 1000 мкл ацетонитрила с 0,1% уксусной кислоты. Планшеты герметично закрывали и центрифугировали при 4000 об/мин при 4°C в течение 10 мин. Гашеный образец дополнительно разводили 10-20 раз смесью ацетонитрил:вода 50:50 перед ВЭЖХ-анализом. Параметры ВЭЖХ-анализа описаны ниже в табл. 5-2.

Таблица 6-1

Активность варианта KRED по сравнению с SEQ ID NO: 6

SEQ ID NO: (нк/а.к.)	Отличия аминокислот сравнению с SEQ ID NO: 6)	Кратное увеличение процента превращения (по сравнению с SEQ ID NO: 6) ¹
71/72	V12I;L145M	++++
73/74	L145M	+++
75/76	V87L;L110I;L145M	+++
77/78	L145M;T152G	+++
79/80	V87L;L110I;L145M	+++
81/82	V12I;L110I;L145M;T152G	++
83/84	L110I;L145M;P194H	++
85/86	L110I;L145M;T152G;D197G	+
87/88	V87L;L110I;L145M;P194H	+
89/90	V87L;L110I;L145M;P194H	+
91/92	T152S	+
93/94	L145M;D197G;I226L	+
95/96	V87L;L145M;P194H	+
97/98	L110I	+

¹ Уровни повышенной активности были определены по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 6 и были выражены как: "+" >1,0, но < 2,0, "++" >2, но <4, "+++>4, но <8, "++++" >8

Пример 7.

Эволюция и скрининг сконструированных полипептидов, полученных из SEQ ID NO: 80, на повышенную активность KRED.

Библиотеки сконструированных генов были получены с использованием хорошо зарекомендовавших себя методов (например, мутагенеза с насыщением и рекомбинации ранее идентифицированных полезных мутаций). Полипептиды, кодируемые каждым геном, получали в виде НТР, как описано в примере 2, а растворимый лизат получали как описано в примере 3.

Сконструированный полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 80 (то есть SEQ ID NO: 79), обладающий активностью KRED, использовали для получения дополнительных сконструированных полипептидов, представленных в табл. 7-1. Эти полипептиды продемонстрировали улучшенное образование дигидро-(ρ)-изо- α -кислот из изо- α -кислот по сравнению с исходным полипептидом. Сконструированные полипептиды были получены из "основной" аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 80 с применением методов направленной эволюции, как описано выше, и с проведением анализа НТР, а также с применением аналитических методов, описанных ниже в табл. 5-2.

Направленная эволюция начиналась с полинуклеотида, представленного в SEQ ID NO: 79. Затем, сконструированные полипептиды были выбраны в качестве исходных "основных" генных последовательностей. Библиотеки сконструированных полипептидов были созданы с применением различных хорошо известных методов (например, мутагенеза с насыщением, рекомбинации ранее идентифицированных полезных аминокислотных различий) и подвергнуты скринингу с помощью НТР-

анализа и методов анализа, которые позволяют определять способность полипептидов превращать субстраты изо- α -кислоты в желаемый продукт дигидро-(ρ h)-изо- α -кислоты.

Ферментный анализ проводили в 96-луночном планшете с общим объемом 200 мкл на лунку, который включал 25% об./об. лизата фермента НТР, 60 или 80 г/л субстрата изо- α -кислоты (раствора изомеризованного экстракта хмеля Isolone®, Kalsec) и 0,02 г/л NADP в 40 об.% изопропанола (IPA) в 100 мМ фосфата калия с рН 8 и 2 мМ MgSO₄. Планшеты герметично закрывали и инкубировали при 45°C со встряхиванием при 600 об/мин в течение 20-24 ч.

Через 20-24 ч добавляли 1000 мкл ацетонитрила с 0,1% уксусной кислоты. Планшеты герметично закрывали и центрифугировали при 4000 об/мин при 4°C в течение 10 мин. Гашеный образец дополнительно разводили 20-40 раз смесью ацетонитрил:вода 50:50 перед ВЭЖХ-анализом. Параметры ВЭЖХ-анализа описаны ниже в табл. 5-2.

Таблица 7-1

Активность варианта KRED по сравнению с SEQ ID NO: 80

SEQ ID NO: (нк/а.к.)	Отличия аминокислот (по сравнению с SEQ ID NO: 80)	Кратное увеличение процента превращения (по сравнению с SEQ ID NO: 80) ¹
99/100	L211R	++++
101/102	L17S	++++
103/104	L17Q	+++
105/106	D198A	+++
107/108	T152K	+++
109/110	D101T	+++
111/112	I110V	+++
113/114	D101C	++
115/116	P190A	++
117/118	V56C	++
119/120	A162G	++
121/122	V95I	++
123/124	T210W	++
125/126	T210F	++
127/128	L21A	++
129/130	C227V	+
131/132	K46V	+
133/134	D101L	+
135/136	D198Q	+
137/138	T152L	+
139/140	E79L	+
141/142	K72A	+

¹ Уровни повышенной активности были определены по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 80 и были выражены как: "+" >1,0, но <2,0, "++" >2, но <4, "+++" >4, но <8, "++++" >8

Пример 8.

Эволюция и скрининг сконструированных полипептидов, полученных из SEQ ID NO: 80, на повышенную активность KRED.

Библиотеки сконструированных генов были получены с использованием хорошо зарекомендовавших себя методов (например, мутагенеза с насыщением и рекомбинации ранее идентифицированных полезных мутаций). Полипептиды, кодируемые каждым геном, получали в виде НТР, как описано в примере 2, а растворимый лизат получали как описано в примере 3.

Сконструированный полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 80 (то есть SEQ ID NO: 79), обладающий активностью KRED, использовали для получения дополнительных сконструированных полипептидов, представленных в табл. 8-1. Эти полипептиды продемонстрировали улучшенное образование дигидро-(ρ h)-изо- α -кислот из изо- α -кислот по сравнению с исходным полипептидом. Сконструированные полипептиды были получены из "основной" аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 80 с применением методов направленной эволюции, как описано выше, и с проведением

анализа НТР, а также с применением аналитических методов, описанных ниже в табл. 5-2.

Направленная эволюция начиналась с полинуклеотида, представленного в SEQ ID NO: 79. Затем, сконструированные полипептиды были выбраны в качестве исходных "основных" генных последовательностей. Библиотеки сконструированных полипептидов были созданы с применением различных хорошо известных методов (например, мутагенеза с насыщением, рекомбинации ранее идентифицированных полезных аминокислотных различий) и подвергнуты скринингу с помощью НТР-анализа и методов анализа, которые позволяют определять способность полипептидов превращать субстраты изо- α -кислоты в желаемый продукт дигидро-(rho)-изо- α -кислоты.

Ферментный анализ проводили в 96-луночной планшете с общим объемом 200 мкл на лунку, который включал 10-20% об./об. лизата фермента НТР, 80 или 160 г/л субстрата изо- α -кислоты (раствора изомеризованного экстракта хмеля Isolone®, Kalsec) и 0,02 г/л NADP в 40 об.% изопропанола (IPA) в 100 мМ фосфата калия с рН 8 и 2 мМ MgSO₄. Планшеты герметично закрывали и инкубировали при 45°C со встряхиванием при 600 об/мин в течение 20-24 ч.

Через 20-24 ч добавляли 1000 мкл ацетонитрила с 0,1% уксусной кислоты. Планшеты герметично закрывали и центрифугировали при 4000 об/мин при 4°C в течение 10 мин. Гашеный образец дополнительно разводили 20-40 раз смесью ацетонитрил:вода 50:50 перед ВЭЖХ-анализом. Параметры ВЭЖХ-анализа описаны ниже в табл. 5-2.

