



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 37 475 T2** 2007.12.13

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 981 631 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 37 475.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/09940**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 922 312.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/051804**

(86) PCT-Anmeldetag: **15.05.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **19.11.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **01.03.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **04.04.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **13.12.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/57** (2006.01)

C12N 9/48 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

A23J 3/30 (2006.01)

A21D 2/26 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

857886 16.05.1997 US

62893 20.10.1997 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:

Novozymes, Inc., Davis, Calif., US

(72) Erfinder:

**BLINKOVSKY, Alexander, Davis, CA 95616, US;
BROWN, Kimberly, Elk Grove, CA 95758, US;
GOLIGHTLY, Elizabeth, Davis, CA 95616, US;
BYUN, Tony, Davis, CA 95616, US; KOFOD, Lene
V., DK-4350 Uggel se, DK**

(74) Vertreter:

**Patent- und Rechtsanwälte Bardehle, Pagenberg,
Dost, Altenburg, Geissler, 81679 München**

(54) Bezeichnung: **POLYPEPTIDE MIT AMINOPEPTIDASEAKTIVITÄT UND DAFÜR KODIERENDE NUKLEINSÄUREN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**HINTERGRUND DER ERFINDUNG****Gebiet der Erfindung**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Polypeptide mit Aminopeptidaseaktivität und isolierte Nukleinsäuresequenzen, die die Polypeptide kodieren. Die Erfindung betrifft auch Nukleinsäurekonstrukte, Vektoren und Wirtszellen, die die Nukleinsäuresequenzen umfassen, sowie Verfahren zur Herstellung der Polypeptide. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Verfahren zum Erhalt von Proteinhydrolysaten, die als geschmackverbessernde Stoffe nützlich sind.

Beschreibung des Stands der Technik

[0002] Verschiedene Nahrungsmittelprodukte, z.B. Suppen, Soßen und Würzmittel, enthalten Geschmackstoffe, die durch Hydrolyse von proteinhaltigen Materialien erhalten werden. Diese Hydrolyse wird herkömmlicher Weise unter Verwendung von starker Salzsäure, gefolgt von Neutralisation mit Natriumhydroxid, erzielt. Jedoch führt eine derartige chemische Hydrolyse zu einem starken Abbau der während der Hydrolyse erhaltenen Aminosäuren und auch zu schädlichen Nebenprodukten, die im Verlauf dieser chemischen Reaktion gebildet werden. Zunehmende Bedenken gegenüber der Verwendung von durch chemische Hydrolyse erhaltenen Geschmackstoffen führte zur Entwicklung von enzymatischen Hydrolyseverfahren.

[0003] Enzymatische Hydrolyseverfahren für proteinhaltige Materialien zielen auf den Erhalt eines hohen Hydrolysegrads (DH), und dies wird gewöhnlich unter Verwendung eines Komplexes von unspezifisch wirkenden proteolytischen Enzymen (d.h. unspezifisch wirkenden Endo- und Exopeptidasen) erzielt. Zum Beispiel beschreibt WO 94/25580 ein Verfahren zum Hydrolysieren von Proteinen unter Verwendung eines unspezifisch wirkenden Enzympräparats, das von *Aspergillus oryzae* erhalten wird. Spezifisch wirkende proteolytische Enzyme wurden für diesen Zweck nicht verwendet, da derartige Enzyme nur zu einem unzulänglichen Hydrolysegrad führen.

[0004] Polypeptide mit Aminopeptidaseaktivität katalysieren die Entfernung von einem oder mehreren Aminosäureresten von dem N-Terminus von Peptiden, Polypeptiden und Proteinen. Derartige Polypeptide sind unter der Enzymklassifizierungsnummer E.C. 3.4.11. der Internationalen Vereinigung für Biochemie und Molekularbiologie klassifiziert.

[0005] WO 96/28542 offenbart eine Aminopeptidase, die ein Molekulargewicht von 35 kDa aufweist. JP-7-5034631 (Noda) offenbart eine Leucinaminopeptidase, die von gelbem Koji-Schimmelpilz, der *Aspergillus oryzae* einschließt, erhalten wird. JP-7-4021798 (Zaidan Hojin Noda Sangyo) offenbart die Herstellung von Miso durch Zugabe einer Leucinaminopeptidase II, die durch Züchten einer Anzahl von Stämmen, einschließlich des Stamms 460 von *Aspergillus oryzae* (ATCC 20386) und des Stamms IAM 2616, hergestellt wird. Es ist bekannt, dass der Stamm 460 von *Aspergillus oryzae* eine Anzahl an Leucinaminopeptidasen herstellt, unter welchen drei durch Gelfiltration ein Molekulargewicht von 26,5, 56 und 61 kDa aufweisen (Nakada et al., 1972 Agricultural and Biological Chemistry 37: 757–765; Nakada et al., 1972, Agricultural and Biological Chemistry 37: 767–774; bzw. Nakada et al., 1972, Agricultural and Biological Chemistry 37: 775–782). *Penicillium citrium* stellt eine intrazelluläre Leucinaminopeptidase mit einem Molekulargewicht von 65 kDa durch SDS-PAGE her (Kwon et al., 1996, Journal of Industrial Microbiology 17: 30–35).

[0006] WO 97/04108 (Roehm) offenbart DNA, die eine Leucinaminopeptidase von *Aspergillus sojae* kodiert. Chang und Smith (1989, Journal of Biological Chemistry 264: 6979–6983) offenbaren das molekulare Klonieren und Sequenzieren eines Gens, das eine vakuoläre Aminopeptidase von *Saccharomyces cerevisiae* kodiert. Chang et al. (1992, Journal of Biological Chemistry 267: 8007–8011) offenbaren das molekulare Klonieren und Sequenzieren eines Gens, das eine Methioninaminopeptidase von *Saccharomyces cerevisiae* kodiert.

[0007] Die Herstellung von Proteinhydrolysaten mit wünschenswerten organoleptischen Eigenschaften und hohen Hydrolysegraden erfordert im Allgemeinen die Verwendung eines Gemischs von Peptidaseaktivitäten. Es wäre wünschenswert, ein Einkomponenten-Peptidaseenzym bereitzustellen, das eine Aktivität aufweist, die zum Verbessern der organoleptischen Eigenschaften und des Hydrolysegrads von in Nahrungsmittelprodukten entweder allein oder in Kombination mit anderen Enzymen verwendeten Proteinhydrolysaten nützlich ist.

[0008] Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, verbesserte Polypeptide mit Aminopeptidaseaktivität

sowie Verfahren zum Erhalt von Proteinhydrolysaten mit wünschenswerten organoleptischen Qualitäten und hohen Hydrolysegraden bereitzustellen.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0009] Die vorliegende Erfindung betrifft isolierte Polypeptide mit Aminopeptidaseaktivität, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus:

- (a) einem Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz, die eine mindestens 80%ige Identität mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NR:2 aufweist;
- (b) einem Fragment von (a), wobei das Fragment Aminopeptidaseaktivität aufweist.

[0010] Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Polypeptide kodierende isolierte Nukleinsäuresequenzen und Nukleinsäurekonstrukte, Vektoren und Wirtszellen, die die Nukleinsäuresequenzen umfassen, sowie Verfahren zur Herstellung der Polypeptide.

[0011] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Verfahren zum Erhalt von Hydrolysaten aus proteinhaltigen Substraten, das das Unterziehen des proteinhaltigen Materials einem Polypeptid mit Aminopeptidaseaktivität allein oder in Kombination mit einer Endopeptidase umfasst.

[0012] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Verfahren zum Erhalt eines Hydrolysats, das in Bezug auf freie Glutaminsäure und/oder peptidgebundenen Glutaminsäureresten angereichert ist, von einem proteinhaltigen Substrat, wobei das Verfahren das Unterziehen des Substrats einem Deamidierungsverfahren und der Wirkung eines Polypeptids mit Aminopeptidaseaktivität umfasst.

[0013] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner geschmackverbessernde Zusammensetzungen, die ein Polypeptid mit Aminopeptidaseaktivität umfassen. Die Zusammensetzungen können ferner zusätzliche enzymatische Aktivitäten umfassen.

[0014] In einem letzten Aspekt können die Verfahren der Erfindung in Nahrungsmitteln, die mit Anwendungen zum Verbessern des Geschmacks, wie dem Backen, verbunden sind, verwendet werden. Alternativ dazu kann eine Geschmackverbesserung in Nahrungsmitteln durch die Zugabe von Hydrolysaten erzielt werden, die durch die Verfahren der Erfindung erhalten werden.

KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0015] **Fig. 1** zeigt die Nukleinsäuresequenz und die daraus gefolgerte Aminosäuresequenz einer Aminopeptidase von *Aspergillus oryzae* ATCC 20386 (SEQ ID NR:1 bzw. 2).

[0016] **Fig. 2** zeigt eine Restriktionsabbildung von pMWR3.

[0017] **Fig. 3** zeigt eine Restriktionsabbildung von pEJG19.

[0018] **Fig. 4** zeigt eine Restriktionsabbildung von pDN181.

[0019] **Fig. 5** zeigt eine Restriktionsabbildung von pEJG28.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

Polypeptide mit Aminopeptidaseaktivität

[0020] Der Begriff „Aminopeptidaseaktivität“ ist hier als eine Peptidaseaktivität definiert, die die Entfernung von Aminosäuren von dem N-terminalen Ende von Peptiden, Oligopeptiden oder Proteinen katalysiert. Definiert in einer allgemeinen Weise, kann die Aminopeptidaseaktivität die Aminosäure X vom N-Terminus eines Peptids, Polypeptids oder Proteins abspalten, wobei X einen beliebigen Aminosäurerest, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, and Val, jedoch mindestens Leu, Glu, Gly, Ala, und/oder Pro, darstellen kann. Es ist klar, dass die isolierten Polypeptide mit Aminopeptidaseaktivität der vorliegenden Erfindung in Bezug auf die abzuspalte Aminosäuresequenz des Peptids, Polypeptids oder Proteins unspezifisch sein kann.

[0021] In einer ersten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung isolierte Polypeptide mit einer Ami-

nosäuresequenz, die einen Identitätsgrad mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NR:2 von mindestens etwa 50%, vorzugsweise mindestens etwa 60%, vorzugsweise mindestens etwa 70%, stärker bevorzugt mindestens etwa 80%, noch stärker bevorzugt mindestens etwa 90%, besonders bevorzugt mindestens etwa 95% und insbesondere bevorzugt mindestens etwa 97% aufweist, die Aminopeptidaseaktivität aufweisen (hier nachstehend „homologe Polypeptide“). In einer bevorzugten Ausführungsform weisen die homologen Polypeptide eine Aminosäuresequenz auf, die sich um fünf Aminosäuren, vorzugsweise um vier Aminosäuren, stärker bevorzugt um drei Aminosäuren, noch stärker bevorzugt um zwei Aminosäuren und besonders bevorzugt um eine Aminosäure von der Aminosäuresequenz von SEQ ID NR:2 unterscheidet. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung wird der Identitätsgrad zwischen zwei Aminosäuresequenzen durch das Clustal-Verfahren (Higgins, 1989, CABIOS 5: 151–153) mit einer Identitätstabelle, einer Lückenstrafe von 10 und einer Lückenlängenstrafe von 10, bestimmt.

[0022] Vorzugsweise umfassen die Polypeptide der vorliegenden Erfindung die Aminosäuresequenz von SEQ ID NR:2 oder eine Allelvariante; und ein Fragment davon, wobei das Fragment Aminopeptidaseaktivität aufweist. In einer stärker bevorzugten Ausführungsform umfassen die Polypeptide der vorliegenden Erfindung die Aminosäuresequenz von SEQ ID NR:2. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform weist das Polypeptid der vorliegenden Erfindung die Aminosäuresequenz von SEQ ID NR:2 oder ein Fragment davon auf, wobei das Fragment Aminopeptidaseaktivität aufweist. Ein Fragment von SEQ ID NR:2 ist ein Polypeptid mit einer oder mehreren Aminosäuren, die vom Amino- und/oder Carboxy-Terminus dieser Aminosäuresequenz deletiert wurden. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weist das Polypeptid die Aminosäuresequenz von SEQ ID NR:2 auf.

[0023] Vorzugsweise enthält ein Fragment mindestens 330 Aminosäurereste, stärker bevorzugt mindestens 380 Aminosäurereste und besonders bevorzugt mindestens 430 Aminosäurereste.

