



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21)(22) Заявка: 2012126131/10, 24.11.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

25.11.2009 US 61/264,608;

16.06.2010 US 61/355,511

(43) Дата публикации заявки: 27.12.2013 Бюл. № 36

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 25.06.2012

(86) Заявка РСТ:

US 2010/058098 (24.11.2010)

(87) Публикация заявки РСТ:

WO 2011/066457 (03.06.2011)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр.3, ООО  
"Юридическая фирма Городисский и Партнеры"

(71) Заявитель(и):

**КОДЕКСИС, ИНК. (US)**

(72) Автор(ы):

**ЯН Цзе (US),****ЧЖАН Сиюнь (US),****АНДОР Аттила (US)****(54) РЕКОМБИНАНТНЫЕ ВАРИАНТЫ  $\beta$ -ГЛЮКОЗИДАЗЫ ДЛЯ ПРОДУКЦИИ РАСТВОРИМЫХ САХАРОВ ИЗ ЦЕЛЛЮЛОЗНОЙ БИОМАССЫ****(57) Формула изобретения**

1. Вариант  $\beta$ -глюкозидазы (Bgl1), который идентичен, по меньшей мере, на 70% по аминокислотным остаткам 20-870 SEQ ID NO:2 и включает аминокислотную замену в положении Q291, аминокислотную замену в положении D369 и аминокислотную замену в положении E402, как определено по отношению к SEQ ID NO:2, где замена Q291 представляет собой W, A или F; замена D369 представляет собой L, Y, V, A, H, R, F, E, M, I, K, C, P или Q; и замена E402 представляет собой N.

2. Вариант Bgl1 по п.1, где аминокислотная замена в положении Q291 представляет собой W, а аминокислотная замена в положении D369 представляет собой L, H, R или Y.

3. Вариант Bgl1 по п.2, где аминокислотная замена в положении D369 представляет собой L.

4. Вариант Bgl1 по любому из пп.1-3, который относительно природного C1 Bgl1, включающего аминокислоты 20-870 SEQ ID NO:2, обладает

а) по меньшей мере, в 5 раз более высокой термоактивностью приблизительно при pH 5 и приблизительно 65°C, или

б) по меньшей мере, в 3 раза более высокой термостабильностью приблизительно при pH 5 и приблизительно 65°C, или

с) как (а), так и (б).

5. Вариант Bgl1 по п.1, дополнительно включающий, по меньшей мере, одну аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из Q258, Q313, S434, A475, K495 и G628.
6. Вариант Bgl1 по п.5, где замена в Q258 представляет собой N или H, замена в Q313 представляет собой M, замена в S434 представляет собой P, замена в A475 представляет собой L, замена в K495 представляет собой N и замена в G628 представляет собой W.
7. Вариант Bgl1 по п.6, где вариант включает замены Q258N, Q291W, Q313M, D369R, E402N, S434P, K495N и G628W.
8. Вариант Bgl1 по любому из пп.1-3 или 5-7, который относительно варианта 3 C1 Bgl1 (SEQ ID NO:5) обладает
  - а) по меньшей мере, в 6 раз более высокой термоактивностью приблизительно при рН 5 и приблизительно 70°C, или
  - б) по меньшей мере, в 3 раза более высокой термостабильностью приблизительно при рН 5 и приблизительно 65°C, или
  - с) как (а), так и (б).
9. Вариант Bgl1 по п.6, где вариант включает, по меньшей мере, одну замену в положении, выбранном из группы, состоящей из A689 и Y715.
10. Вариант Bgl1 по п.9, где замена представляет собой A689I или Y715P.
11. Вариант Bgl1 по п.10, где вариант включает замены Q258N, Q291W, Q313M, D369R, E402N, S434P, K495N, G628W, A689I и Y715P.
12. Вариант Bgl1 по пп.1-3, 5-7 или 9-11, который относительно варианта 269 C1 Bgl1 (SEQ ID NO:7) обладает
  - а) по меньшей мере, в 4 раза более высокой термоактивностью приблизительно при рН 4,5 и приблизительно 70°C, или
  - б) по меньшей мере, в 2 раза более высокой термостабильностью приблизительно при рН 4,5 и приблизительно 70°C, или
  - с) как (а), так и (б).
13. Вариант Bgl1 по п.10, дополнительно включающий, по меньшей мере, одну аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из D47, A343 и T687.
14. Вариант Bgl1 по п.13, где замена представляет собой D47I, A343C или T687W/K/C.
15. Вариант Bgl1 по п.14, где замена представляет собой T687K.
16. Вариант Bgl1 по п.14, где вариант включает замены D47I, Q258N, Q291W, Q313M, A343C, D369R, E402N, S434P, K495N, G628W, T687K, A689I и Y715P.
17. Вариант Bgl1 по пп.1-3, 5-7, 9-11 или 13-16, который относительно варианта 481 Bgl1 (SEQ ID NO:9) обладает
  - а) по меньшей мере, в 4 раза более высокой термоактивностью приблизительно при рН 4,2 и приблизительно 70°C, или
  - б) по меньшей мере, в 4 раза более высокой термостабильностью приблизительно при рН 4,5 и приблизительно 70°C, или
  - с) как (а), так и (б).
18. Вариант Bgl1 по п.10, дополнительно включающий, по меньшей мере, одну аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из I106, V260, F314 и A732.
19. Вариант Bgl1 по п.18, где замена представляет собой I106V, V260G, F314L/V или A732G/M/V.
20. Вариант Bgl1 по п.19, где замена представляет собой F314L или A732G.
21. Вариант Bgl1 по п.19, где вариант включает замены I106V, Q258N, V260G, Q291W, Q313M, F314L/V, D369R, E402N, S434P, K495N, G628W, A689I, Y715P и A732G.