Таблица 8-1

Активность варианта KRED по сравнению с SEQ ID NO: 80

SEQ ID NO: (нк/а.к.)	Отличия аминокислот (по сравнению с SEQ ID NO: 80)	Кратное увеличение процента превращения (по сравнению с SEQ ID NO: 80) ¹
143/144	P190A;P194E	++++
145/146	P194E	++++
147/148	N157C	++++
149/150	L17M	++++
99/100	L211R	++++
151/152	L17S	+++
153/154	I191T;P194E	+++
155/156	P190A;I191T;P194E	+++
103/104	L17Q	++
157/158	S159T	++
159/160	D198Q	++
139/140	E79L	+
161/162	D198A	+

¹ Уровни повышенной активности были определены по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 80 и были выражены как: "+" >1,0, но < 2,0, "++" >2, но <4, "+++" >4, но <8, "++++" >8

Пример 9.

Эволюция и скрининг сконструированных полипептидов, полученных из SEQ ID NO:6 и SEQ ID NO: 80, на повышенную активность KRED при высокой концентрации субстрата.

Исходный раствор фермента в концентрации 40 г/л получали путем растворения 200 мг порошка фермента в 5 мл 100 мМ триэтанолamina*H₂SO₄ с рН 8 и с 2 мМ MgSO₄. Затем брали 2 мл аликвоты и подвергали двум последовательным разведениям 1:1 по объему до 20 и 10 г/л. 500 мкл исходного раствора фермента (10, 20 или 40 г/л) добавляли во флакон на воздухе и помешивали стержневой мешалкой. К перемешиваемому исходному раствору фермента добавляли 100 мкл аликвоты 1 г/л NADP в буфере и 400 мкл 25 г/л изо- α -кислот в изопропаноле (IPA). Конечный состав реакционной смеси составлял 5, 10 или 20 г/л фермента, 10 г/л изо- α -кислот и 0,1 г/л NADP в 40%-м IPA. Флакон помещали в нагревательный блок при 25°C или 40°C, и через 1, 2, 4, 8 и 24 ч отбирали пробы и анализировали с помощью ВЭЖХ-УФ. Типичный профиль реакционной смеси, используемый для сравнения SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 80, показан на фиг. 1.

Пример 10.

Эволюция и скрининг сконструированных полипептидов, полученных из SEQ ID NO: 80, 104, 100, 136, 116, 132, 162, 150, 152, 144 и 146, на повышенную активность KRED при высокой концентрации субстрата и низкой концентрации NADP.

Исходный раствор фермента в концентрации 200 г/л приготавливали путем растворения 100 мг порошка фермента в 500 мкл 100 мМ фосфатно-калиевого буфера с рН 8 с 2 мМ MgSO₄ и 0,1 г/л NADP.

В лунку 96-луночного планшета с глубокими лунками добавляли 40 мкл исходного раствора фермента/NADP, 80 мкл изопропанола и 80 мкл 40 мас.% водного раствора изо- α -кислот. Конечный состав реакционной смеси составлял 40 г/л фермента, 160 г/л изо- α -кислот и 0,02 г/л NADP в 40% IPA. Планшет герметично закрывали и инкубировали при 40°C в течение 24 ч, а затем реакцию гасили и анализировали с помощью ВЭЖХ-УФ. Данные представлены в табл. 11-1 и на фиг. 2.

Таблица 10-1

Активность KRED при высокой концентрации субстрата и низкой концентрации NADPH

SEQ ID NO: (н.к/а.к.)	% превращения					
	40 г/л	20 г/л	10 г/л	5 г/л	2,5 г/л	1,25 г/л
79/80	4,2	1,9	0,9	0,5	0,1	0,0
103/104	28,2	16,5	8,7	5,2	2,2	1,2
99/100	23,1	11,2	6,1	3,3	1,3	0,6
135/136	23,6	7,5	2,4	1,2	0,6	0,0
115/116	8,5	3,2	1,2	0,7	0,2	0,0
131/132	5,3	2,2	0,8	0,4	0,1	0,0
161/162	29,1	14,4	5,6	2,1	0,7	0,3
149/150	29,0	14,9	6,0	2,4	1,0	0,2
151/152	30,6	17,9	7,4	3,6	2,0	1,2
143/144	29,1	14,4	5,8	2,4	1,2	0,4
145/146	24,3	12,3	4,7	1,9	0,8	0,1
157/158	3,0	1,1	0,4	0,0	0,0	0,0

Пример 11.

Эволюция и скрининг сконструированных полипептидов, полученных из SEQ ID NO: 104, на повышенную активность KRED.

Как описано в примере 8, библиотеки сконструированных генов были получены с применением хорошо зарекомендовавших себя методов (например, мутагенеза с насыщением и рекомбинации ранее идентифицированных полезных мутаций). Полипептиды, кодируемые каждым геном, получали в НТР, как описано в примере 2, а растворимый лизат получали, как описано в примере 3.

Сконструированный полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 104 (то есть SEQ ID NO: 103), обладающий активностью KRED, использовали для создания дополнительных сконструированных полипептидов с улучшенными свойствами как показано в табл. 11-1.

Таблица 11-1

Превращение продукта варианта KRED по сравнению с SEQ ID NO: 104

SEQ ID NO: (нк/а.к.)	Отличия аминокислот сравнению с SEQ ID NO: 104)	(по	Кратное увеличение процента превращения (по сравнению с SEQ ID NO: 104) ¹
163/164	Q17M/P190A/D198A		+
165/166	Q17M/K46V/D198A/L211R		+
167/168	K46V/P194E/D198Q		+
169/170	Q17M/K46V/P190A		+
171/172	Q17M/P190A/D198Q		++
173/174	K46V/P190A/P194E/D198Q		+
175/176	Q17M/I96V/P194E/D198Q		+

¹ Уровни повышенного превращения были определены по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 104 и были выражены как: "+" >4,0, "++" >8,0

Пример 12.

Клетки-хозяева *E. coli* для экспрессии, содержащие рекомбинантные гены KRED.

Исходные ферменты KRED, используемые для получения вариантов согласно изобретению, были взяты из коллекции Codexis коммерчески доступных наборов ферментов KRED. Во время начального скрининга, полипептид SEQ ID NO: 172 или полипептид SEQ ID NO: 270 продуцировал наибольшее количество продукта, как было определено с помощью ЖХ/МС. Гены, кодирующие KRED, клонировали в экспрессионный вектор SEQ ID NO: 413 или SEQ ID NO: 414, функционально связанные с промотором *lac* под контролем репрессора *lacI*. Экспрессионный вектор также содержит ориджин репликации P15a и ген резистентности к хлорамфениколу. Полученные плазмиды трансформировали в *E. coli* W3110 с

применением стандартных методов, известных специалистам в данной области. Трансформанты выделяли путем отбора клеток на резистентность к триклозану, как известно специалистам в данной области (см., например, патент США № 8383346 и WO 2010/144103).

Пример 13.

Приготовление сырых клеточных гранул, содержащих KRED НТР.

Клетки *E. coli*, содержащие рекомбинантные гены, кодирующие KRED, и выделенные из моноклональных колоний, инокулировали в 190 мкл среды LB, содержащей 1% глюкозы и 0,12 мкг/мл триклозана, в 96-луночных микротитрационных планшетах с мелкими лунками. Планшеты закрывали кислородопроницаемыми герметиками, и культуры выращивали в течение ночи при 20°C, 200 об/мин и при влажности 85%. Затем, 20 мкл каждой клеточной культуры переносили в лунки 96-луночных планшетов с глубокими лунками, содержащих 380 мкл ТВ и 30 мкг/мл САМ. Эти планшеты с глубокими лунками закрывали кислородопроницаемыми герметиками и инкубировали при 30°C, при 250 об/мин и при влажности 85% до достижения OD₆₀₀ 0,6-0,8. Затем, клеточные культуры индуцировали с помощью IPTG до конечной концентрации 1 мМ и инкубировали в течение ночи в тех же условиях, которые использовались ранее. Затем клетки осаждали центрифугированием при 4°C, 4000 об/мин в течение 10 мин. Супернатанты отбрасывали, а клеточный осадок замораживали при температуре -80°C, а затем подвергали лизису.