[0024] Eine Allelvariante bezeichnet eine beliebige von zwei oder mehreren alternativen Formen eines Gens, das dieselbe Chromosomenstelle belegt. Allelvariation resultiert auf natürliche Weise aus einer Mutation und kann zu phänotypischem Polymorphismus innerhalb von Populationen führen. Genmutationen können sich ruhig verhalten (keine Änderung im kodierten Polypeptid), oder sie können Polypeptide mit abgeänderten Aminosäuresequenzen kodieren. Der Begriff Allelvariante wird auch zum Bezeichnen eines Proteins verwendet, das durch eine Allelvariante eines Gens kodiert wird.

[0025] Die Aminosäuresequenzen der homologen Polypeptide können sich von der Aminosäuresequenz von SEQ ID NR:2 durch eine Einfügung oder Deletion von einem oder mehreren Aminosäureresten und/oder die Substitution von einem oder mehreren Aminosäureresten durch andere Aminosäurereste unterscheiden. Vorzugsweise sind die Aminosäureveränderungen von geringfügiger Natur, das heißt, es sind bewahrende Aminosäuresubstitutionen, die die Faltung und/oder Aktivität des Proteins nicht merklich beeinflussen; kleine Deletionen, typischer Weise von einer bis etwa 30 Aminosäuren; kleine Amino- oder Carboxy-terminale Verlängerungen, wie ein Amino-terminaler Methioninrest; ein kleines Verknüpfungspeptid von bis zu etwa 20–25 Resten; oder eine kleine Verlängerung, die die Reinigung durch Verändern der Netzladung oder einer anderen Funktion erleichtert, wie ein Polyhistidintrakt, ein antigenes Epitop oder eine Bindungsdomäne.

[0026] Beispiele für bewahrende Substitutionen befinden sich innerhalb der Gruppe von basischen Aminosäuren (wie Arginin, Lysin und Histidin), sauren Aminosäuren (wie Glutaminsäure und Asparaminsäure), polaren Aminosäuren (wie Glutamin und Asparagin), hydrophoben Aminosäuren (wie Leucin, Isoleucin und Valin), aromatischen Aminosäuren (wie Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin) und kleinen Aminosäuren (wie Glycin, Alanin, Serin, Threonin und Methionin). Aminosäuresubstitutionen, die die spezifische Aktivität im Allgemeinen nicht abändern, sind auf dem Fachgebiet bekannt und z.B. von H. Neurath und R.L. Hill, 1979, in: *The Proteins*, Academic Press, New York, beschrieben. Die am üblichsten vorkommenden Austausche sind Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu und Asp/Gly sowie diese im Umgekehrten.

[0027] In einer zweiten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung isolierte Polypeptide mit Aminopeptidaseaktivität, die durch Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, die unter niederstringenten Bedingungen, stärker bevorzugt mittelstringenten Bedingungen und besonders bevorzugt hochstringenten Bedingungen mit einer Oligonukleotidsonde hybridisieren, die unter denselben Bedingungen mit der Nukleinsäuresequenz von SEQ ID NR:1 oder ihrem Komplementärstrang hybridisieren (J. Sambrook, E.F. Fritsch und T. Maniatus, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2. Aufl., Cold Spring Harbor, New York); oder Allelvarianten und Fragmente der Polypeptide, wobei die Fragmente Aminopeptidaseaktivität aufweisen.

[0028] Eine Hybridisierung weist darauf hin, dass die Nukleinsäuresequenz an die dem Polypeptid-kodierenden Teil der in SEQ ID NR:1 dargestellten Aminosäuresequenz entsprechende Oligonukleotidsonde unter nieder- bis hochstringenten Bedingungen (d.h. Vorhybridisierung und Hybridisierung bei 42°C in 5X SSPE, 0,3% SDS, 200 µg/ml gescherter und denaturierter Lachssperma-DNA und entweder 25, 35 oder 50% Formamid für Niedrig-, Mittel- bzw. Hochstringenzien), gefolgt von Standard-Southern-Blot-Prozeduren, hybridisiert.

[0029] Die Aminosäuresequenz von SEQ ID NR:2 oder eine Teilsequenz davon kann zum Konstruieren einer Oligonukleotidsonde verwendet werden, oder eine Nukleinsäuresequenz, die ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung kodiert, wie die Nukleinsäuresequenz von SEQ ID NR:1 oder eine Untersequenz davon, kann zum Identifizieren und Klonieren von DNA verwendet werden, die Polypeptide mit Aminopeptidaseaktivität von Stämmen verschiedener Gattungen oder Spezies gemäß auf dem Fachgebiet bekannten Verfahren kodiert. Insbesondere können derartige Sonden zur Hybridisierung mit der genomischen oder cDNA der Gattung oder Spezies von Interesse, nach standardmäßigen Southern-Blot-Prozeduren, verwendet werden, um das entsprechende Gen darin zu identifizieren oder zu isolieren. Derartige Sonden können deutlich kürzer als die gesamte Sequenz sein, sollten aber mindestens 15, vorzugsweise mindestens 25 und stärker bevorzugt mindestens 40 Nukleotide lang sein. Längere Sonden können ebenfalls verwendet werden. Sowohl DNA- als auch RNA-Sonden können verwendet werden. Die Sonden werden typischer Weise zum Nachweisen des entsprechenden Gens (z.B. mit ^{32}P , ^3H , ^{35}S , Biotin oder Avidin) markiert.

[0030] Folglich kann eine genomische, cDNA- oder kombinatorische chemische Bibliothek, die aus derartigen anderen Organismen hergestellt ist, auf DNA durchgemustert werden, die mit den vorstehend beschriebenen Sonden hybridisiert und ein Polypeptid mit Aminopeptidaseaktivität kodiert. Genomische oder andere DNA von derartigen anderen Organismen können durch Agarose- oder Polyacrylamidgel-Elektrophorese oder durch Abtrennungstechniken abgetrennt werden. DNA von den Bibliotheken oder die abgetrennte DNA kann zu Nitrocellulose oder einem anderen geeigneten Trägermaterial überführt und darauf immobilisiert werden. Zum Identifizieren eines Klon oder einer DNA, das/die mit SEQ ID NR:1 homolog ist, wird das Trägermaterial in einem Southern-Blot verwendet, wobei das Trägermaterial schließlich drei Mal für eine Dauer von 30 Minuten jeweils unter Verwendung von $2 \times \text{SSC}$, 0,2% SDS, vorzugsweise bei mindestens 50°C, stärker bevorzugt mindestens 55°C, stärker bevorzugt mindestens 60°C, stärker bevorzugt mindestens 65°C, noch stärker bevorzugt mindestens 70°C und besonders bevorzugt mindestens 75°C gewaschen wird. Moleküle, an welche die Oligonukleotidsonde unter diesen Bedingungen hybridisiert, werden unter Verwendung eines Röntgenfilms nachgewiesen.

[0031] In einer dritten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung isolierte Polypeptide mit den folgenden physikalisch-chemischen Eigenschaften: (i) einem bei Umgebungstemperatur in Gegenwart von Ala-para-nitroanilid bestimmten pH-Optimum im Bereich von etwa pH 7,27 bis etwa pH 10,95; (ii) einer nach Inkubation für eine Dauer von 20 Minuten bei 60°C in Abwesenheit von Substrat bestimmten Temperaturstabilität von 90% oder mehr in Bezug auf die anfängliche Aktivität bei pH 7,5; und (iii) einer Aktivität gegenüber Xaa-para-Nitroanilid, wobei Xaa ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Leu, Glu, Gly, Ala und Pro. Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung weisen auch die Fähigkeit auf, andere Substrate zu hydrolysieren.

[0032] In einer bevorzugten Ausführungsform liegt das nach Inkubation für eine Dauer von 5 Minuten bei Umgebungstemperatur in Gegenwart von Ala-Pro-paranitroanilid bestimmte pH-Optimum im Bereich von etwa pH 7,27 bis etwa pH 10,95, stärker bevorzugt im Bereich von etwa pH 8,03 bis etwa pH 10,95 und besonders bevorzugt im Bereich von etwa pH 8,62 bis etwa pH 10,51.

[0033] In einer vierten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung isolierte Polypeptide mit immunchemischer Identität oder teilweiser immunchemischer Identität zu dem Polypeptid mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NR:2. Die immunchemischen Eigenschaften werden durch immunologische Kreuzreaktionsidentitätstests durch die bekannte Ouchterlony-Doppelimmundiffusionsprozedur bestimmt. Speziell wird ein Antiserum, das Antikörper enthält, die für Epitope des Polypeptids mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NR:2 immunreaktiv sind oder sich daran binden, durch Immunisieren von Kaninchen (oder anderen Nagern) gemäß der von Harboe und Ingild, in: N.H. Axelsen, J. Krøll, and B. Weeks, Herausgeber, A Manual of Quantitative Immuno-electrophoresis, Blackwell Scientific Publications, 1973, Kapitel 23, oder Johnstone und Thorpe, Immunochemistry in Practice, Blackwell Scientific Publications, 1982 (insbesondere Seiten 27–31) beschriebenen Prozedur hergestellt. Ein Polypeptid mit immunchemischer Identität ist ein Polypeptid, das mit dem Antiserum in einer identischen Weise, wie mit Gesamtfusion von Niederschlägen, identischer Niederschlagmorphologie und/oder identischer elektrophoretischer Mobilität, unter Verwendung einer spezifischen immunchemischen Technik reagiert. Eine weitere Erläuterung für die immunchemische Identität ist von Axelsen, Bock und Krøll, in: N.H. Axelsen, J. Krøll und B. Weeks, Herausgeber, A Manual of Quantitative Immuno-electro-

phoresis, Blackwell Scientific Publications, 1973, Kapitel 10, beschrieben. Ein Polypeptid mit teilweiser immunchemischer Identität ist ein Polypeptid, das mit dem Antiserum in einer teilweisen identischen Weise, wie einer teilweisen Fusion von Niederschlägen, einer teilweisen identischen Niederschlagsmorphologie und/oder einer teilweisen identischen elektrophoretischen Mobilität unter Verwendung einer spezifischen immunchemischen Technik reagiert. Eine weitere Erläuterung der teilweisen immunchemischen Identität ist von Bock und Axelsen, in: N.H. Axelsen, J. Krøll, und B. Weeks, Herausgeber, A Manual of Quantitative Immuno-electrophoresis, Blackwell Scientific Publications, 1973, Kapitel 11, beschrieben.

[0034] Polypeptide, die durch Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, die mit einer Oligonukleotidsonde hybridisieren, die mit der Nukleinsäuresequenz von SEQ ID NR:1, ihrem Komplementärstrang oder Allelvarianten und Untersequenzen von SEQ ID NR:1 hybridisiert; Allelvarianten und Fragmente der Polypeptide; oder die homologen Polypeptide und Polypeptide mit identischen oder teilweise identischen immunologischen Eigenschaften können von Mikroorganismen jeder beliebigen Gattung erhalten werden.

[0035] In einer bevorzugten Ausführungsform können diese Polypeptide von einer Bakterienquelle erhalten werden. Zum Beispiel können diese Polypeptide von einem grampositiven Bakterium, wie einem *Bacillus*-Stamm, z.B. *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* oder *Bacillus thuringiensis*; oder einem *Streptomyces*-Stamm, z.B. *Streptomyces lividans* oder *Streptomyces murinus*; oder von einem gramnegativen Bakterium, z.B. *E. coli* oder *Pseudomonas* sp., erhalten werden.

[0036] Die Polypeptide können von einer Pilzquelle, und stärker bevorzugt von einem Hefestamm, wie einem Stamm von *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* oder *Yarrowia*; oder einem Fadenpilzstamm, wie einem Stamm von *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Piromyces*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium* oder *Trichoderma*, erhalten werden.

[0037] In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Polypeptide von einem Stamm von *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* oder *Saccharomyces oviformis* erhalten.

[0038] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform werden die Polypeptide von einem Stamm von *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochrom*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* oder *Trichoderma viride* erhalten.

[0039] Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung werden vorzugsweise von einer Spezies von *Aspergillus*, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* oder *Aspergillus oryzae*, erhalten.

[0040] In einer stärker bevorzugten Ausführungsform wird ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung von einem Stamm von *Aspergillus oryzae*, und besonders bevorzugt von *Aspergillus oryzae* ATCC 20386 oder einem mutanten Stamm davon erhalten, z.B. das Polypeptid mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NR:2.