22. Вариант Bgl1 по пп.1-3, 5-7, 9-11, 13-16 или 18-21, который относительно варианта 481 C1 Bgl1 (SEQ ID NO:9) обладает

а) по меньшей мере, в 2 раза более высокой термоактивностью приблизительно при рН 4 и приблизительно 70°C, или

б) по меньшей мере, в 1,1 раза более высокой термостабильностью приблизительно при рН 4,5 и приблизительно 70°C, или

с) как (а), так и (б).

23. Вариант Bgl1 по п.19, дополнительно включающий, по меньшей мере, одну аминокислотную замену в положении D47, A79, Q85, A109 или A343.

24. Вариант Bgl1 по п.23, где, по меньшей мере, одна аминокислотная замена представляет собой D47I, A79E/G/M, Q85N/H, A109S/T или A343C.

25. Вариант Bgl1 по п.24, где вариант включает аминокислотные замены D47I, A79E, Q85N, I106V, A109T, Q258N, V260G, Q291W, Q313M, F314V, A343C, D369R, E402N, S434P, K495N, G628W, A689I, Y715P и A732G.

26. Вариант Bgl1 по п.24, где вариант включает аминокислотные замены D47I, Q85N, I106V, A109S, Q258N, V260G, Q291W, Q313M, F314V, A343C, D369R, E402N, S434P, K495N, G628W, A689I, Y715P и A732G.

27. Вариант Bgl1 по п.24, где вариант включает аминокислотные замены D47I, A79M, I106V, Q258N, V260G, Q291W, Q313M, F314L, D369R, E402N, S434P, K495N, G628W, A689I, Y715P и A732G.

28. Вариант Bgl1 по пп.1-3, 5-7, 9-11, 13-16, 18-21 или 23-27, который относительно варианта 664 C1 Bgl1 (SEQ ID NO:13) обладает

а) по меньшей мере, в 2 раза более высокой термоактивностью приблизительно при рН 4 и приблизительно 70°C, или

б) по меньшей мере, в 1,1 раза более высокой термостабильностью приблизительно при рН 4,5 и приблизительно 70°C, или

с) как (а), так и (б).

29. Вариант Bgl1 по любому из пп.1-3, 5-7, 9-11, 13-16, 18-21 или 23-27, где вариант идентичен, по меньшей мере, на 75%, или идентичен, по меньшей мере, на 80%, или идентичен, по меньшей мере, на 85%, или идентичен, по меньшей мере, на 90%, или идентичен, по меньшей мере, на 95% по остаткам 20-870 SEQ ID NO:2.

30. Вариант Bgl1 по п.29, который имеет 851 аминокислотный остаток в длину.

31. Вариант β-глюкозидазы (Bgl1), который включает аминокислотные остатки 20-870 SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7; SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:13; SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19 или SEQ ID NO:21.

32. Вариант β-глюкозидазы (Bgl1), который идентичен, по меньшей мере, на 70%, или идентичен, по меньшей мере, на 75%, идентичен, по меньшей мере, на 80%, идентичен, по меньшей мере, на 85%, или идентичен, по меньшей мере, на 90%, или идентичен, по меньшей мере, на 95% по аминокислотным остаткам 20-870 SEQ ID NO:2 и включает аминокислотную замену в положении Q291, как определено по отношению к SEQ ID NO:2, где замена представляет собой W, A или F; и дополнительно где относительно природного C1 Bgl1, включающего аминокислоты 20-870 SEQ ID NO:2, вариант обладает

а) по меньшей мере, в 5 раз более высокой термоактивностью приблизительно при рН 5 и приблизительно 65°C, или

б) по меньшей мере, в 3 раза более высокой термостабильностью приблизительно при рН 5 и приблизительно 65°C, или

с) как (а), так и (б).