Пример 14.

Приготовление клеточных лизатов, содержащих KRED НТР.

Сначала, клеточный осадок, полученный, как описано в примере 2, подвергали лизису путем добавления 150 мкл буфера для лизиса, содержащего 100 мМ фосфата калия с pH 8 и 2 мМ MgSO₄ или 100 мМ фосфата калия с pH 8 вместе с 2 мМ MgSO₄, 1 г/л лизоцима и 0,5 г/л PMBS. Затем, клеточный осадок встряхивали при комнатной температуре в течение 2 часов на настольном шейкере. Планшеты центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин при 4°C для удаления клеточного дебриса. Затем, супернатанты использовали в биокаталитических реакциях для определения уровня их активности.

Пример 15.

Приготовление лиофилизированных лизатов из культур в шейкерных колбах (SF).

Процедуры с использованием шейкерных колб могут быть проведены для получения порошков сконструированного полипептида KRED (SFP), которые могут быть использованы для вторичного скрининга и/или в описанных здесь биокаталитических процессах. Приготовление ферментов в виде порошка в шейкерных колбах (SFP) обеспечивает получение более чистого препарата (например, до 30% от общего белка) сконструированного фермента по сравнению с клеточным лизатом, используемым в анализах НТР, а также позволяет использовать более концентрированные растворы ферментов. Для этого, выбранные культуры НТР, выращенные, как описано выше, высевали на планшеты с агаром LB с 1% глюкозы и 30 мкг/мл триклозана и культивировали в течение ночи при 37°C. Одну колонию из каждой культуры переносили в 6 мл LB с 1% глюкозой и 30 мкг/мл САМ. Культуры выращивали в течение 18 ч при 30°C и при 250 об/мин и субкультивировали приблизительно 1:50 в 250 мл ТВ, содержащей 0,12 мкг/мл триклозана, до конечной OD₆₀₀, равной 0,05. Культуры выращивали в течение приблизительно 3 часов при 30°C при 250 об/мин до OD₆₀₀, равной 0,8-1,0, и индуцировали 1 мМ IPTG. Затем, культуры выращивали в течение 20 ч при 30°C со скоростью 250 об/мин. Культуры центрифугировали (4000 об/мин в течение 20 мин при 4°C). Супернатант отбрасывали, а осадок ресуспендировали в 35 мл 50 мМ фосфата калия, pH 8, с 2 мМ MgSO₄. Ресуспендированные клетки центрифугировали (4000 об/мин в течение 20 мин при 4°C). Супернатант отбрасывали, а осадок ресуспендировали в 6 мл 50 мМ фосфата калия, pH 8, с 2 мМ MgSO₄, и клетки подвергали лизису с использованием дезинтегратора клеток от Constant Systems (One Shot). Лизаты осаждали (10000 об/мин в течение 60 мин при 4°C), а супернатанты замораживали и лиофилизировали для получения ферментов в шейкерных колбах (SF).

Пример 16.

Эволюция и скрининг сконструированных полипептидов, полученных из SEQ ID NO: 172, на повышенную активность KRED.

Полипептид SEQ ID NO: 172 был выбран в качестве исходного фермента на основании результатов скрининга вариантов на восстановление субстрата изо-α-кислоты. Библиотеки сконструированных генов были получены с использованием хорошо зарекомендовавших себя методов (например, мутагенеза с насыщением и рекомбинации ранее идентифицированных полезных мутаций). Полипептиды, кодируемые каждым геном, получали в виде НТР, как описано в примере 2, а растворимый лизат получали как описано в примере 3.

Сконструированный полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 172, обладающий активностью KRED, использовали для получения дополнительных сконструированных полипептидов, представленных в табл. 16-1. Эти полипептиды продемонстрировали улучшенное образование дигидро-(rho)-изо-α-кислот из изо-α-кислот по сравнению с исходным полипептидом. Сконструированные полипептиды были получены из "основной" аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 172 с

применением методов направленной эволюции, как описано выше, и с проведением анализа НТР, а также с применением аналитических методов, описанных ниже в табл. 16-1.

Направленная эволюция начиналась с полинуклеотида, представленного в SEQ ID NO: 171. Затем, сконструированные полипептиды были выбраны в качестве исходных "основных" генных последовательностей. Библиотеки сконструированных полипептидов были созданы с применением различных хорошо известных методов (например, мутагенеза с насыщением, рекомбинации ранее идентифицированных полезных аминокислотных различий) и подвергнуты скринингу с помощью НТР-анализа и методов анализа, которые позволяют определять способность полипептидов превращать субстраты изо- α -кислоты в желаемый продукт дигидро-(ρ hо)-изо- α -кислоты.

Ферментный анализ проводили в 96-луночном планшете с глубокими лунками с общим объемом 100 мкл на лунку, который включал 20% об./об. лизата фермента НТР, 40% об./об. 40 мас.% водного раствора субстрата изо- α -кислоты (раствора изомеризованного экстракта хмеля Isolone®, Kalsec) и 0,02 г/л NADP в 40 об.% изопропанола (IPA) в 100 мМ фосфата калия с pH 8 и 2 мМ MgSO₄. Планшеты герметично закрывали и инкубировали при 45°C со встряхиванием при 600 об/мин в течение 20-24 ч.

Через 20-24 ч добавляли 1000 мкл ацетонитрила с 0,1% уксусной кислоты. Планшеты герметично закрывали и центрифугировали при 4000 об/мин при 4°C в течение 10 мин. Гашеный образец дополнительно разводили 4-5 раз смесью ацетонитрил:вода 50:50 перед ВЭЖХ-анализом. Параметры ВЭЖХ-анализа описаны ниже в табл. 5-2.

Таблица 16-1

Активность варианта KRED по сравнению с SEQ ID NO:172

SEQ ID NO: (нк/а.к.)	Отличия аминокислот (по сравнению с SEQ ID NO: 172)	Кратное увеличение процента превращения (по сравнению с SEQ ID NO: 172) ¹
177/178	E204Q	+
179/180	I226V	+
181/182	D101Y	+
183/184	Y179M	+
185/186	D101R	++
187/188	A231G	+
189/190	P194E	+
191/192	E45L	+
¹ Уровни повышенной активности были определены по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 172 и были выражены как: "+" >1,0, но < 1,5, "++" \geq 1,5		

Пример 17.

Эволюция и скрининг сконструированных полипептидов, полученных из SEQ ID NO: 186, на повышенную активность KRED в отношении Транс-ISO.

Последовательность SEQ ID NO: 186 была выбрана в качестве исходного фермента на основании результатов скрининга вариантов на восстановление субстрата изо- α -кислоты. Библиотеки сконструированных генов были получены с использованием хорошо зарекомендовавших себя методов (например, мутагенеза с насыщением и рекомбинации ранее идентифицированных полезных мутаций). Полипептиды, кодируемые каждым геном, получали в виде НТР, как описано в примере 2, а растворимый лизат получали как описано в примере 3.

Сконструированный полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 185, обладающий активностью KRED, использовали для получения дополнительных сконструированных полипептидов, представленных в табл. 17-2. Эти полипептиды продемонстрировали улучшенное образование дигидро-(ρ hо)-изо- α -кислот из изо- α -кислот по сравнению с исходным полипептидом. Сконструированные полипептиды были получены из "основной" аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 186 с применением методов направленной эволюции, как описано выше, и с проведением анализа НТР, а также с применением аналитических методов, описанных ниже в табл. 5-2.