[0041] Es ist klar, dass für die vorstehend erwähnten Spezies die Erfindung ungeachtet des Speziesnamens, unter welchem sie bekannt sind, sowohl die vollkommenen als auch die unvollkommenen Stadien und andere taxonomische Äquivalente, z.B. Anamorphe, umfasst. Der Fachmann erkennt leicht die Identität von entsprechenden Äquivalenten. Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung können auch von Mikroorganismen erhalten werden, die für *Aspergillus* synonym sind, wie sie durch Raper, K.D., und Fennel, D.L., 1965, The Genus *Aspergillus*, The Wilkins Company, Baltimore, definiert sind. *Aspergilli* sind Mitosporenpilze, die durch ein *Aspergillum* gekennzeichnet sind, das aus einem Conidiosporenstengel ohne bekannte teleomorphe Stadien, die ein Vesikel terminieren, das wiederum eine oder zwei Schichten aus synchron geformten spezialisierten Zellen, verschiedentlich als Sterigmata oder Phialide bezeichnet, und asexuell geformten Sporen, bezeichnet als Conidia, trägt, zusammengesetzt sind. Bekannte Teleomorphe von *Aspergillus* schließen *Eurotium*, *Neosarto-*

rya und *Emericella* ein. Stämme von *Aspergillus* und Teleomorphe davon sind für die Öffentlichkeit in einer Anzahl von Kultursammlungen, wie der American Type Culture Collection (ATCC), der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), dem Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) und der Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL), leicht zugänglich.

[0042] Weiterhin können derartige Polypeptide von anderen Quellen, einschließlich Mikroorganismen, die aus der Natur (z.B. Erdreich, Kompost, Wasser usw.) isoliert werden, unter Verwendung der vorstehend erwähnten Sonden identifiziert und erhalten werden. Techniken zum Isolieren von Mikroorganismen aus natürlichen Habitats sind auf dem Fachgebiet bekannt. Die Nukleinsäuresequenz kann dann durch ähnliches Durchmustern einer genomischen oder cDNA-Bibliothek eines anderen Mikroorganismus abgeleitet werden. Nachdem eine das Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz mit der(den) Sonde(n) nachgewiesen wurde, kann die Sequenz unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Techniken isoliert und kloniert werden (siehe z.B. Sambrook et al., 1989, vorstehend).

[0043] Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung soll der Begriff „erhalten von“, wie hier in Verbindung mit einer bestimmten Quelle verwendet, bedeuten, dass das Polypeptid durch die Quelle oder durch eine Zelle hergestellt wird, in die ein Gen von der Quelle eingefügt wurde.

[0044] Wie hier definiert, ist ein „isoliertes“ Polypeptid ein Polypeptid, das, wie bestimmt durch SDS-PAGE, im Wesentlichen frei ist von anderen Polypeptiden bei welchen es sich nicht um Aminopeptidasepolypeptide handelt, z.B. zu mindestens etwa 20% rein, vorzugsweise zu mindestens etwa 40% rein, stärker bevorzugt zu etwa 60% rein, noch stärker bevorzugt zu etwa 80% rein, besonders bevorzugt zu etwa 90% rein und insbesondere bevorzugt zu etwa 95% rein ist.

Nukleinsäuresequenzen

[0045] Die vorliegende Erfindung betrifft auch isolierte Nukleinsäuresequenzen, die ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung kodieren. In einer bevorzugten Ausführungsform kodiert die Nukleinsäuresequenz ein Polypeptid, das von *Aspergillus*, z.B. *Aspergillus oryzae*, erhalten wird, und in einer stärker bevorzugten Ausführungsform wird die Nukleinsäuresequenz von *Aspergillus oryzae* ATCC 20386 erhalten, z.B. die Nukleinsäuresequenz von SEQ ID NR:1. In einer anderen stärker bevorzugten Ausführungsform ist die Nukleinsäuresequenz die Sequenz, die im Plasmid pEJG18 enthalten ist, das in *Escherichia coli* NRRL B-21677 enthalten ist. Die vorliegende Erfindung umfasst auch Nukleinsäuresequenzen, die ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NR:2 kodieren, die sich von SEQ ID NR:1 im Hinblick auf die Entartung des genetischen Codes unterscheidet. Die vorliegende Erfindung betrifft auch Untersequenzen von SEQ ID NR:1, die Fragmente von SEQ ID NR:2 kodieren, die Aminopeptidaseaktivität aufweisen. Eine Untersequenz von SEQ ID NR:1 ist eine Nukleinsäuresequenz, die von SEQ ID NR:1 umfasst ist, außer dass ein oder mehrere Nukleotide vom 5'-Ende und/oder 3'-Ende deletiert worden sind. Vorzugsweise enthält eine Untersequenz mindestens 990 Nukleotide, stärker bevorzugt mindestens 1140 Nukleotide und besonders bevorzugt mindestens 1290 Nukleotide.

[0046] Die Nukleinsäuresequenzen können von Mikroorganismen erhalten werden, die ungeachtet des Speziesnamens, unter welchem sie bekannt sind, taxonomische Äquivalente von *Aspergillus* sind, wie von Raper, K.D., und Fennel, D.L., 1965, vorstehend, definiert.

[0047] Die zum Isolieren oder Klonieren einer ein Polypeptid kodierenden Nukleinsäuresequenz verwendeten Techniken sind auf dem Fachgebiet bekannt und schließen die Isolation von genomischer DNA, Herstellung von cDNA oder eine Kombination davon ein. Das Klonieren der Nukleinsäuresequenzen der vorliegenden Erfindung von einer derartigen genomischen DNA kann z.B. unter Verwendung der bekannten Polymerasekettenreaktion (PCR) oder Antikörperdurchmustern von Expressionsbibliotheken zum Nachweis von klonierten DNA-Fragmenten mit gemeinsamen Strukturmerkmalen bewirkt werden. Siehe z.B. Innis et al., 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, New York. Andere Nukleinsäureamplifikationsprozeduren, wie Ligasekettenreaktion (LCR), ligierte aktivierte Transkription (LAT) und Amplifikation auf Nukleinsäuresequenz-Basis (KASBA), können verwendet werden. Die Nukleinsäuresequenz kann von einem Stamm von *Aspergillus* oder einem anderen oder verwandten Organismus kloniert werden und kann folglich z.B. eine Allel- oder Speziesvariante des das Polypeptid kodierenden Bereichs der Nukleinsäuresequenz sein.

[0048] Der Begriff „isolierte Nukleinsäuresequenz“ bedeutet, wie hier verwendet, eine Nukleinsäuresequenz, die, wie bestimmt durch Agarose-Elektrophorese, im Wesentlichen frei von anderen Nukleinsäuresequenzen,

z.B. zu mindestens etwa 20% rein, vorzugsweise zu mindestens etwa 40% rein, stärker bevorzugt zu mindestens etwa 60% rein, noch stärker bevorzugt zu mindestens etwa 80% rein und besonders bevorzugt zu mindestens etwa 90% rein ist. Zum Beispiel kann eine isolierte Nukleinsäuresequenz durch standardmäßige Klonierungsprozeduren erhalten werden, die in der Gentechnik zum Umlokalisieren der Nukleinsäuresequenz von ihrer natürlichen Stelle zu einer anderen Stelle, wo sie reproduziert wird, verwendet werden. Die Klonierungsprozeduren können das Herausschneiden und die Isolation eines gewünschten Nukleinsäurefragments, das die das Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz umfasst, Einfügung des Fragments in ein Vektormolekül und Einbringung des rekombinanten Vektors in eine Wirtszelle, wo mehrere Kopien oder Klone der Nukleinsäuresequenz repliziert werden, beinhalten. Die Nukleinsäuresequenz kann genomischen, cDNA-, RNA-, halbsynthetischen, synthetischen Ursprungs oder beliebige Kombinationen davon sein.

[0049] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Nukleinsäuresequenzen, die einen Homologiegrad mit der Nukleinsäuresequenz von SEQ ID NR:1 von mindestens etwa 50%, vorzugsweise eine etwa 60%ige, vorzugsweise eine etwa 70%ige, vorzugsweise eine etwa 80%ige, stärker bevorzugt eine etwa 90%ige, noch stärker bevorzugt eine etwa 95%ige und besonders bevorzugt eine etwa 97%ige Homologie aufweisen, die ein aktives Polypeptid kodieren. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung wird der Homologiegrad zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen durch das Clustal-Verfahren (Higgins, 1989, vorstehend) mit einer Identitätstabelle, einer Lückenstrafe von 10 und einer Lückenlängenstrafe von 10 bestimmt.

[0050] Die Modifikation einer Nukleinsäuresequenz, die ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung kodiert, kann zur Synthese von Polypeptiden nötig sein, die im Wesentlichen dem Polypeptid ähneln. Der Begriff dem Polypeptid „im Wesentlichen ähneln“ bezieht sich auf nicht natürlich vorkommende Formen des Polypeptids. Diese Polypeptide können sich in einer gewissen manipulierten Weise von dem von seiner nativen Quelle isolierten Polypeptid unterscheiden. Zum Beispiel kann es von Interesse sein, Varianten des Polypeptids, wobei sich die Varianten in der spezifischen Aktivität, Wärmestabilität, pH-Optimum oder dgl. unterscheiden, unter Verwendung z.B. von stellengerichteter Mutagenese zu synthetisieren. Die analoge Sequenz kann auf der Basis der Nukleinsäuresequenz, die als Polypeptid kodierender Teil von SEQ ID NR:1, z.B. eine Untersequenz davon dargestellt wird, und/oder durch Einbringung von Nukleotidsubstitutionen, die zu keiner anderen Aminosäuresequenz des Polypeptids führen, das durch die Nukleinsäuresequenz kodiert wird, jedoch der Kodon-Verwendung des zur Herstellung des Enzyms vorgesehenen Wirtsorganismus entspricht, oder durch Einbringung von Nukleotidsubstitutionen, die zu einer unterschiedlichen Aminosäuresequenz führen können, konstruiert werden. Für eine allgemeine Beschreibung der Nukleotidsubstitution siehe z.B. Ford et al., 1991, Protein Expression and Purification 2: 95–107.

[0051] Es ist dem Fachmann klar, dass derartige Substitutionen außerhalb der für die Funktion des Moleküls entscheidenden Bereiche durchgeführt werden können und immer noch zu einem aktiven Polypeptid führen können. Aminosäurereste, die für die Aktivität des durch die isolierte Nukleinsäuresequenz der Erfindung kodierten Polypeptids wesentlich sind und deshalb vorzugsweise nicht einer Substitution unterzogen werden, können gemäß den auf dem Fachgebiet bekannten Prozeduren, wie stellengerichteter Mutagenese oder Alanin-Durchmusterungsmutagenese (siehe z.B. Cunningham und Wells, 1989, Science 244: 1081–1085) identifiziert werden. In der letzteren Technik werden Mutationen an jedem positiv geladenen Rest im Molekül eingebracht und die erhaltenen Mutantenmoleküle auf Aminopeptidaseaktivität getestet, um Aminosäurereste zu identifizieren, die für die Aktivität des Moleküls entscheidend sind. Stellen der Substrat-Enzym-Wechselwirkung können auch durch Analyse der dreidimensionalen Struktur bestimmt werden, die wie durch derartige Techniken wie Kernmagnetresonanzanalyse, Kristallographie oder Lichtaffinitätsmarkieren (siehe z.B. de Vos et al., 1992, Science 255: 306–312; Smith et al., 1992, Journal of Molecular Biology 224: 899–904; Wlodaver et al., 1992, FEBS Letters 309: 59–64) bestimmt wird.

[0052] Polypeptide der vorliegenden Erfindung schließen auch fusionierte Polypeptide oder spaltbare Fusionspolypeptide ein, bei welchen ein anderes Polypeptid an den N-Terminus oder den C-Terminus des Polypeptids oder Fragments davon fusioniert wird. Ein fusioniertes Polypeptid wird durch Fusionieren einer Nukleinsäuresequenz (oder eines Abschnitts davon), die ein anderes Polypeptid an eine Nukleinsäuresequenz (oder einen Abschnitt davon) der vorliegenden Erfindung kodiert, hergestellt. Techniken zum Herstellen von Fusionspolypeptiden sind auf dem Fachgebiet bekannt und schließen das Ligieren der die Polypeptide kodierenden Kodierungssequenzen derart, dass sie im Raster liegen und eine Expression der fusionierten Polypeptide sich unter der Kontrolle desselben (derselben) Promotors (Promotoren) und Terminators befindet, ein.