33. Вариант β-глюкозидазы 1 (Bgl1), который идентичен, по меньшей мере, на 70%, или идентичен, по меньшей мере, на 75%, идентичен, по меньшей мере, на 80%,

идентичен, по меньшей мере, на 85%, или идентичен, по меньшей мере, на 90%, или идентичен, по меньшей мере, на 95% по аминокислотным остаткам 20-870 SEQ ID NO:2 и включает аминокислотную замену в положении D369, как определено по отношению к SEQ ID NO:2, где замена представляет собой L, Y, V, A, H, R, F, E, M, I, K, C, P или Q; и где дополнительно относительно природного C1 Bgl1, включающего аминокислоты 20-870 SEQ ID NO:2, вариант обладает:

а) по меньшей мере, в 5 раз более высокой термоактивностью приблизительно при рН 5 и приблизительно 65°C, или

б) по меньшей мере, в 3 раза более высокой термостабильностью приблизительно при рН 5 и приблизительно 65°C, или

с) как (а), так и (б).

34. Вариант β-глюкозидазы (Bgl1), который идентичен, по меньшей мере, на 70%, или идентичен, по меньшей мере, на 75%, идентичен, по меньшей мере, на 80%, идентичен, по меньшей мере, на 85%, или идентичен, по меньшей мере, на 90%, или идентичен, по меньшей мере, на 95% по аминокислотным остаткам 20-870 SEQ ID NO:2 и включает аминокислотную замену E402N, как определено по отношению к SEQ ID NO:2 и где дополнительно относительно природного C1 Bgl1, включающего аминокислоты 20-870 SEQ ID NO:2, вариант обладает:

а) по меньшей мере, в 5 раз более высокой термоактивностью приблизительно при рН 5 и приблизительно 65°C, или

б) по меньшей мере, в 3 раза более высокой термостабильностью приблизительно при рН 5 и приблизительно 65°C, или

с) как (а), так и (б).

35. Рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая вариант Bgl1 по любому из п.п.1-3, 5-7, 9-11, 13-16, 18-21, 23-27, 30, 31, 32, 33 или 34.

36. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п.35, которая кодирует пребелок, включающий вариант Bgl1, соединенный с сигнальным пептидом, необязательно с природным сигнальным пептидом C1 Bgl1.

37. Экспрессионный вектор, включающий рекомбинантную нуклеиновую кислоту по п.35.

38. Клетка-хозяин, которая включает рекомбинантную нуклеиновую кислоту по п.35, где указанная нуклеиновая кислота необязательно оперативно связана с промотором, отличным от промотора C1 Bgl1.

39. Клетка-хозяин по п.38, которая является видом мицелиального гриба.

40. Клетка-хозяин по п.39, которая представляет собой виды *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Chrysosporium*, *Myceliophthora* или *Thielavia*.

41. Клетка-хозяин по п.39, которая экспрессирует также, по меньшей мере, один дополнительный неприродный рекомбинантный целлюлазный полипептид, выбранный из

а) рекомбинантного эндоглюканазного (EG) полипептида и/или

б) рекомбинантного целлобиогидролазного полипептида (СВН).

42. Способ получения полипептида Bgl1, включающий культивирование клетки-хозяина по п.38 в условиях, в которых экспрессируется вариант Bgl1.

43. Способ по п.42, где вариант секретируется клеткой-хозяином.

44. Способ по п.42, дополнительно включающий стадию получения варианта Bgl1 из среды, в которой культивируется клетка.

45. Композиция, включающая вариант Bgl1 по любому из пп.1-3, 5-7, 9-11, 13-16, 18-21, 23-27, 30, 31, 32, 33 или 34 и, по меньшей мере, один дополнительный неприродный рекомбинантный целлюлазный полипептид, выбранный из

а) рекомбинантного эндоглюканазного (EG) полипептида

б) рекомбинантного целлобиогидролазного полипептида (СВН)

с) по меньшей мере, одного рекомбинантного полипептида EG и, по меньшей мере, одного рекомбинантного полипептида СВН.

46. Композиция по п.45, дополнительно включающая, по меньшей мере, один полипептид, выбранный из группы полипептидов, состоящей из гемицеллюлазы, пектиназы, лигнинпероксидазы, зависимой от марганца пероксидазы, лакказы и целлобиозодегидрогеназ.