Направленная эволюция начиналась с полинуклеотида, представленного в SEQ ID NO: 185. Затем, сконструированные полипептиды были выбраны в качестве исходных "основных" генных последовательностей. Библиотеки сконструированных полипептидов были созданы с применением различных хорошо известных методов (например, мутагенеза с насыщением, рекомбинации ранее идентифицированных полезных аминокислотных различий) и подвергнуты скринингу с помощью НТР-анализа и методов анализа, которые позволяют определять способность полипептидов превращать субстраты изо- α -кислоты в желаемый продукт дигидро-(ρ hо)-изо- α -кислоты.

Ферментный анализ проводили в 96-луночном планшете с глубокими лунками с общим объемом 100 мкл на лунку, который включал 50% об./об. лизата фермента НТР, 10% об./об. 10 г/л SEQ ID NO:

186, 1 г/л субстрата изо- α -кислоты (раствора изомеризованного экстракта хмеля Isolone®, Kalsec) и 0,1 г/л NADP в 40 об.% изопропанола (IPA) в 100 мМ фосфата калия с pH 8 и 2 мМ MgSO₄. Планшеты герметично закрывали и инкубировали при 30°C со встряхиванием при 600 об/мин в течение 44-48 ч.

Через 20-24 ч добавляли 1000 мкл ацетонитрила с 0,1% уксусной кислоты. Планшеты герметично закрывали и центрифугировали при 4000 об/мин при 4°C в течение 10 мин. Гашеный образец дополнительно разводили 4-5 раз смесью ацетонитрил:вода 50:50 перед ВЭЖХ-анализом. Параметры ВЭЖХ-анализа описаны ниже в табл. 17-1. См. фиг. 3. Варианты, которые обладали повышенной активностью в отношении Транс-ISO, представлены в табл. 17-2.

Таблица 17-1

Параметры ВЭЖХ

Инструмент	ВЭЖХ-колонка Agilent 1100
Колонка	3×150 мм 2,1 мкм-колонка Waters Atlantis T3
Подвижная фаза	30% ацетонитрила в 50 мМ фосфата калия pH 8
Скорость потока	0,8 мл/минут
Время анализа	20 мин
Время удерживания пика	Соединение Время удерживания [мин] Примечание Rho-1 3,4 транс-со-Rho Rho-2 4,8 цис-со-Rho Rho-3 5,4 транс-п/ad-Rho Rho-4 7,0 смесь изомеров Rho Rho-5 7,3 смесь изомеров Rho Rho-6 7,7 цис-п/ad-Rho ISO-1 9,0 цис-со-ISO ISO-2 10,2 транс-со-ISO Rho-7 12,5 транс-п/ad-Rho ISO-3 15,1 цис-п/ad-ISO ISO-4 17,4 транс-п/ad-ISO
Температура колонки	40°C
Объем впрыска	10 мкл
детекция	270 нм

Таблица 17-2

Активность варианта KRED по сравнению с вариантом транс-ISO с повышенной активностью

SEQ ID NO: (нк/а.к.)	Отличия аминокислот (по сравнению с SEQ ID NO: 186)	Активность в отношении транс-ISO ¹
193/194	D150A/L153A/M205A/L211A	+
195/196	D150A/L153A/L211A	+
197/198	V95A/K97A/D150A/L153A	+
199/200	V95A/D150A/L153A/M205A/L211A	+
201/202	K97A/D150A/L153A	+
203/204	M145A/L153A/L211A	+
205/206	I96A/D150A/L153A	+
207/208	K97A/D150A/L153A/M205A/L211A	+
209/210	V95A/D150A/L153A/M205A/M206A/L211A	+
211/212	K97A/D150A/L153A/M205A	+
213/214	D150A/L153A/M206A/L211A	+
215/216	D150A/L153A/M206A/L211A	+
217/218	V95A/I96A/K97A/D150A/L153A/M205A	+
219/220	V95A/K97A/S143A/M145A/D150A/L153A/W202A/M205A	+
221/222	K97A/D150A/L153A/M206A	+

223/224	V95A/K97A/D150A/L153A/W202A/M205A/M206A	+
225/226	S143A/I144A/M145A/D150A/L153A/W202A/M205A/W249A	+
227/228	S143A/M145A/D150A/L153A	+
229/230	V95A/K97A/S143A/M145A/D150A/L153A/W249A	+
231/232	I96A/D150A/L153A/M206A	+
233/234	I144A/D150A/L153A/W202A/M205A/M206A	+
235/236	V95A/I96A/D150A/L153A/M205A/M206A/L211A/W249A	+
237/238	V95A/D150A/L153A/M206A/W249A	+
239/240	I144A/M145A/D150A/L153A/M205A/M206A	+
241/242	M145A/D150A/L153A/M206A/W249A	+
243/244	D150A/L153A/W249A	+
245/246	I144A/D150A/L153A	+
247/248	D150A/L153A/W202A/M206A/W249A	+
249/250	V95A/D150A/L153A/M206A/W249A	+
¹ SEQ ID NO: 186 показала отсутствие какой-либо детектируемой активности в отношении транс-ISO		

Пример 18.

Эволюция и скрининг сконструированных полипептидов, полученных из SEQ ID NO:186, на повышенную активность KRED.

Как описано в примере 16, библиотеки сконструированных генов были получены с использованием хорошо зарекомендовавших себя методов (например, мутагенеза с насыщением и рекомбинации ранее идентифицированных полезных мутаций). Полипептиды, кодируемые каждым геном, получали в виде НТР, как описано в примере 2, а растворимый лизат получали как описано в примере 3.

Сконструированный полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 186 (то есть SEQ ID NO: 185), обладающий активностью KRED, использовали для получения дополнительных сконструированных полипептидов с улучшенными свойствами, представленных в табл. 18-1.

Таблица 18-1

Активность варианта KRED по сравнению с SEQ ID NO:186

SEQ ID NO: (нк/а.к.)	Отличия аминокислот (по сравнению с SEQ ID NO: 186)	Кратное увеличение процента превращения (по сравнению с SEQ ID NO: 186) ¹
251/252	I110V/Y179M/P194E	++
253/254	I110V	++
255/256	T103R/L147I	++
257/258	I110V	++
259/260	H7Q/L147I	+
261/262	W249Y	+
263/264	L147I	+
¹ Уровни повышенной активности были определены по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO:186 и были выражены как: "+" > 1,2, но < 1,5, "++" ≥ 1,5		

Пример 19.

Эволюция и скрининг сконструированных полипептидов, полученных из SEQ ID NO: 194 и 252, на повышенную активность KRED при высокой концентрации субстрата и низкой концентрации NADP.

Исходный раствор фермента в концентрации 200 г/л приготавливали путем растворения 100 мг порошка фермента в 500 мкл 100 мМ фосфатно-калиевого буфера с pH 8 с 2 мМ MgSO₄ и 0,1 г/л NADP. В лунку 96-луночного планшета с глубокими лунками добавляли 40 мкл исходного раствора фермент/NADP, 80 мкл изопропанола и 80 мкл 40 мас.% водного раствора изо-α-кислот. Конечный состав реакционной смеси составлял 40 г/л фермента, 160 г/л изо-α-кислот и 0,02 г/л NADP в 40% IPA. Планшет герметично закрывали и инкубировали при 40°C в течение 24 ч, а затем реакцию гасили и анализировали с помощью ВЭЖХ-УФ. Данные представлены в табл. 19-1, 19-2 и 19-3.