[0053] Die vorliegende Erfindung betrifft auch isolierte Nukleinsäuresequenzen, die ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung kodieren, die unter niederstringenten Bedingungen, stärker bevorzugt mittelstringenten Bedingungen und besonders bevorzugt hochstringenten Bedingungen mit einer Oligonukleotidsonde hybridisie-

ren, die unter denselben Bedingungen mit der Nukleinsäuresequenz von SEQ ID NR:1 oder ihrem Komplementärstrang hybridisiert; oder Allelvarianten und Untersequenzen davon (Sambrook et al., 1989, vorstehend).

Nukleinsäurekonstrukte

[0054] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Nukleinsäurekonstrukte, die eine Nukleinsäuresequenz der vorliegenden Erfindung umfassen, die mit einer oder mehreren Kontrollsequenzen verknüpft sind, die die Expression der Kodierungssequenz in einer geeigneten Wirtszelle unter mit den Kontrollsequenzen verträglichen Bedingungen lenken. Die Expression ist so zu verstehen, dass sie jeden beliebigen Schritt, der bei der Herstellung des Polypeptids, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, Transkription, post-transkriptionale Modifikation, Translation, post-translationale Modifikation und Sekretion, einbezieht.

[0055] „Nukleinsäurekonstrukt“ ist hier als ein entweder einzel- oder doppelsträngiges Nukleinsäuremolekül definiert, das von einem natürlich vorkommenden Gen isoliert ist oder so modifiziert worden ist, dass sie Segmente der Nukleinsäure beinhaltet, die in einer sonst in der Natur nicht vorkommenden Weise kombiniert oder nebeneinander gestellt sind. Der Begriff Nukleinsäurekonstrukt ist synonym mit dem Ausdruck Expressionskassette, wenn das Nukleinsäurekonstrukt sämtliche zur Expression einer Kodierungssequenz der vorliegenden Erfindung erforderlichen Kontrollsequenzen enthält. Der Begriff „Kodierungssequenz“ ist, wie hier definiert, eine Sequenz, die in mRNA transkribiert und in ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung translatiert ist. Die Grenzen der Kodierungssequenz werden im Allgemeinen durch eine Ribosombindungsstelle (Prokaryonten) oder durch das ATG-Startkodon (Eukaryonten), lokalisiert unmittelbar stromaufwärts des offenen Leserasters am 5'-Ende der mRNA, und eine Transkriptionsterminatorsequenz, lokalisiert unmittelbar stromabwärts des offenen Leserasters am 3'-Ende der mRNA, bestimmt. Eine Kodierungssequenz kann DNA, cDNA und rekombinante Nukleinsäuresequenzen einschließen, ist jedoch nicht darauf beschränkt.

[0056] Eine isolierte Nukleinsäuresequenz, die ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung kodiert, kann in einer Vielfalt von Weisen manipuliert werden, um die Expression des Polypeptids bereitzustellen. Eine Manipulation der Nukleinsäuresequenz, die ein Polypeptid vor dessen Einfügung in einen Vektor kodiert, kann je nach Expressionsvektor erwünscht oder notwendig sein. Die Techniken zum Modifizieren von Nukleinsäuresequenzen unter Verwendung von Klonierungsverfahren sind auf dem Fachgebiet bekannt.

[0057] Der Begriff „Kontrollsequenzen“ ist hier derart definiert, dass er alle Bestandteile einschließt, die für die Expression eines Polypeptids der vorliegenden Erfindung notwendig oder vorteilhaft sind. Jede Kontrollsequenz kann für die das Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz nativ oder fremd sein. Derartige Kontrollsequenzen schließen einen Leader, eine Polyadenylierungssequenz, eine Propeptidsequenz, einen Promotor, eine Signalsequenz und einen Transkriptionsterminator ein, sind jedoch nicht darauf beschränkt. Mindestens schließen die Kontrollsequenzen einen Promotor und Transkriptions- und Translationsstoppsignale ein. Die Kontrollsequenzen können mit Verknüpfungsgruppen zum Zwecke des Einbringens von spezifischen Restriktionsstellen versehen sein, die die Ligation der Kontrollsequenzen mit dem Kodierungsbereich der das Polypeptid kodierenden Nukleinsäuresequenz erleichtern. Der Begriff „funktionsfähig verknüpft“ ist hier als Konfiguration definiert, in welcher eine Kontrollsequenz entsprechend an einer Position in Bezug zur Kodierungssequenz der DNA-Sequenz derart platziert ist, dass die Kontrollsequenz die Herstellung eines Polypeptids lenkt.

[0058] Die Kontrollsequenz kann eine geeignete Promotorsequenz, eine Nukleinsäuresequenz, die von einer Wirtszelle zur Expression der Nukleinsäuresequenz erkannt wird, sein. Die Promotorsequenz enthält Transkriptionskontrollsequenzen, die die Expression des Polypeptids vermitteln. Der Promotor kann eine beliebige Nukleinsäuresequenz sein, die in der Wirtszelle der Wahl eine Transkriptionsaktivität zeigt, einschließlich mutanter, verkürzter und Hybridpromotoren, und kann von Genen erhalten werden, die extrazelluläre oder intrazelluläre Polypeptide entweder homolog oder heterolog zur Wirtszelle kodieren.

[0059] Beispiele für geeignete Promotoren zum Leiten der Transkription der Nukleinsäurekonstrukte der vorliegenden Erfindung, insbesondere in einer Bakterienwirtszelle, sind die Promotoren, die vom lac-Operon von *E. coli*, dem Agarasegen (*dagA*) von *Streptomyces coelicolor*, dem Levansucrasegen (*sacB*) von *Bacillus subtilis*, dem alpha-Amylasegen (*amyL*) von *Bacillus licheniformis*, dem maltogenen Amylasegen (*amyM*) von *Bacillus stearothermophilus*, dem alpha-Amylasegen (*amyQ*) von *Bacillus amyloliquefaciens*, dem Penicillinasegen (*penP*) von *Bacillus licheniformis*, dem *xylA*- und dem *xylB*-Gen von *Bacillus subtilis* und dem prokaryontischen beta-Lactamasegen (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 3727–3731), sowie dem *tac*-Promotor (DeBoer et al., 1983, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80: 21–25) erhalten werden. Weitere Promotoren sind in „Useful proteins from recombinant bac-

teria" in Scientific American, 1980, 242: 74–94; und in Sambrook et al., 1989, vorstehend, beschrieben.

[0060] Beispiele für geeignete Promotoren zum Leiten der Transkription der Nukleinsäurekonstrukte der vorliegenden Erfindung in einer Fadenpilzwirtszelle sind Promotoren, die von den Genen erhalten werden, die TAKA-Amylase von *Aspergillus oryzae*, Aspartamproteinase von *Rhizomucor miehei*, neutrale alpha-Amylase von *Aspergillus niger*, säurestabile alpha-Amylase von *Aspergillus niger*, Glucoamylase (glaA) von *Aspergillus niger* oder *Aspergillus awamori*, Lipase von *Rhizomucor miehei*, alkalische Protease von *Aspergillus oryzae*, Triosephosphatisomerase von *Aspergillus oryzae*, Acetamidase von *Aspergillus nidulans*, trypsinartige Protease von *Fusarium oxysporum* (US-Patent Nr. 4,288,627) kodieren und mutante, verkürzte und Hybridpromotoren davon. Besonders bevorzugte Promoter zur Verwendung in Fadenpilzwirtszellen sind die TAKA-Amylase-, NA2-tpi-(ein Hybrid der Promotoren aus den Genen, welche die neutrale alpha-Amylase von *Aspergillus niger* und die Triosephosphatisomerase von *Aspergillus oryzae* kodieren) und die glaA-Promotoren.

[0061] In einem Hefewirt werden nützliche Promotoren von dem Enolase(ENO-1)-Gen von *Saccharomyces cerevisiae*, dem Galactokinasegen (GAL1) von *Saccharomyces cerevisiae*, den Alkoholdehydrogenase-/Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenasegenen (ADH2/GAP) von *Saccharomyces cerevisiae* und dem 3-Phosphoglyceratkinasegen von *Saccharomyces cerevisiae* erhalten. Andere nützliche Promotoren für Hefewirtszellen sind von Romanos et al., 1992, Yeast 8: 423–488, beschrieben. In einer Säugerwirtszelle schließen nützliche Promotoren virale Promotoren, wie diejenigen vom Simian-Virus 40 (SV40), Rous-Sarkomavirus (RSV), Adenovirus, Rinderpapillomavirus (BPV) und humanen Cytomegalovirus (CMV) ein.

[0062] Bei der Kontrollsequenz kann es sich auch um eine geeignete Transkriptionsterminatorsequenz, eine Sequenz, die von einer Wirtszelle zum Beenden der Transkription erkannt wird, handeln. Die Terminatorsequenz ist funktionsfähig mit dem 3'-Terminus der das Polypeptid kodierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft. Jeder beliebige in der Wirtszelle der Wahl funktionelle Terminator kann in der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

[0063] Bevorzugte Terminatoren für Fadenpilzwirtszellen werden von den Genen erhalten, die TAKA-Amylase von *Aspergillus oryzae*, Glucoamylase von *Aspergillus niger*, Anthranilatsynthase von *Aspergillus nidulans*, alpha-Glucosidase von *Aspergillus niger* und trypsinartige Protease von *Fusarium oxysporum* kodieren.

[0064] Bevorzugte Terminatoren für Hefewirtszellen werden von den Genen erhalten, die Enolase von *Saccharomyces cerevisiae*, Cytochrom C (CYC1) von *Saccharomyces cerevisiae* oder Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase von *Saccharomyces cerevisiae* kodieren. Andere nützliche Terminatoren für Hefewirtszellen sind von Romanos et al., 1992, vorstehend, beschrieben. Terminatorsequenzen sind auf dem Fachgebiet für Säugerwirtszellen bekannt.

[0065] Bei der Kontrollsequenz kann es sich auch um eine geeignete Leadersequenz, einen nicht translatierten Bereich einer mRNA, der für die Translation durch die Wirtszelle wichtig ist, handeln. Die Leadersequenz ist funktionsfähig mit dem 5'-Terminus der das Polypeptid kodierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft. Jede beliebige in der Wirtszelle der Wahl funktionelle Leadersequenz kann in der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

[0066] Bevorzugte Leader für Fadenpilzwirtszellen werden von den Genen erhalten, die TAKA-Amylase von *Aspergillus oryzae* und Triosephosphatisomerase von *Aspergillus nidulans* kodieren.

[0067] Geeignete Leader für Hefewirtszellen werden von dem Enolase(ENO-1)-Gen von *Saccharomyces cerevisiae*, dem 3-Phosphoglyceratkinasegen von *Saccharomyces cerevisiae*, dem alpha-Faktor von *Saccharomyces cerevisiae* und den Alkoholdehydrogenase-/Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenasegenen (ADH2/GAP) von *Saccharomyces cerevisiae* erhalten.

[0068] Bei der Kontrollsequenz kann es sich auch um eine Polyadenylierungssequenz, eine Sequenz, die mit dem 3'-Terminus der Nukleinsäuresequenz funktionsfähig verknüpft ist und die beim Transkribieren von der Wirtszelle als Signal zum Addieren von Polyadenosinresten an transkribierte mRNA erkannt wird, handeln. Jede beliebige in der Wirtszelle der Wahl funktionelle Polyadenylierungssequenz kann in der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

[0069] Bevorzugte Polyadenylierungssequenzen für Fadenpilzwirtszellen werden von Genen erhalten, die TAKA-Amylase von *Aspergillus oryzae*, Glucoamylase von *Aspergillus niger*, Anthranilatsynthase von *Aspergillus nidulans* und alpha-Glucosidase von *Aspergillus niger* kodieren.

[0070] Nützliche Polyadenylierungssequenzen für Hefewirtszellen sind von Guo und Sherman, 1995, *Molecular Cellular Biology* 15: 5983–5990, beschrieben.

[0071] Polyadenylierungssequenzen sind auf dem Fachgebiet für Säugervirtszellen bekannt.