47. Композиция по п.45, где целлобиогидролаза (СВН) и/или эндоглюканаза (EG) происходят от *Trichoderma reesei*, *Myceliophthora thermophila* или *Streptomyces avermitilis*, или которые являются вариантами СВН или EG *T. reesei*, СВН или EG *M. Thermophila* или СВН или EG *S. avermitilis*.

48. Композиция по п.45, включающая клетку-хозяина, экспрессирующую вариант Bgl1.

49. Способ сахарификации целлюлозного субстрата, включающий

(а) предоставление целлюлозного субстрата; и

(b) введение в контакт субстрата со смесью целлюлаз, включающей:

i) по меньшей мере, один белок с целлобиогидролазной активностью;

ii) по меньшей мере, один белок с эндоглюканазной активностью; и

iii) вариант  $\beta$ -глюкозидазы по любому из пп.1-3, 5-7, 9-11, 13-16, 18-21, 23-27, 30, 31, 32, 33 или 34

в условиях, в которых смесь целлюлаз катализирует гидролиз целлюлозного субстрата.

50. Способ по п.49, где целлобиогидролаза (СВН) и/или эндоглюканаза (EG) происходят от *Trichoderma reesei*, *Myceliophthora thermophila* или *Streptomyces avermitilis*, или которые являются вариантами СВН или EG *T. reesei*, СВН или EG *M. Thermophila* или СВН или EG *S. avermitilis*.

51. Способ по п.49, где целлюлозный субстрат представляет собой предварительно обработанную целлюлозную биомассу.

52. Способ получения глюкозы, включающий объединение целлобиозы с вариантом  $\beta$ -глюкозидазы по любому из пп.1-3, 5-7, 9-11, 13-16, 18-21, 23-27, 30, 31, 32, 33 или 34 в условиях, при которых продуцируется глюкоза.

53. Способ получения глюкозы, включающий объединение целлюлозного субстрата и

(а) варианта  $\beta$ -глюкозидазы по любому из пп.1-3, 5-7, 9-11, 13-16, 18-21, 23-27, 30, 31, 32, 33 или 34 в условиях, при которых продуцируется глюкоза;

(b) по меньшей мере, одной дополнительной целлюлазы в условиях, при которых продуцируется глюкоза.

54. Способ по п.52 или 53, дополнительно включающий

i) культивирование микроорганизма в условиях, при которых продуцируемая глюкоза по п.46, используется в качестве источника энергии и углерода для получения метаболического продукта,

ii) получение метаболического продукта.

55. Способ по п.54, где микроорганизм представляет собой дрожжи или бактерии.

56. Способ по п.54, где метаболический продукт представляет собой спирт, органическую кислоту или углеводород с 1-20 углеродными атомами.

57. Способ по п.56, где метаболический продукт представляет собой этанол.

58. Вариант  $\beta$ -глюкозидазы (Bgl1), который идентичен, по меньшей мере, на 80%, или идентичен, по меньшей мере, на 85%, или идентичен, по меньшей мере, на 90%, или идентичен, по меньшей мере, на 95% по аминокислотным остаткам 20-870 SEQ ID NO:2 и включает аминокислотную замену в положении Q291, аминокислотную замену в

положении D369 и аминокислотную замену в положении E402, как определено по отношению к SEQ ID NO:2.

59. Вариант Bgl1 по п.58, где вариант идентичен, по меньшей мере, на 90%, или идентичен, по меньшей мере, на 95% аминокислотным остаткам 20-870 SEQ ID NO:2.

60. Вариант Bgl1 по п.58, дополнительно включающий, по меньшей мере, одну дополнительную аминокислотную замену в D47, A79, Q85, I106, A109, Q258, V260, Q313, F314, A343, S434, A475, K495, G628, A689, Y715 или A732.

61. Вариант Bgl1 по п.60, где замена представляет собой D47I, A79E/G/M, Q85N/H, I106V, A109/S/T, V260G, Q313M, F314L/V, A343C, S434P, A475L, K495N, G628W, A689I, Y715P или A732G.

62. Вариант Bgl1 по п.61, где вариант включает, по меньшей мере, одну замену Q291W, D369L/H/R/Y или E402N.

63. Вариант Bgl1 по любому из пп.58-62, где вариант обладает относительно природного C1 Bgl1, включающего аминокислоты 20-870 SEQ ID NO:2, вариант обладает

а) по меньшей мере, в 5 раз более высокой термоактивностью приблизительно при pH 5 и приблизительно 65°C, или

б) по меньшей мере, в 3 раза более высокой термостабильностью приблизительно при pH 5 и приблизительно 65°C, или

с) как (а), так и (б).

RU 2012126131 A

RU 2012126131 A