Активность варианта KRED по сравнению с SEQ ID NO:194

SEQ ID NO: (нк/а.к.)	Отличия аминокислот (по сравнению с SEQ ID NO: 194)	Кратное увеличение процента превращения (по сравнению с SEQ ID NO: 194) ¹
265/266	V12I/K72S/I110V/L147I/T152M/E204Q	++
267/268	V12I/K72S/R101Y/T103Q/I110V/T152M/W249Y	++
269/270	E45L/T54S/K72S/I110V/T152M/P194E/E204Q	++
271/272	V12I/T54S/K72T/I110V/A150D/T152M/A153L/P194E/A205M/A211L/W249Y	++
273/274	I110V/A150D/A153L/Y179M/P194E/A205M/A211L/W249Y	+
275/276	H7Q/V12I/T54S/I110V/A150D/A153L/P194E/A205M/A211L/W249Y	+
277/278	K72S/I110V/L147M/A150D/T152M/A153L/P194E/A205M/A211L/W249Y	+

¹Уровни повышенной активности были определены по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO:194 и были выражены как: "+" >1,2, но <1,5, "++" ≥1,5

Таблица 19-2

Активность варианта KRED по сравнению с SEQ ID NO:252

SEQ ID NO: (нк/а.к.)	Отличия аминокислот (по сравнению с SEQ ID NO: 252)	Кратное увеличение процента превращения (по сравнению с SEQ ID NO: 252) ¹
277/278	K72S/L147M/T152M/M179Y/W249Y	+++
275/276	H7Q/V12I/T54S/M179Y/W249Y	+++
271/272	V12I/T54S/K72T/T152M/M179Y/W249Y	++++
273/274	W249Y	++
279/280	H40E	+
281/282	T54S/K72S	+
283/284	H7Q/T152M	++

¹Уровни повышенной активности были определены по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 252 и были выражены как: "+" >1,2 но < 1,5, "++" >1,5, "+++ " >1,5 но < 2,0; "++++" > 2,0

Таблица 19-3

Активность KRED при высокой концентрации субстрата и низкой концентрации NADPH

SEQ ID NO: (нк/а.к.)	% превращения					
	40 г/л	20 г/л	10 г/л	5 г/л	2,5 г/л	1,25 г/л
193/194	43	26	17	7	2	1
251/252	42	30	23	12	5	1
269/270	47	30	22	11	5	2
271/272	48	33	31	25	14	7

Пример 20.

Эволюция и скрининг сконструированных полипептидов, полученных из SEQ ID NO: 270 и 272, на

повышенную активность KRED при высокой концентрации субстрата и низкой концентрации NADP.

Как описано в примере 18, библиотеки сконструированных генов были получены с использованием хорошо зарекомендовавших себя методов (например, мутагенеза с насыщением и рекомбинации ранее идентифицированных полезных мутаций). Полипептиды, кодируемые каждым геном, получали в виде НТР, как описано в примере 2, а растворимый лизат получали как описано в примере 3.

Сконструированные полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, обладающие активностью KRED, SEQ ID NO: 270 (то есть SEQ ID NO: 269) и 272 (то есть SEQ ID NO: 271), использовали для получения дополнительных сконструированных полипептидов с улучшенными свойствами, представленных в табл. 20-1 и 20-2.

Таблица 20-1

Активность варианта KRED по сравнению с SEQ ID NO: 270

SEQ ID NO: (нк/а.к.)	Отличия аминокислот (по сравнению с SEQ ID NO: 270)	Кратное увеличение процента превращения (по сравнению с SEQ ID NO: 270) ¹
285/286	A150Y/M152A	++
287/288	A150Y/M152S	++
289/290	E194S/R195A	+
291/292	G92A/I93E	+
293/294	A150D/M152A/A153L	+

¹ Уровни повышенной активности были определены по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 270 и были выражены как: "+" >1,2, но <1,5, "++" ≥1,5

Таблица 20-2

Активность варианта KRED по сравнению с SEQ ID NO: 272

SEQ ID NO: (нк/а.к.)	Отличия аминокислот (по сравнению с SEQ ID NO: 272)	Кратное увеличение процента превращения (по сравнению с SEQ ID NO: 272) ¹
295/296	I93D/V95R	+++
297/298	I93A/V95K/K109R	++++
299/300	I93A/V95R/K109D/N114T	++++
301/302	I93R/V95A/N114T	+++
303/304	I93M	++
305/306	I93E/K109R/N114A	++
307/308	N114A	+
309/310	G92A/I93D/V95R	++

¹ Уровни повышенной активности были определены по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 272 и были выражены как: "+" >1,2 но <1,5, "++" >1,5, "+++>1,5 но < 2,0; "++++" > 2,0

Пример 21.

Эволюция и скрининг сконструированных полипептидов, полученных из SEQ ID NO: 286, на повышенную активность KRED при высокой концентрации субстрата и низкой концентрации NADP.

Как описано в примере 18, библиотеки сконструированных генов были получены с использованием хорошо зарекомендовавших себя методов (например, мутагенеза с насыщением и рекомбинации ранее идентифицированных полезных мутаций). Полипептиды, кодируемые каждым геном, получали в виде НТР, как описано в примере 2, а растворимый лизат получали как описано в примере 3.

Сконструированные полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, обладающие активностью KRED, SEQ ID NO: 286 (то есть SEQ ID NO: 285), использовали для получения дополнительных сконструированных полипептидов с улучшенными свойствами, представленных в табл. 21-1.

Таблица 21-1

Активность варианта KRED по сравнению с SEQ ID NO: 286

SEQ ID NO: (нк/а.к.)	Отличия аминокислот (по сравнению с SEQ ID NO: 286)	Кратное увеличение процента превращения (по сравнению с SEQ ID NO: 286)
-------------------------	---	---

311/312	I96A	+
313/314	M145A/Y150A	+
315/316	V12I/L45E/W249Y	++
317/318	L45E/W249Y	++
319/320	L45E/K109D/W249Y	+++
321/322	L45E/S72T/W249Y	++
323/324	V12I/L45E/I93A/W249Y	++
325/326	V12I/K109D/W249Y	++
327/328	V12I/L45E/S72T/K109D/W249Y	+++
¹ Уровни повышенной активности были определены по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 272 и были выражены как: "+" >1,2 но <1,5, "++" >1,5, "+++" >1,5 но <2,0; "++++" >2,0		

Пример 22.

Эволюция и скрининг сконструированных полипептидов, полученных из SEQ ID NO: 328, на повышенную активность KRED.

Последовательность SEQ ID NO: 328 была выбрана в качестве исходного фермента на основании результатов скрининга вариантов на восстановление субстрата изо- α -кислоты. Библиотеки сконструированных генов были получены с использованием хорошо зарекомендовавших себя методов (например, мутагенеза с насыщением и рекомбинации ранее идентифицированных полезных мутаций). Полипептиды, кодируемые каждым геном, получали в виде НТР, как описано в примере 2, а растворимый лизат получали как описано в примере 3.

Сконструированный полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 327, обладающий активностью KRED, использовали для получения дополнительных сконструированных полипептидов, представленных в табл. 22-1. Эти полипептиды продемонстрировали улучшенное образование дигидро-(rho)-изо- α -кислот из изо- α -кислот по сравнению с исходным полипептидом. Сконструированные полипептиды были получены из "основной" аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 328 с применением методов направленной эволюции, как описано выше, и с проведением анализа НТР, а также с применением аналитических методов, описанных ниже в табл. 5-2.

Направленная эволюция начиналась с полинуклеотида, представленного в SEQ ID NO: 327. Затем, сконструированные полипептиды были выбраны в качестве исходных "основных" генных последовательностей. Библиотеки сконструированных полипептидов были созданы с применением различных хорошо известных методов (например, мутагенеза с насыщением, рекомбинации ранее идентифицированных полезных аминокислотных различий) и подвергнуты скринингу с помощью НТР-анализа и методов анализа, которые позволяют определять способность полипептидов превращать субстраты изо- α -кислоты в желаемый продукт дигидро-(rho)-изо- α -кислоты.