[0072] Bei der Kontrollsequenz kann es sich auch um einen Signalpeptidkodierungsbereich handeln, der für eine mit dem Amino-Terminus des Polypeptids verknüpfte Aminosäuresequenz kodiert, der das kodierte Polypeptid in den sekretorischen Weg der Zelle lenken kann. Das 5'-Ende der Kodierungssequenz der Nukleinsäuresequenz kann in sich einen Signalpeptidkodierungsbereich enthalten, der im Translationsableseraster mit dem Segment des Kodierungsbereichs, der das sekretierte Polypeptid kodiert, auf natürliche Weise verknüpft ist. Alternativ dazu kann das 5'-Ende der Kodierungssequenz einen Signalpeptidkodierungsbereich enthalten, der für die Kodierungssequenz fremd ist. Der fremde Signalpeptidkodierungsbereich kann erforderlich sein, wenn die Kodierungssequenz nicht üblicherweise einen Signalpeptidkodierungsbereich enthält. Alternativ dazu kann der fremde Signalpeptidkodierungsbereich einfach den natürlichen Signalpeptidkodierungsbereich ersetzen, um eine verbesserte Sekretion des Polypeptids zu erhalten. Der Signalpeptidkodierungsbereich kann von einem Glucoamylase- oder einem Amylasegen von einer *Aspergillus*-Spezies, einem Lipase- oder Proteasegen von einer *Rhizomucor*-Spezies, dem Gen für den alpha-Faktor von *Saccharomyces cerevisiae*, einem Amylase- oder einem Proteasegen von einer *Bacillus*-Spezies oder dem Kälber-Präprochymosin erhalten werden. Jedoch kann jeder beliebige Signalpeptidkodierungsbereich, der das exprimierte Polypeptid in den sekretorischen Weg einer Wirtszelle der Wahl lenkt, in der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

[0073] Ein wirksamer Signalpeptidkodierungsbereich für Bakterienwirtszellen ist der Signalpeptidkodierungsbereich, der vom maltogenen Amylasegen von *Bacillus* NCIB 11837, dem alpha-Amylasegen von *Bacillus stearothermophilus*, dem Subtilisingen von *Bacillus licheniformis*, dem beta-Lactamasegen von *Bacillus licheniformis*, den neutralen Proteasegenen (nprT, nprS, nprM) von *Bacillus stearothermophilus* oder dem PrsA-Gen von *Bacillus subtilis* erhalten wird.

[0074] Weitere Signalpeptide sind von Simonen und Palva, 1993, *Microbiological Reviews* 57: 109–137, beschrieben.

[0075] Ein wirksamer Signalpeptidkodierungsbereich für Fadenpilzwirtszellen ist der Signalpeptidkodierungsbereich, der vom TAKA-Amylasegen von *Aspergillus oryzae*, dem neutralen Amylasegen von *Aspergillus niger*, dem Aspartamproteinasen von *Rhizomucor miehei*, dem Cellulasegen von *Humicola lanuginosa* oder dem Lipasegen von *Humicola lanuginosa* erhalten wird.

[0076] Nützliche Signalpeptide für Hefewirtszellen werden von den Genen für den alpha-Faktor von *Saccharomyces cerevisiae* und die Invertase von *Saccharomyces cerevisiae* erhalten. Andere nützliche Signalpeptidkodierungsbereiche sind von Romanos et al., 1992, vorstehend, beschrieben.

[0077] Bei der Kontrollsequenz kann es sich auch um einen Propeptidkodierungsbereich handeln, der für eine am Amino-Terminus eines Polypeptids positionierte Aminosäuresequenz kodiert. Das erhaltene Polypeptid ist als Proenzym oder Propolypeptid (oder in manchen Fällen als Zymogen) bekannt. Ein Propolypeptid ist im Allgemeinen inaktiv und kann durch katalytische oder autokatalytische Abspaltung des Propeptids vom Propolypeptid zu einem reifen, aktiven Polypeptid umgewandelt werden. Der Propeptidkodierungsbereich kann von dem alkalischen Proteasegen (aprF) von *Bacillus subtilis*, dem neutralen Proteasegen (nprT) von *Bacillus subtilis*, dem alpha-Faktorgen von *Saccharomyces cerevisiae*, dem Aspartamproteinasen von *Rhizomucor miehei* oder dem Laccasegen von *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836) erhalten werden.

[0078] Wo sowohl Signalpeptid- als auch Propeptidbereiche am Amino-Terminus eines Polypeptids vorliegen, ist der Propeptidbereich am nächsten zum Amino-Terminus eines Polypeptids positioniert und ist der Signalpeptidbereich am nächsten zum Amino-Terminus des Propeptidbereichs positioniert.

[0079] Die Nukleinsäurekonstrukte der vorliegenden Erfindung können auch eine oder mehrere Nukleinsäuresequenzen, die einen oder mehrere zum Leiten der Expression des Polypeptids vorteilhafte Faktoren kodieren, z.B. einen Transkriptionsaktivator (z.B. einen trans wirkenden Faktor), einen Chaperon und eine Verarbeitungsprotease, umfassen. Jeder beliebige in der Wirtszelle der Wahl funktionelle Faktor kann in der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Die einen oder mehrere dieser Faktoren kodierenden Nukleinsäuren sind mit der das Polypeptid kodierenden Nukleinsäuresequenz nicht unbedingt hintereinander angeordnet.

[0080] Ein Transkriptionsaktivator ist ein Protein, das die Transkription einer ein Polypeptid kodierenden Nu-

kleinsäuresequenz aktiviert (Kudla et al., 1990, EMBO Journal 9: 1355–1364; Jarai und Buxton, 1994, Current Genetics 26: 2238–244; Verdier, 1990, Yeast 6: 271–297). Die einen Aktivator kodierende Nukleinsäuresequenz kann von den Genen erhalten werden, die NprA (nprA) von *Bacillus stearothermophilus*, Häm-Aktivatorprotein 1 (hap1) von *Saccharomyces cerevisiae*, Galactose metabolisierendes Protein 4 (gal4) von *Saccharomyces cerevisiae*, Ammoniakregulationsprotein (areA) von *Aspergillus nidulans* und alpha-Amylaseaktivator (amyR) von *Aspergillus oryzae* kodieren. Für weitere Beispiele siehe Verdier, 1990, vorstehend, und MacKenzie et al., 1993, Journal of General Microbiology 139: 2295–2307.

[0081] Ein Chaperon ist ein Protein, das ein anderes Polypeptid beim richtigen Falten unterstützt (Hartl et al., 1994, TIBS 19: 20–25; Bergeron et al., 1994, TIBS 19: 124–128; Demolder et al., 1994, Journal of Biotechnology 32: 179–189; Craig, 1993, Science 260: 1902–1903; Gething und Sambrook, 1992, Nature 355: 33–45; Puig und Gilbert, 1994, Journal of Biological Chemistry 269: 7764–7771; Wang und Tsou, 1993, The FASEB Journal 7: 1515–11157; Robinson et al., 1994, Bio/Technology 1: 381–384; Jacobs et al., 1993, Molecular Microbiology 8: 957–966). Die ein Chaperon kodierende Nukleinsäuresequenz kann von den Genen erhalten werden, die GroE-Proteine von *Bacillus subtilis*, PrsA von *Bacillus subtilis*, Proteindisulfidisomerase von *Aspergillus oryzae*, Calnexin von *Saccharomyces cerevisiae*, Ctp/GRP78 von *Saccharomyces cerevisiae* und Hsp70 von *Saccharomyces cerevisiae* kodieren. Für weitere Beispiele siehe Gething und Sambrook, 1992, vorstehend, und Hartl et al., 1994, vorstehend.

[0082] Eine Verarbeitungsprotease ist eine Protease, die ein Propeptid spaltet, um ein reifes, biochemisch aktives Polypeptid zu bilden (Enderlin und Ogrydziak, 1994, Yeast 10: 67–79; Fuller et al., 1989, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 86: 1434–1438; Julius et al., 1984, Cell 37: 1075–1089; Julius et al., 1983, Cell 32: 839–852; US-Patent Nr. 5,702,934). Die eine Verarbeitungsprotease kodierende Nukleinsäuresequenz kann von den Genen erhalten werden, die Dipeptidylaminopeptidase von *Saccharomyces cerevisiae*, Kex2 von *Saccharomyces cerevisiae*, zweibasige Verarbeitungsendoprotease (xpr6 von *Yarrowia lipolytica* und Metalloprotease (p45 Gen) von *Fusarium oxysporum* kodieren.

[0083] Es kann auch wünschenswert sein, regulatorische Sequenzen zu addieren, die die Regulation der Expression des Polypeptids in Bezug auf das Wachstum der Wirtszelle ermöglichen. Beispiele für regulatorische Systeme sind diejenigen, die verursachen, dass die Expression des Gens in Antwort auf einen chemischen oder physikalischen Reiz, einschließlich der Gegenwart einer regulatorischen Verbindung, an- oder abgeschaltet wird. Regulatorische Systeme in prokaryontischen Systemen würden die lac-, tac- und trp-Operatorsysteme einschließen. In Hefe kann das ADH2-System oder das GAL1-System verwendet werden. In Fadenpilzen können der TAKA-alpha-Amylasepromotor, der Glucoamylasepromotor von *Aspergillus niger* und der Glucoamylasepromotor von *Aspergillus oryzae* als regulatorische Sequenzen verwendet werden. Andere Beispiele für regulatorische Sequenzen sind diejenigen, die die Genamplifikation ermöglichen. In eukaryontischen Systemen schließen diese das in Gegenwart von Methotrexat amplifizierte Dihydrofolatreduktasegen und die mit Schwermetallen amplifizierten Metallothioneingene ein. In diesen Fällen wäre die das Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz mit der regulatorischen Sequenz funktionsfähig verknüpft.

[0084] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Nukleinsäurekonstrukte zum Abändern der Expression eines endogenen Gens, das ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung kodiert. Die Konstrukte können die Mindestanzahl an Bestandteilen enthalten, die zum Abändern der Expression des endogenen Gens notwendig sind. In einer Ausführungsform enthalten die Nukleinsäurekonstrukte vorzugsweise (a) eine Zielsequenz, (b) eine regulatorische Sequenz, (c) ein Exon und (d) eine Spleißdonorstelle. Nach Einbringung des Nukleinsäurekonstrukts in eine Zelle fügt sich das Konstrukt durch homologe Rekombination an der endogenen Genstelle in das Zellgenom ein. Die Zielsequenz lenkt die Integration der Elemente (a)–(d) in das endogene Gen derart, dass die Elemente (b)–(d) mit dem endogenen Gen funktionsfähig verknüpft sind. In einer anderen Ausführungsform enthalten die Nukleinsäurekonstrukte (a) eine Zielsequenz, (b) eine regulatorische Sequenz, (c) ein Exon, (d) eine Spleißdonorstelle, (e) ein Intron und (f) eine Spleißakzeptorstelle, wobei die Zielsequenz die Integration der Elemente (a)–(f) derart lenkt, dass die Elemente (b)–(f) mit dem endogenen funktionsfähig verknüpft sind. Jedoch können die Konstrukte auch zusätzliche Bestandteile, wie eine selektierbare Markierung, enthalten.

[0085] In beiden Ausführungsformen führt die Einbringung dieser Bestandteile zur Herstellung einer neuen Transkriptionseinheit, in welcher die Expression des endogenen Gens abgeändert ist. Im Wesentlichen ist die neue Transkriptionseinheit ein Fusionsprodukt der Sequenzen, die durch die Zielkonstrukte des endogenen Gens eingebracht werden. In einer Ausführungsform, in welcher das endogene Gen abgeändert wird, wird das Gen aktiviert. In dieser Ausführungsform wird die homologe Rekombination zum Ersetzen, Unterbrechen oder Inaktivieren des normalerweise mit dem endogenen Gen einer parentalen Zelle durch die Einfügung einer re-

gulatorischen Sequenz verbundenen, regulatorischen Bereichs verwendet, was verursacht, dass das Gen mit höheren Gehalten exprimiert wird, als in der entsprechenden parentalen Zelle nahe liegend ist. Das aktivierte Gen kann durch Einschluss eines amplifizierbaren, selektierbaren Markierungsgens in das Konstrukt unter Verwendung von auf dem Fachgebiet bekannten Verfahren weiter amplifiziert werden (siehe z.B. US-Patent Nr. 5,641,670). In einer anderen Ausführungsform, in welcher das endogene Gen abgeändert wird, wird die Expression des Gens reduziert.