Ферментный анализ проводили в 96-луночном круглодонном планшете с общим объемом 200 мкл на лунку, который включал 20% об./об. лизата фермента НТР, 10% об./об. 40 мас.% водного раствора субстрата изо- α -кислоты (раствора изомеризованного экстракта хмеля Isolone®, Kalsec) и 0,02 г/л NADP в 40 об.% изопропанола (IPA) в 100 мМ фосфата калия с pH 8 и 2 мМ MgSO₄. Планшеты герметично закрывали и инкубировали при 45°C со встряхиванием при 600 об/мин в течение 20-24 ч.

Через 20-24 ч добавляли 1000 мкл ацетонитрила с 0,1% уксусной кислоты. Планшеты герметично закрывали и центрифугировали при 4000 об/мин при 4°C в течение 10 мин. Гашеный образец дополнительно разводили 4-5 раз смесью ацетонитрил:вода 50:50 перед ВЭЖХ-анализом. Параметры ВЭЖХ-анализа описаны ниже в табл. 5-2 и 17-1. Варианты с улучшенными свойствами представлены в табл. 22-1.

Таблица 22-1

Активность варианта KRED по сравнению с SEQ ID NO: 328

SEQ ID NO: (нк/а.к.)	Отличия аминокислот (по сравнению с SEQ ID NO: 328)	Кратное увеличение процента превращения (по сравнению с SEQ ID NO: 328) ¹
329/330	Y150A/R195S	+++
331/332	Y150A	+++
333/334	R195S	++
335/336	R195A	+
337/338	R195S	+
339/340	Y150A/P151A	+

341/342	Y150A/R195S	+
¹ Уровни повышенной активности были определены по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 328 и были выражены как: "+" >1,2 но <1,5, "++" >1,5, "+++" >1,5 но < 2,0; "++++" > 2,0		

Пример 23.

Эффективность SEQ ID NO: 328 и SEQ ID NO: 330 при высоких загрузках субстрата и низких загрузках NADP.

Образец 8 г 40 мас.% водного раствора ISO растворяли в 8 мл изопропанола (IPA) и 2 мл 100 мМ фосфатно-калиевого буфера с pH 8. pH доводили до 8 путем добавления 4 н NaOH и/или 10% H₃PO₄. 4,5 мл раствора ISO/IPA/буфера с отрегулированным pH добавляли в закрытые перегородкой флаконы со стержневой мешалкой в атмосфере азота в нагревательном блоке при 40°C. 0,5 мл 10 или 40 г/л KRED в 100 мМ фосфатно-калиевого буфера при pH 8 вместе с 10 мМ MgSO₄ и 0,2 г/л NADP добавляли к растворам (конечные загрузки KRED и NADP составляли 1 или 4 г/л KRED и 0,02 г/л NADP, соответственно). Через различные промежутки времени, из реакционной смеси с помощью шприца отбирали аликвоты по 20 мкл, а затем реакцию гасили 1000 мкл смеси ацетонитрила/воды 1:1 с 0,1% уксусной кислотой. После центрифугирования при 4000 об/мин при 20°C в течение 5 мин, 20 мкл супернатантов разводили 180 мкл смеси ацетонитрила/воды 1:1 с 0,1% уксусной кислоты для ВЭЖХ-анализа (табл. 5-2 и табл. 17-1). См. фиг. 4.

Пример 24.

Эволюция и скрининг сконструированных полипептидов, полученных из SEQ ID NO: 330, на повышенную активность KRED.

Последовательность SEQ ID NO: 330 была выбрана в качестве исходного фермента на основании результатов скрининга вариантов на восстановление субстрата изо-α-кислоты. Библиотеки сконструированных генов были получены с использованием хорошо зарекомендовавших себя методов (например, мутагенеза с насыщением и рекомбинации ранее идентифицированных полезных мутаций). Полипептиды, кодируемые каждым геном, получали в виде НТР, как описано в примере 2, а растворимый лизат получали как описано в примере 3.

Сконструированный полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 329, обладающий активностью KRED, использовали для получения дополнительных сконструированных полипептидов, представленных в табл. 24-1. Эти полипептиды продемонстрировали улучшенное образование дигидро-(rho)-изо-α-кислот из изо-α-кислот по сравнению с исходным полипептидом. Сконструированные полипептиды были получены из "основной" аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 330 с применением методов направленной эволюции, как описано выше, и с проведением анализа НТР, а также с применением аналитических методов, описанных ниже в табл. 24-1.

Направленная эволюция начиналась с полинуклеотида, представленного в SEQ ID NO: 329. Затем, сконструированные полипептиды были выбраны в качестве исходных "основных" генных последовательностей. Библиотеки сконструированных полипептидов были созданы с применением различных хорошо известных методов (например, мутагенеза с насыщением, рекомбинации ранее идентифицированных полезных аминокислотных различий) и подвергнуты скринингу с помощью НТР-анализа и методов анализа, которые позволяют определять способность полипептидов превращать субстраты изо-α-кислоты в желаемый продукт дигидро-(rho)-изо-α-кислоты.

Ферментный анализ проводили в круглодонном 96-луночном планшете с общим объемом 200 мкл на лунку, который включал 50% об./об. лизата фермента НТР, 10% об./об. 40 мас.% водного раствора субстрата изо-α-кислоты (раствора изомеризованного экстракта хмеля Isolone®, Kalsec) и 0,02 г/л NADP в 40 об.% изопропанола (IPA) в 100 мМ фосфата калия с pH 8 и 2 мМ MgSO₄. Планшеты герметично закрывали и инкубировали при 45°C со встряхиванием при 600 об/мин. в течение 20-24 ч.

Таблица 24-1

Активность варианта KRED по сравнению с SEQ ID NO: 330

SEQ ID NO: (нк/а.к.)	Отличия аминокислот (по сравнению с SEQ ID NO: 330)	Кратное увеличение процента превращения (по сравнению с SEQ ID NO: 330) ¹
343/344	V95R/S195R	++
345/346	I93A/S195R	++
347/348	I93A/V95R/M145A/S195R	+
349/350	I93A/D109K/N114T/M145A/S195R	++
351/352	M145A/S195A	+
353/354	S195R	+
355/356	T72K/A152M/S195R	++

357/358	I12V/T72S/D109K/S195R	++
359/360	T72S/D109K/A152M/S195R	++
361/362	T72S/D109K/S195R	++
363/364	T72K/S195R	+
365/366	I93A	+
367/368	E194N	+
369/370	E194N/E200P	+
371/372	E200P	+
373/374	E79A	+
375/376	I96P/E194N/E200P	+
377/378	I96P/R108S/L147I/E200P	+
379/380	K192R	+
381/382	L147I	+
383/384	L147I/E200P	+
385/386	L73V	+
387/388	L73V/L147I	+
389/390	M17A/L115Q	+
391/392	M17A/L73V/E200P	+
393/394	Q198G	+
395/396	Q198R	+
397/398	A68R/T72D/R101Q/A152Q/A205L	+
399/400	A68E/T72D/R101K/A152Q/A205L	+
401/402	R101M/A205L	+
403/404	A68R/T72R/L124E	+
405/406	A68R/T72R/L124E/A152Q	+
407/408	T72D/A152Q	+
409/410	A68R/L124E/A205L	+
411/412	A68R/R101Q/L124E/A152Q/A205L	+
¹ Уровни повышенной активности были определены по сравнению с эталонным полипептидом SEQ ID NO: 330 и были выражены как: "+" >1,2, но < 1,5, "++" >1,5, "+++" >1,5 но <2,0, "++++" >2,0		

Пример 25.