[0086] Die Zielsequenz kann innerhalb des endogenen Gens, unmittelbar benachbart zu dem Gen, innerhalb eines Stromaufwärts-Gens oder stromaufwärts und mit einem Abstand vom endogenen Gen vorliegen. Eine oder mehrere Zielsequenzen können verwendet werden. Zum Beispiel setzt ein kreisförmiges Plasmid- oder DNA-Fragment vorzugsweise eine einzelne Zielsequenz ein, während ein lineares Plasmid- oder DNA-Fragment vorzugsweise zwei Zielsequenzen einsetzt.

[0087] Die regulatorische Sequenz des Konstrukts kann aus einem oder mehreren Promotoren, Verstärkern, Gerüstanlagerungsbereichen oder Matrixanlagerungsstellen, negativen regulatorischen Elementen, Transkriptionsbindungsstellen oder Kombinationen dieser Sequenzen zusammengesetzt sein.

[0088] Die Konstrukte enthalten ferner ein oder mehrere Exons des endogenen Gens. Ein Exon ist als eine DNA-Sequenz definiert, die in RNA einkopiert ist und in einem reifen mRNA-Molekül derart vorliegt, dass die Exon-Sequenz innerhalb des Rasters mit dem Kodierungsbereich des endogenen Gens liegt. Die Exons können wahlweise DNA enthalten, die eine oder mehrere Aminosäuren kodiert und/oder eine Aminosäure teilweise kodiert. Alternativ dazu enthält das Exon DNA, die einem 5'-Nichtkodierungsbereich entspricht. Wo das exogene Exon oder die exogenen Exons eine oder mehrere Aminosäuren und/oder einen Teil einer Aminosäure kodiert/kodieren, ist das Nukleinsäurekonstrukt derart konstruiert, dass nach Transkription und Spleißen das Leseraster innerhalb des Rasters mit dem Kodierungsbereich des endogenen Gens derart liegt, dass das entsprechende Ableseraster des Teils der mRNA, der von dem zweiten Exon abgeleitet ist, unverändert ist.

[0089] Die Spleißdonorstelle der Konstrukte lenkt das Spleißen von einem Exon zu einem anderen Exon. Typischer Weise liegt das erste Exon an 5' des zweiten Exons, und die das erste Exon an seiner 3'-Seite überlappende und eingrenzende Spleißdonorstelle erkennt eine das zweite Exon an der 5'-Seite des zweiten Exons eingrenzende Spleißakzeptorstelle. Eine Spleißakzeptorstelle ist wie eine Spleißdonorstelle eine Sequenz, die das Spleißen von einem Exon zu einem anderen Exon lenkt. Indem sie zusammen mit einer Spleißdonorstelle wirkt, verwendet die Spleißapparatur eine Spleißakzeptorstelle zum Bewirken der Entfernung eines Introns.

Expressionsvektoren

[0090] Die vorliegende Erfindung betrifft auch rekombinante Expressionsvektoren, die eine Nukleinsäuresequenz der vorliegenden Erfindung, einen Promotor und Transkriptions- und Translationsstoppsignale umfassen. Die verschiedenen, vorstehend beschriebenen Nukleinsäure- und Kontrollsequenzen können miteinander verbunden werden, um einen rekombinanten Expressionsvektor herzustellen, der eine oder mehrere günstige Restriktionsstellen einschließen kann, um die Einfügung oder Substitution der das Polypeptid kodierenden Nukleinsäuresequenz an derartigen Stellen zu ermöglichen. Alternativ dazu kann die Nukleinsäuresequenz der vorliegenden Erfindung durch Einfügen der Nukleinsäuresequenz oder eines die Sequenz umfassenden Nukleinsäurekonstrukts zur Expression in einen passenden Vektor exprimiert werden. Beim Bilden des Expressionsvektors wird die Kodierungssequenz im Vektor derart lokalisiert, dass die Kodierungssequenz mit den passenden Kontrollsequenzen zur Expression, und möglicherweise zur Sekretion, funktionsfähig verknüpft wird.

[0091] Der rekombinante Expressionsvektor kann ein beliebiger Vektor (z.B. ein Plasmid oder Virus) sein, der in geeigneter Weise rekombinanten DNA-Prozeduren unterzogen werden und die Expression der Nukleinsäuresequenz herbeiführen kann. Die Wahl des Vektors hängt typischer Weise von der Verträglichkeit des Vektors mit der Wirtszelle, in welche der Vektor einzubringen ist, ab. Die Vektoren können lineare oder geschlossene kreisförmige Plasmide sein. Der Vektor kann ein autonom replizierender Vektor, d.h. ein Vektor, der als extrachromosomale Einheit vorliegt, dessen Replikation von der chromosomalen Replikation unabhängig ist, z.B. ein Plasmid, ein extrachromosomales Element, ein Minichromosom oder ein künstliches Chromosom, sein. Der Vektor kann beliebige Mittel zum Gewährleisten der Selbstreplikation enthalten. Alternativ dazu kann der Vektor einer sein, der beim Einbringen in eine Wirtszelle in das Genom integriert und zusammen mit dem(dem) Chromosom(en), in welche(s) er integriert wurde, repliziert wird. Das Vektorsystem kann ein einzelner Vektor oder ein Plasmid oder zwei oder mehrere Vektoren oder Plasmide, die zusammen die gesamte in das Genom der Wirtszelle einzubringende DNA enthalten, oder ein Transposon sein.

[0092] Die Vektoren der vorliegenden Erfindung enthalten vorzugsweise eine oder mehrere selektierbare Markierungen, die eine leichte Selektion von transformierten Zellen ermöglichen. Eine selektierbare Markierung ist ein Gen, dessen Produkt eine biozide oder virale Resistenz, Resistenz gegenüber Schwermetallen, Prototrophie gegenüber Auxotrophen und dergleichen bereitstellt. Beispiele für bakterielle selektierbare Markierungen sind die *dal*-Gene von *Bacillus subtilis* oder *Bacillus licheniformis* oder Markierungen, die Antibiotikumresistenz, wie Ampicillin-, Kanamycin-, Chloramphenicol- oder Tetracyclinresistenz, verleihen. Geeignete Markierungen für Säugerzellen sind die Resistenzgene von Dihydrofolatreduktase (*dhfr*), Hygromycinphosphotransferase (*hygB*), Aminoglycosidphosphotransferase II und Phleomycin. Geeignete Markierungen für Hefewirtszellen sind ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 und URA3. Eine selektierbare Markierung zur Verwendung in einer Fadenpilzwirtszelle kann ausgewählt werden aus der Gruppe, einschließend, jedoch nicht beschränkt auf, *amdS* (Acetamidase), *argB* (Ornithincarbamoyltransferase), *bar* (Phosphinothricinacetyltransferase), *hygB* (Hygromycinphosphotransferase), *niaD* (Nitratreduktase), *pyrG* (Orotidin-5'-phosphatdecarboxylase), *sC* (Sulfatadenyltransferase), *trpC* (Anthranilatsynthase) sowie Äquivalente von anderen Spezies. Bevorzugt zur Verwendung in einer *Aspergillus*-Zelle sind die *amdS*- und *pyrG*-Gene von *Aspergillus nidulans* oder *Aspergillus oryzae* und das *bar*-Gen von *Streptomyces hygroscopicus*. Weiterhin kann eine Auswahl durch Kointegration, z.B. wie beschrieben in WO 91/17243, getroffen werden, wo die selektierbare Markierung auf einem separaten Vektor vorliegt.

[0093] Die Vektoren der vorliegenden Erfindung enthalten vorzugsweise (ein) Element(e), das/die eine stabile Integration des Vektors in das Wirtszellengenom oder eine autonome Replikation des Vektors in der Zelle, unabhängig vom Genom der Zelle, ermöglicht (ermöglichen).

[0094] Für eine Integration in das Wirtszellengenom kann der Vektor zur stabilen Integration des Vektors in das Genom durch homologe oder nicht-homologe Rekombination auf die das Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz oder ein beliebiges anderes Element des Vektors angewiesen sein. Alternativ dazu kann der Vektor zusätzliche Nukleinsäuresequenzen zum Leiten der Integration durch homologe Rekombination in das Genom der Wirtszelle enthalten. Die zusätzlichen Nukleinsäuresequenzen ermöglichen es dem Vektor, in das Wirtszellengenom an (einer) genauen Lokalisierung(en) in dem (den) Chromosom(en) integriert zu werden. Zum Erhöhen der Wahrscheinlichkeit der Integration an einer genauen Lokalisierung sollten die Integrationselemente vorzugsweise eine ausreichende Anzahl an Nukleinsäuren, wie 100 bis 1500 Basenpaare, vorzugsweise 400 bis 1500 Basenpaare und besonders bevorzugt 800 bis 1500 Basenpaare enthalten, die mit der entsprechenden Zielsequenz zum Verbessern der Wahrscheinlichkeit der homologen Rekombination stark homolog sind. Bei den Integrationselementen kann es sich um eine beliebige mit der Zielsequenz im Genom der Wirtszelle homologe Sequenz handeln. Weiterhin kann es sich bei den Integrationselementen um Nichtkodierungs- oder Kodierungsnukleinsäuresequenzen handeln. Demgegenüber kann der Vektor durch nicht-homologe Rekombination im Genom der Wirtszelle integriert werden.

[0095] Für eine autonome Replikation kann der Vektor ferner einen Replikationsursprung umfassen, der es dem Vektor ermöglicht, in die fragliche Wirtszelle autonom zu replizieren. Beispiele für bakterielle Replikationsursprünge sind die Replikationsursprünge der Plasmide pBR322, pUC19, pACYC177 und pACYC184, die die Replikation in *E. coli* ermöglichen, und pUB110, pE194, pTA1060 und pAM β 1, die die Replikation in *Bacillus* ermöglichen. Beispiele für Replikationsursprünge zur Verwendung in einer Hefewirtszelle sind der Replikationsursprung mit 2 Micron, ARS1, ARS4, die Kombination aus ARS1 und CEN3, und die Kombination aus ARS4 und CEN6. Der Replikationsursprung kann einer sein, der eine Mutation aufweist, die ihn temperaturempfindlich in der Wirtszelle funktionieren lässt (siehe z.B. Ehrlich, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1433).

[0096] Mehr als eine Kopie einer ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung kodierenden Nukleinsäuresequenz kann in die Wirtszelle eingefügt werden, um die Expression der Nukleinsäuresequenz zu amplifizieren. Eine stabile Amplifikation der Nukleinsäuresequenz kann durch Integrieren von mindestens einer zusätzlichen Kopie der Sequenz in das Wirtszellengenom oder durch Einschließen eines amplifizierbaren selektierbaren Markierungsgens mit der Nukleinsäuresequenz erhalten werden, wobei Zellen, die amplifizierte Kopien des selektierbaren Markierungsgens, und dadurch zusätzliche Kopien der Nukleinsäuresequenz, enthalten, durch Züchten der Zellen in Gegenwart des passenden selektierbaren Mittels selektiert werden können.

[0097] Die zum Ligieren der vorstehend beschriebenen Elemente zum Konstruieren der rekombinanten Expressionsvektoren der vorliegenden Erfindung verwendeten Prozeduren sind dem Fachmann bekannt (siehe z.B. Sambrook et al., 1989, vorstehend).

Wirtszellen

[0098] Die vorliegende Erfindung betrifft auch rekombinante Wirtszellen, die eine Nukleinsäuresequenz der Erfindung umfassen, die bei der rekombinanten Herstellung der Polypeptide vorteilhaft verwendet werden. Der Begriff „Wirtszelle“ umfasst jede beliebige Nachkommenschaft einer parentalen Zelle, die mit der parentalen Zelle aufgrund von Mutationen, die während der Replikation auftreten, nicht identisch ist.

[0099] Ein Vektor, der eine Nukleinsäuresequenz der vorliegenden Erfindung umfasst, wird in eine Wirtszelle derart eingebracht, dass der Vektor als chromosomaler Integrant oder als selbst-replizierender extrachromosomaler Vektor bewahrt wird. Die Integration wird im Allgemeinen als Vorteil betrachtet, da die Nukleinsäuresequenz in der Zelle wahrscheinlicher stabil gehalten wird. Die Integration des Vektors in das Wirtschromosom kann, wie vorstehend beschrieben, durch homologe oder nicht-homologe Rekombination stattfinden.