Эффективность SEQ ID NO: 270, SEQ ID NO: 328, SEQ ID NO: 330, SEQ ID NO: 348, SEQ ID NO: 346 и SEQ ID NO: 356 при высоких нагрузках субстрата и низких нагрузках NADP.

Образец 80 мг каждого варианта растворяли в 1 мл исходного раствора NADP, состоящего из 10 мг NADP в 100 мл 100 мМ фосфата калия при pH 9 и 10 мМ MgSO₄. Исходный раствор подвергали 5 последовательным разведениям 1:1 с получением исходного раствора фермента с концентрацией 80, 40, 20, 10 и 5 г/л в исходном растворе NADP. Аликвоту 20 мкл исходного раствора добавляли к 40 мкл 40 мас.% раствора ISO и 40 мкл IPA в круглодонном планшете с получением конечной композиции, состоящей из 160 г/л ISO в 40% по объему IPA в 20 мМ фосфата калия pH 8 и 2 мМ MgSO₄ с 0,02 г/л NADP. Конечные концентрации фермента составляли 16, 8, 4, 2 и 1 г/л, соответственно. Планшеты герметично закрывали и помещали в шейкер при 40°C и 600 об/мин на 24 ч. Через 24 ч, планшеты центрифугировали при 4000 об/мин. при 20°C в течение 10 мин, и 100 мкл супернатанта переносили в 1 мл смеси ацетонитрила/воды 1:1 с 0,1% уксусной кислоты в планшете с глубокими лунками. Планшеты с глубокими лунками, содержащие погашенную реакционную смесь, центрифугировали при 4000 об/мин при 20°C в течение 10 мин, и 5 мкл супернатанта переносили в 200 мкл смеси ацетонитрила/воды 1:1 с 0,1% уксусной кислотой для ВЭЖХ-анализа как показано в Таблицах 5-2 и 17-1. См. фиг. 5.

Все публикации, патенты, патентные заявки и другие документы, цитируемые в настоящей заявке, в полном объеме и во всех целях включены в настоящее описание посредством ссылки, так, как если бы каждая отдельная публикация, патент, патентная заявка или другой документ были отдельно включены в настоящее описание посредством ссылки во всех целях.

Хотя в настоящем изобретении были проиллюстрированы и описаны различные конкретные варианты его осуществления, однако, следует отметить, что в них могут быть внесены различные изменения, не выходящие за рамки существа и объема изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Сконструированный вариант кеторедуктазы, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична SEQ ID NO: 4, и содержащий по меньшей мере одну замену 196K или набор замен 196K и 145M, где указанные положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 4.

2. Сконструированный вариант кеторедуктазы по п.1, где указанный сконструированный вариант кеторедуктазы содержит набор замен 196K/145M, где указанные положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 4.

3. Сконструированный вариант кеторедуктазы, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична SEQ ID NO: 80, и содержащий по меньшей мере одну замену или набор замен, выбранных из 194E, 190A/194E и 110V, где указанные положения пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 80, дополнительно содержащий замену 196K, где указанное положение пронумеровано по отношению к SEQ ID NO: 4.

4. Сконструированный вариант кеторедуктазы по любому из пп.1-3, содержащий полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 4, 6, 80, 104, 172, 186, 194, 252, 270, 272, 286, 328 и/или 330.

5. Сконструированный вариант кеторедуктазы по любому из пп.1-4, содержащий полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 4, 6, 80, 104, 172, 186, 194, 252, 270, 272, 286, 328 и/или 330.

6. Сконструированный вариант кеторедуктазы по любому из пп.1-5, содержащий полипептидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, 80, 104, 172, 186, 194, 252, 270, 272, 286, 328 или 330.

7. Сконструированный вариант кеторедуктазы по любому из пп.1-6, где указанная сконструированная кеторедуктаза содержит полипептидную последовательность, кодирующую вариант, представленный в табл. 5-1, 6-1, 7-1, 8-1, 10-1, 11-1, 16-1, 17-2, 18-1, 19-1, 19-2, 20-1, 20-2, 21-1, 22-1 или 24-1.

8. Сконструированный вариант кеторедуктазы по любому из пп.1-7, где указанная сконструированная кеторедуктаза содержит полипептидную последовательность, выбранную из последовательностей с четными номерами, представленных в SEQ ID NO: 6-412.

9. Сконструированный вариант кеторедуктазы по любому из пп.1-8, где сконструированный кеторедуктазный полипептид способен превращать один или более субстратов изо- α -кислоты в один или более соответствующих продуктов дигидро-(rho)-изо- α -кислот.

10. Сконструированный вариант кеторедуктазы по любому из пп.1-9, который способен превращать один или более субстратов изо- α -кислоты в один или более соответствующих продуктов дигидро-(rho)-изо- α -кислоты с активностью, которая по меньшей мере в 10 раз превышает активность эталонного полипептида SEQ ID NO: 4.

11. Сконструированный вариант кеторедуктазы по любому из пп.1-10, где указанная сконструированная кеторедуктаза обладает улучшенным свойством по сравнению с кеторедуктазой SEQ ID NO: 4, при этом улучшенное свойство представляет собой высокую активность.

12. Сконструированный вариант кеторедуктазы по п.11, где улучшенное свойство включает более высокую активность превращения изо- α -кислот в соответствующие дигидро-(rho)-изо- α -кислоты по сравнению с кеторедуктазой SEQ ID NO: 4.

13. Сконструированный вариант кеторедуктазы по любому из пп.11, 12, где улучшенное свойство включает более высокую активность при высоких концентрациях субстрата по сравнению с кеторедуктазой SEQ ID NO: 4.

14. Сконструированный вариант кеторедуктазы по любому из пп.11-13, где улучшенное свойство включает более высокую активность при низких концентрациях кофактора по сравнению с кеторедуктазой SEQ ID NO: 4.

15. Сконструированная полинуклеотидная последовательность, кодирующая сконструированный вариант кеторедуктазы по любому из пп.1-14.

16. Вектор, содержащий сконструированную полинуклеотидную последовательность по п.15.

17. Вектор по п.16, дополнительно содержащий по меньшей мере одну регуляторную последовательность.

18. Вектор по п.16 или 17, где указанный вектор содержит SEQ ID NO: 413 или 414.

19. Клетка-хозяин, содержащая вектор по любому из пп.16, 17 и/или 18.

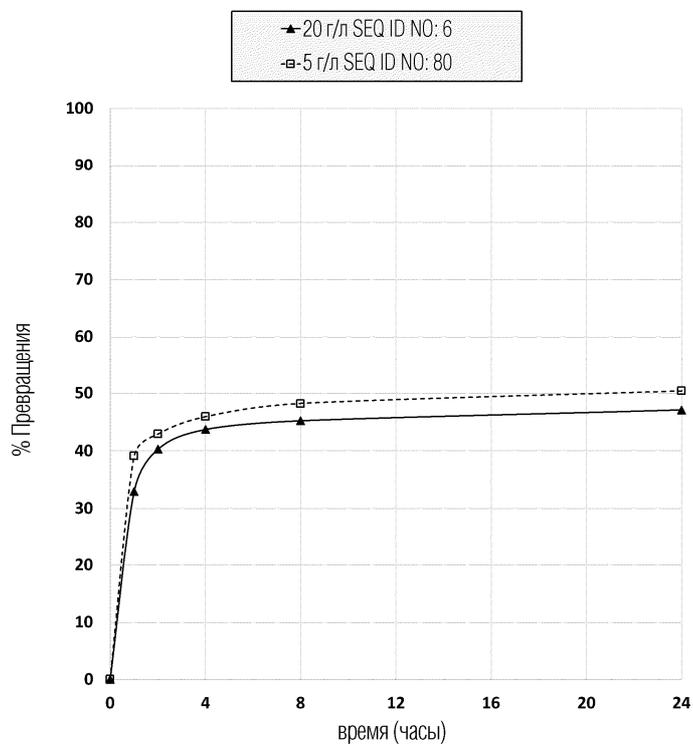
20. Способ получения сконструированного варианта кеторедуктазы по любому из пп.1-14, включающий культивирование указанной клетки-хозяина по п.19 в условиях, при которых указанный сконструированный вариант кеторедуктазы продуцируется указанной клеткой-хозяином.