[0100] Die Wahl einer Wirtszelle hängt weitgehend von dem das Polypeptid kodierenden Gen und dessen Quelle ab. Die Wirtszelle kann ein einzelliger Mikroorganismus, z.B. ein Prokaryont, oder ein nicht-einzelliger Mikroorganismus, z.B. ein Eukaryont, sein. Nützliche einzellige Zellen sind Bakterienzellen, wie grampositive Bakterien, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, eine *Bacillus*-Zelle, z.B. *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* und *Bacillus thuringiensis*; oder eine *Streptomyces*-Zelle, z.B. *Streptomyces lividans* oder *Streptomyces murinus*, oder gramnegative Bakterien, wie *E. coli* und *Pseudomonas* sp. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Bakterienwirtszelle eine Zelle von *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* oder *Bacillus subtilis*. Die Einbringung eines Vektors in eine Bakterienwirtszelle kann z.B. durch Protoplasttransformation (siehe z.B. Chang und Cohen, 1979, *Molecular General Genetics* 168: 111–115), durch Verwendung von kompetenten Zellen (siehe z.B. Young und Spizizin, 1961, *Journal of Bacteriology* 81: 823–829, oder Dubnau und Davidoff-Abelson, 1971, *Journal of Molecular Biology* 56: 209–221), durch Elektroporation (siehe z.B. Shigekawa und Dower, 1988, *Biotechniques* 6: 742–751) oder durch Konjugation (siehe z.B. Koehler und Thorne, 1987, *Journal of Bacteriology* 169: 5771–5278) bewirkt werden.

[0101] Die Wirtszelle kann ein Eukaryont, wie eine Säugerzelle, eine Insektenzelle, eine Pflanzenzelle oder eine Pilzzelle, sein. Nützliche Säugerzellen schließen Eierstockzellen des Chinesischen Hamsters (CHO), HeLa-Zellen, Nierenzellen des Babyhamsters (BHK), COS-Zellen oder eine beliebige Anzahl an anderen unsterblich gemachten Zelllinien, erhältlich z.B. von der American Type Culture Collection, ein.

[0102] In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Wirtszelle eine Pilzzelle. „Pilze“ schließt, wie hier verwendet, die Stämme Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota und Zygomycota (wie definiert von Hawksworth et al., in: Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8. Auflage, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK) sowie die Oomycota (wie zitiert in Hawksworth et al., 1995, vorstehend, Seite 171) und alle Mitosporenpilze (Hawksworth et al., 1995, vorstehend) ein. Repräsentative Gruppen von Ascomycota schließen z.B. *Neurospora*, *Eupenicillium* (=Penicillium), *Emericella* (*Aspergillus*), *Eurotium* (=Aspergillus) und die nachstehend aufgelisteten wirklichen Hefen ein. Beispiele für Basidiomycota schließen Pilze, Roste und Ruße ein. Repräsentative Gruppen von Chytridiomycota schließen z.B. *Allomyces*, *Blastocladiella*, *Coelomomyces* und Wasserpilze ein. Repräsentative Gruppen von Oomycota schließen z.B. saprolegniomycetöse Wasserpilze (Wasserschimmel), wie *Achlya*, ein. Beispiele für Mitosporenpilze schließen *Aspergillus*, *Penicillium*, *Candida* und *Alternaria* ein. Repräsentative Gruppen von Zygomycota schließen z.B. *Rhizopus* und *Mucor* ein.

[0103] In einer stärker bevorzugten Ausführungsform ist die Pilzwirtszelle eine Hefezelle. „Hefe“ schließt, wie hier verwendet, ascosporogene Hefe (Endomycetales), basidiosporogene Hefe und Hefe, die zu Fungi Imperfecti (Blastomycetes) gehört, ein. Die ascosporogenen Hefen sind in die Familien *Sporophthoraceae* und *Saccharomycetaceae* unterteilt. Letztere ist aus vier Unterfamilien, *Schizosaccharomycetaceae* (z.B. Gattung *Schizosaccharomyces*), *Nadsonioideae*, *Lipomycoideae* und *Saccharomycetaceae* (z.B. Gattungen *Kluyveromyces*, *Pichia* und *Saccharomyces*) zusammengesetzt. Die basidiosporogenen Hefen schließen die Gattungen *Leucosporidium*, *Rhodospodium*, *Sporidiobolus*, *Filobasidium* und *Filobasidiella* ein. Hefen, die zu Fungi Imperfecti gehören, sind in zwei Familien, *Sporobolomycetaceae* (z.B. Gattungen *Sporobolomyces* und *Bullera*) und *Cryptococcaceae* (z.B. Gattung *Candida*) unterteilt. Da die Klassifizierung von Hefe sich zukünftig ändern kann, soll für die Zwecke dieser Erfindung Hefe wie in *Biology and Activities of Yeast* (Skinner, F.A., Passmore, S.M., und Davenport, R.R., Hrsg., Soc. App. Bacteriol. Symposium Series Nr. 9, 1980, beschrieben, definiert sein. Die Biologie von Hefe und die Manipulation der Hefegenetik sind auf dem Fachgebiet bekannt (siehe z.B. *Biochemistry and Genetics of Yeast*, Bacil, M., Horecker, B.J., und Stopani, A.O.M., Herausgeber, 2.

Auflage, 1987; The Yeasts, Rose, A.H., und Harrison, J.S., Herausgeber, 2. Auflage, 1987; und The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, Strathern et al., Herausgeber, 1981).

[0104] In einer noch stärker bevorzugten Ausführungsform ist die Hefewirtszelle eine Zelle einer Spezies von *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* oder *Yarrowia*.

[0105] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Hefewirtszelle eine Zelle von *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* oder *Saccharomyces oviformis*. In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Hefewirtszelle eine Zelle von *Kluyveromyces lactis*. In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Hefewirtszelle eine Zelle von *Yarrowia lipolytica*.

[0106] In einer anderen stärker bevorzugten Ausführungsform ist die Pilzwirtszelle eine Fadenpilzzelle. „Fadenpilze“ schließen alle fadenartigen Formen der Unterabteilung Eumycota und Oomycota (wie definiert von Hawksworth et al., 1995, vorstehend) ein. Die Fadenpilze sind durch eine Myceliumwand gekennzeichnet, die aus Chitin, Cellulose, Glucan, Chitosan, Mannan und anderen komplexen Polysacchariden zusammengesetzt ist. Das vegetative Wachstum erfolgt durch hyphale Verlängerung, und der Kohlenstoffkatabolismus ist obligatorisch aerob. Im Gegensatz dazu erfolgt das vegetative Wachstum bei Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* durch Keimen eines einzelligen Thallus, und der Kohlenstoffkatabolismus kann fermentativ sein. In einer stärker bevorzugten Ausführungsform ist die Fadenpilzwirtszelle eine Zelle einer Spezies von *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Thielavia*, *Tolypocladium* und *Trichoderma*, jedoch nicht darauf beschränkt.

[0107] In einer noch stärker bevorzugten Ausführungsform ist die Fadenpilzwirtszelle eine *Aspergillus*-Zelle. In einer anderen noch stärker bevorzugten Ausführungsform ist die Fadenpilzwirtszelle eine *Acremonium*-Zelle. In einer anderen noch stärker bevorzugten Ausführungsform ist die Fadenpilzwirtszelle eine *Fusarium*-Zelle. In einer anderen noch stärker bevorzugten Ausführungsform ist die Fadenpilzwirtszelle eine *Humicola*-Zelle. In einer anderen noch stärker bevorzugten Ausführungsform ist die Fadenpilzwirtszelle eine *Mucor*-Zelle. In einer anderen noch stärker bevorzugten Ausführungsform ist die Fadenpilzwirtszelle eine *Myceliophthora*-Zelle. In einer anderen noch stärker bevorzugten Ausführungsform ist die Fadenpilzwirtszelle eine *Neurospora*-Zelle. In einer anderen noch stärker bevorzugten Ausführungsform ist die Fadenpilzwirtszelle eine *Penicillium*-Zelle. In einer anderen noch stärker bevorzugten Ausführungsform ist die Fadenpilzwirtszelle eine *Thielavia*-Zelle. In einer anderen noch stärker bevorzugten Ausführungsform ist die Fadenpilzwirtszelle eine *Tolypocladium*-Zelle. In einer anderen noch stärker bevorzugten Ausführungsform ist die Fadenpilzwirtszelle eine *Trichoderma*-Zelle.

[0108] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Fadenpilzwirtszelle eine Zelle von *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* oder *Aspergillus oryzae*. In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Fadenpilzwirtszelle eine Zelle von *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides* oder *Fusarium venenatum*. In einer noch stärker bevorzugten Ausführungsform ist die Fadenpilzwirtszelle eine Zelle von *Fusarium venenatum* (Nirenberg sp. nov.). In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Fadenpilzwirtszelle eine Zelle von *Humicola insolens* oder *Humicola lanuginosa*. In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Fadenpilzwirtszelle eine Zelle von *Mucor miehei*. In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Fadenpilzwirtszelle eine Zelle von *Myceliophthora thermophilum*. In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Fadenpilzwirtszelle eine Zelle von *Neurospora crassa*. In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Fadenpilzwirtszelle eine Zelle von *Penicillium purpurogenum*. In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Fadenpilzwirtszelle eine Zelle von *Thielavia terrestris*. In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform ist die *Trichoderma*-Zelle eine Zelle von *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* oder *Trichoderma viride*.

[0109] Pilzzellen können durch ein Verfahren unter Beteiligung von Protoplastbildung, Transformation der Protoplasten und Regeneration der Zellwand in einer an sich bekannten Weise transformiert werden. Geeignete Prozeduren zur Transformation von *Aspergillus*-Wirtszellen sind in EP 238 023 und Yelton et al., 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 1470–1474, beschrieben. Ein geeignetes Verfahren zum Transformieren von *Fusarium*-Spezies ist von Malardier et al., 1989, Gene 78: 147–156, oder in WO

96/00787 beschrieben. Hefen können unter Verwendung der von Becker und Guarente, in: Abelson, J.N. und Simon, M.I., Herausgeber, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Band 194, S. 182–187, Academic Press, Inc., New York; Ito et al., 1983, Journal of Bacteriology 153: 163; und Hinnen et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1920, beschriebenen Prozeduren transformiert werden. Säugerzellen können durch direkte Aufnahme unter Verwendung des Calciumphosphat-Ausfällungsverfahrens von Graham und Van der Eb (1978, Virology 52: 546) transformiert werden.

Herstellungsverfahren

[0110] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids der vorliegenden Erfindung, umfassend (a) Züchten eines Stamms, der in seiner Wildtypform das Polypeptid herstellen kann, zur Herstellung eines das Polypeptid umfassenden Überstands; und (b) Gewinnen des Polypeptids. Vorzugsweise ist der Stamm von der Gattung *Aspergillus*.

[0111] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids der vorliegenden Erfindung, umfassend (a) Züchten einer Wirtszelle unter für die Herstellung des Polypeptids förderlichen Bedingungen; und (b) Gewinnen des Polypeptids.

[0112] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids der vorliegenden Erfindung, umfassend (a) Züchten einer homolog rekombinanten Zelle, in welche eine neue Transkriptionseinheit, umfassend eine regulatorische Sequenz, ein Exon und/oder eine Spleißdonorstelle, funktionsfähig verknüpft mit einem zweiten Exon einer das Polypeptid kodierenden endogenen Nukleinsäuresequenz eingebracht wurde, unter für die Herstellung des Polypeptids förderlichen Bedingungen; und (b) Gewinnen des Polypeptids. Die Verfahren basieren auf der Verwendung einer Genaktivierungstechnologie, z.B. wie beschrieben in US-Patent Nr. 5,641,670. Die Genaktivierungstechnologie basiert auf dem Aktivieren eines normalerweise in einer Zelle unexprimierten Gens oder dem Erhöhen der Expression eines mit sehr geringem Grad in einer Zelle exprimierten Gens. Die Genaktivierungstechnologie schließt Verfahren zum Einfügen eines regulatorischen Sequenz, ein Exon und/oder eine Spleißdonorstelle enthaltenden exogenen DNA-Konstrukts in die genomische DNA einer Zelle in einer derartigen Weise, dass die Einfügung zur Herstellung einer neuen Transkriptionseinheit führt, in welcher die regulatorische Sequenz, das Exon und/oder die Spleißdonorstelle funktionsfähig verknüpft sind und die Expression des endogenen Gens aktivieren, ein.