21. Способ по п.20, дополнительно включающий стадию выделения указанного сконструированно-

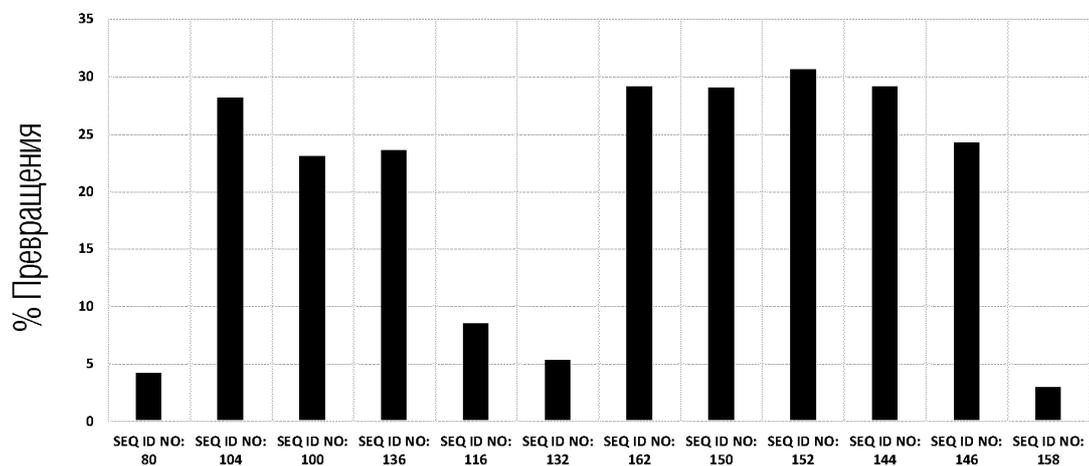
го варианта кеторедуктазы, продуцируемого указанной клеткой-хозяином.

22. Способ по п.20 и/или 21, где сконструированный вариант кеторедуктазы продуцируется клеткой-хозяином, содержащей вектор SEQ ID NO: 413 или 414.

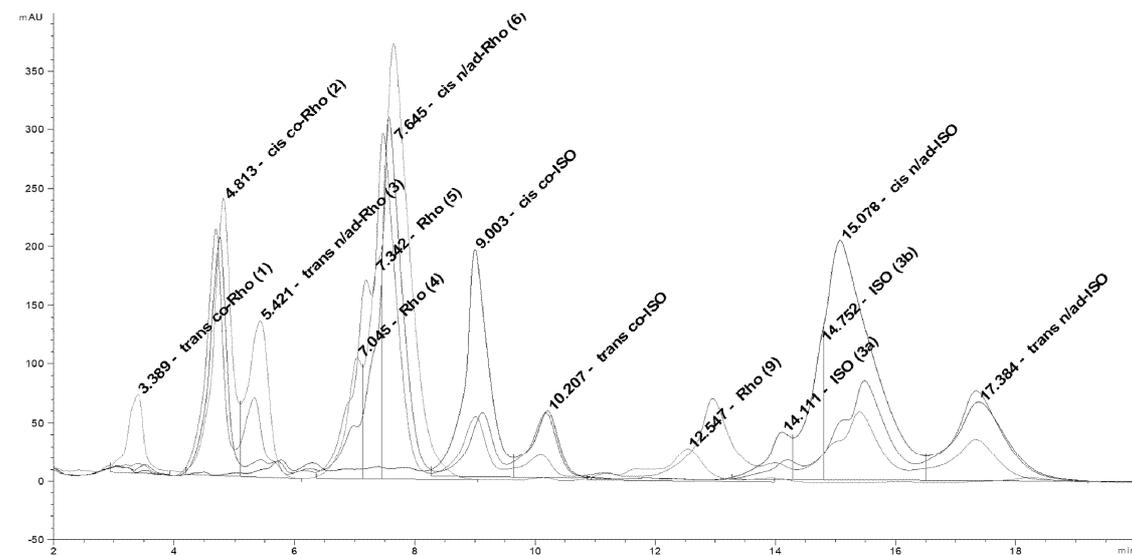
23. Композиция, обладающая активностью кеторедуктазы, содержащая по меньшей мере один сконструированный вариант кеторедуктазы по любому из пп.1-14.



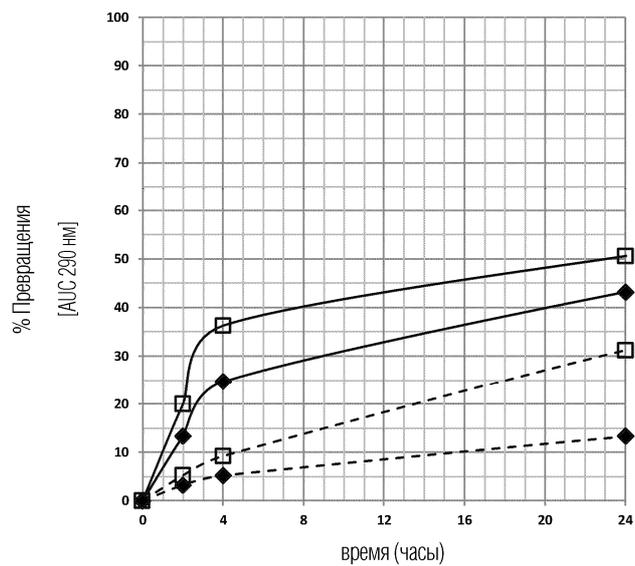
Фиг. 1



Фиг. 2

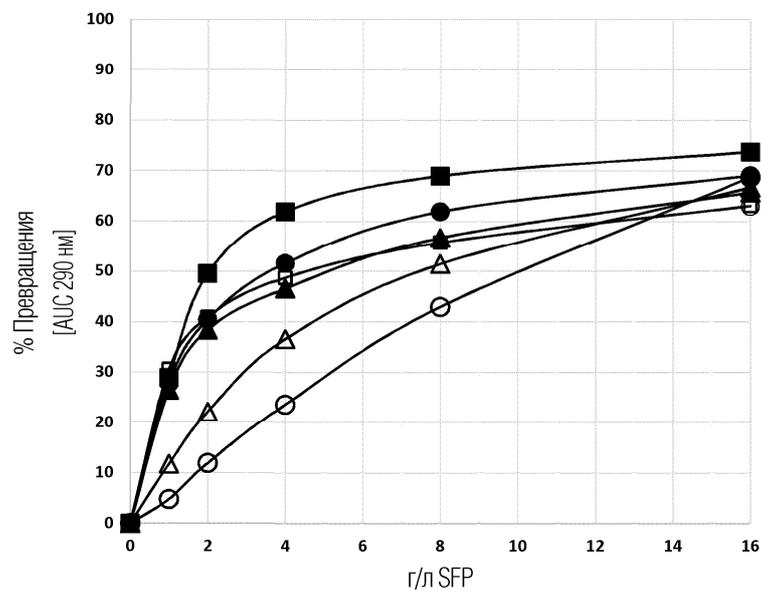


Фиг. 3



Фиг. 4

160 г/л ISO в 40% IPA при 40°C в течение 24 часов в 20 мМ
KPO4 при pH 8 вместе с 2 мМ MgSO4 и 0,02 г/л NADP
200 мкл Rх в круглодонном 250 мкл-планшете на воздухе



Фиг. 5



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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