[0113] In den Herstellungsverfahren der vorliegenden Erfindung werden die Zellen in einem zur Herstellung des Polypeptids geeigneten Nährstoffmedium unter Verwendung von auf dem Fachgebiet bekannten Verfahren gezüchtet. Zum Beispiel kann die Zelle durch Schüttelkolbenzüchtung, Fermentation in kleinem oder großem Maßstab (einschließlich kontinuierlicher, Chargen-, Zufuhrchargen oder Festzustandsfermentation) in Labor- oder industriellen Fermentatoren, durchgeführt in einem geeigneten Medium und unter die Expression und/oder Isolation des Polypeptids ermöglichenden Bedingungen, gezüchtet werden. Die Züchtung findet in einem geeigneten Kohlenstoff- und Stickstoffquellen und anorganische Salze umfassenden Nährstoffmedium unter Verwendung von auf dem Fachgebiet bekannten Prozeduren (siehe z.B. Literaturangaben für Bakterien und Hefen; Bennett, J.W., und LaSure, L., Herausgeber, More Gene Manipulations in Fungi, Academic Press, CA, 1991) statt. Geeignete Medien sind von kommerziellen Anbietern erhältlich oder können gemäß veröffentlichten Zusammensetzungen (z.B. in Katalogen der American Type Culture Collection) hergestellt werden. Wird das Polypeptid in das Nährstoffmedium sekretiert, kann das Polypeptid direkt aus dem Medium gewonnen werden. Wird das Polypeptid nicht sekretiert, kann es aus Zelllysaten gewonnen werden.

[0114] Die Polypeptide können unter Verwendung von auf dem Fachgebiet bekannten Verfahren, die für die Polypeptide spezifisch sind, nachgewiesen werden. Diese Nachweisverfahren können die Verwendung von spezifischen Antikörpern, die Bildung eines Enzymprodukts oder das Verschwinden eines Enzymsubstrats einschließen. Zum Beispiel kann ein Enzym-Assay zum Bestimmen der Aktivität des Polypeptids verwendet werden. Prozeduren zum Bestimmen von Aminopeptidaseaktivität sind auf dem Fachgebiet bekannt und schließen z.B. das Messen der anfänglichen Hydrolysegeschwindigkeit von p-Nitroanilid bei 405 nm ein.

[0115] Das erhaltene Polypeptid kann durch auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren gewonnen werden. Zum Beispiel kann das Polypeptid aus dem Nährstoffmedium durch herkömmliche Prozeduren, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, Zentrifugation, Filtration, Extraktion, Sprühtrocknung, Eindampfung oder Ausfällung, gewonnen werden.

[0116] Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung können durch eine Vielfalt von auf dem Fachgebiet bekannten Prozeduren, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, Chromatographie (z.B. Ionenaustausch, Af-

finität, hydrophob, Chromatofokussieren und Größenausschluss), elektrophoretische Prozeduren (z.B. präparatives isoelektrisches Fokussieren), Differenziallöslichkeit (z.B. Ammoniumsulfatausfällung), SDS-PAGE oder Extraktion gereinigt werden (siehe z.B. Protein Purification, J.-C. Janson und Lars Ryden, Herausgeber, VCH Publishers, New York, 1989).

Entfernung oder Reduktion von Amino-peptidaseaktivität

[0117] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Verfahren zur Herstellung einer mutanten Zelle einer parentalen Zelle, das das Unterbrechen oder Deletieren einer das Polypeptid kodierenden Nukleinsäuresequenz oder einer Kontrollsequenz davon umfasst, was dazu führt, dass die mutante Zelle weniger von dem Polypeptid als die parentale Zelle herstellt.

[0118] Die Konstruktion von eine reduzierte Amino-peptidaseaktivität aufweisenden Stämmen kann günstiger Weise durch Modifikation oder Inaktivierung einer zur Expression des Polypeptids mit Amino-peptidaseaktivität in der Zelle notwendigen Nukleinsäuresequenz erzielt werden. Die zu modifizierende oder zu inaktivierende Nukleinsäuresequenz kann z.B. eine Nukleinsäuresequenz sein, die das Polypeptid oder einen für das Aufweisen von Amino-peptidaseaktivität wesentlichen Teil davon kodiert, oder die Nukleinsäuresequenz kann eine regulatorische Funktion aufweisen, die für die Expression des Polypeptids von der Kodierungssequenz der Nukleinsäuresequenz erforderlich ist. Ein Beispiel für eine derartige regulatorische oder Kontrollsequenz kann eine Promotorsequenz oder ein funktioneller Teil davon, d.h. ein Teil, der zum Beeinflussen der Expression des Polypeptids ausreichend ist, sein. Andere Kontrollsequenzen für eine mögliche Modifikation schließen einen Leader, eine Polyadenylierungssequenz, eine Propeptidsequenz, eine Signalsequenz und einen Terminationsterminator ein, sind jedoch nicht darauf beschränkt.

[0119] Die Modifikation oder Inaktivierung der Nukleinsäuresequenz kann durch Unterziehen der Zelle einer Mutagenese und Selektieren auf Zellen, in welchen die Fähigkeit zur Herstellung von Amino-peptidase reduziert oder eliminiert worden ist, durchgeführt werden. Die Mutagenese, die spezifisch oder statistisch sein kann, kann z.B. unter Verwendung eines geeigneten physikalischen oder chemischen Mutagenisierungsmittels, durch Verwendung eines geeigneten Oligonukleotids, oder durch Unterziehen der DNA-Sequenz einer PCR-gebildeten Mutagenese durchgeführt werden. Weiterhin kann die Mutagenese durch Verwendung einer beliebigen Kombination dieser Mutagenisierungsmittel durchgeführt werden.

[0120] Beispiele für ein physikalisches oder chemisches Mutagenisierungsmittel, das für den vorliegenden Zweck geeignet ist, schließen Ultraviolett(UV)-Strahlung, Hydroxylamin, N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG), O-Methylhydroxylamin, salpetrige Säure, Ethylmethansulfonat (EMS), Natriumbisulfid, Ameisensäure und Nukleotidanaloga ein.

[0121] Werden derartige Mittel verwendet, wird die Mutagenese typischer Weise durch Inkubieren der zu mutagenisierenden Zellen in Gegenwart des Mutagenisierungsmittels der Wahl unter geeigneten Bedingungen und Selektieren auf Zellen, die eine reduzierte oder keine Expression der Amino-peptidaseaktivität zeigen, durchgeführt.

[0122] Die Modifikation oder Inaktivierung der Herstellung eines Polypeptids der vorliegenden Erfindung kann durch Einbringen, Substitution oder Entfernung von einem oder mehreren Nukleotiden in die das Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz oder ein regulatorisches zur Transkription oder Translation davon erforderliches Element erzielt werden. Zum Beispiel können Nukleotide eingefügt oder entfernt werden, um zur Einbringung eines Stoppkodons, zur Entfernung des Startkodons oder zu einer Veränderung des offenen Leserasters zu führen. Eine derartige Modifikation oder Inaktivierung kann durch stellengerichtete Mutagenese oder PCR-gebildete Mutagenese gemäß auf dem Fachgebiet bekannten Verfahren erzielt werden. Wenngleich im Prinzip die Modifikation in vivo, d.h. direkt an der die zu modifizierende Nukleinsäuresequenz exprimierenden Zelle, durchgeführt werden kann, ist es bevorzugt, dass die Modifikation, wie beispielhaft nachstehend beschrieben, in vitro durchgeführt wird.

[0123] Ein Beispiel für einen günstigen Weg zum Inaktivieren oder Reduzieren der Herstellung durch eine Wirtszelle der Wahl basiert auf Techniken des Gensatzes oder der Genunterbrechung. Zum Beispiel wird im Genunterbrechungsverfahren eine dem endogenen Gen oder Genfragment von Interesse entsprechende Nukleinsäuresequenz in vitro mutagenisiert, um eine defekte Nukleinsäuresequenz herzustellen, die dann in die Wirtszelle zur Herstellung eines defekten Gens transformiert wird. Durch homologe Rekombination ersetzt die defekte Nukleinsäuresequenz das endogene Gen oder Genfragment. Es kann erwünscht sein, dass das defekte Gen oder Genfragment auch eine Markierung kodiert, die zur Selektion von Transformanten verwendet

werden kann, in welchen das das Polypeptid kodierende Gen modifiziert oder zerstört worden ist.

[0124] Alternativ dazu kann die Modifikation oder Inaktivierung der ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung kodierenden Nukleinsäuresequenz durch etablierte Anti-Sense-Techniken unter Verwendung einer Nukleotidsequenz erzielt werden, die zur das Polypeptid kodierenden Sequenz komplementär ist. Spezieller kann die Herstellung des Polypeptids durch eine Zelle durch Einbringen einer Nukleotidsequenz reduziert oder eliminiert werden, die zu der Nukleotidsequenz komplementär ist, die das Polypeptid kodiert, das in die Zelle transkribiert werden und an die in der Zelle hergestellte Polypeptid-mRNA hybridisieren kann. Unter die Hybridisierung der komplementären Anti-Sense-Nukleotidsequenz an die Polypeptid-mRNA ermöglichenden Bedingungen wird folglich die Menge an translatiertem Polypeptid reduziert oder eliminiert.

[0125] Es ist bevorzugt, dass die gemäß den Verfahren der vorliegenden Erfindung zu modifizierende Zelle mikrobiellen Ursprungs, z.B. ein zur entweder zur Zelle homologen oder heterologen Herstellung der gewünschten Proteinprodukte geeigneter Pilzstamm ist.

[0126] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner eine mutante Zelle einer parentalen Zelle, die eine Unterbrechung oder Deletion einer das Polypeptid kodierenden Nukleinsäuresequenz oder einer Kontrollsequenz davon umfasst, was dazu führt, dass die mutante Zelle weniger von dem Polypeptid herstellt als die parentale Zelle.

[0127] Die so gebildeten Polypeptid-armen mutanten Zellen sind als Wirtszellen zur Expression von homologen und/oder heterologen Polypeptiden besonders nützlich. Deshalb betrifft Die vorliegende Erfindung ferner Verfahren zur Herstellung eines homologen oder heterologen Polypeptids, umfassend (a) Züchten einer mutanten Zelle unter für die Herstellung des Polypeptids förderlichen Bedingungen; und (b) Gewinnen des Polypeptids. Im vorliegenden Zusammenhang ist der Begriff „heterologe Polypeptide“ hier als für die Wirtszelle nicht native Polypeptide, als natives Protein, in welchem Modifikationen zum Abändern der nativen Sequenz durchgeführt worden sind, oder als natives Protein, dessen Expression infolge einer Manipulation der Wirtszelle durch rekombinante DNA-Techniken quantitativ abgeändert wurde, definiert.

[0128] In einem noch weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines Proteinprodukts, das im Wesentlichen frei von Aminopeptidaseaktivität ist, durch Fermentation einer Zelle, die sowohl ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung als auch das Proteinprodukt von Interesse herstellt. Das Verfahren umfasst die Zugabe einer wirksamen Menge eines Mittels, das Aminopeptidaseaktivität hemmen kann, zur Fermentationsbrühe, entweder während oder nach Vollendung der Fermentation, Gewinnen des Produkts von Interesse aus der Fermentationsbrühe und wahlweise Unterziehen des gewonnenen Produkts weiterer Reinigung.

[0129] In einem noch weiteren alternativen Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines Proteinprodukts, das im Wesentlichen frei von Aminopeptidaseaktivität ist, wobei das Proteinprodukt von Interesse durch eine DNA-Sequenz kodiert wird, die in einer das Polypeptid der vorliegenden Erfindung kodierenden Zelle vorliegt. Das Verfahren umfasst das Züchten der Zelle unter die Expression des Produkts ermöglichenden Bedingungen, Unterziehen der erhaltenen Kulturbrühe einer kombinierten pH- und Temperaturbehandlung derart, dass die Aminopeptidaseaktivität wesentlich reduziert wird, und Gewinnen des Produkts aus der Kulturbrühe. Alternativ dazu kann die kombinierte pH- und Temperaturbehandlung an einem Enzympräparat durchgeführt werden, das aus der Kulturbrühe gewonnen wurde. Die kombinierte pH- und Temperaturbehandlung kann wahlweise in Kombination mit einer Behandlung mit einem Aminopeptidasehemmer verwendet werden.

[0130] Die kombinierte pH- und Temperaturbehandlung wird vorzugsweise bei einem pH-Wert im Bereich von 9–11 und einer Temperatur im Bereich von 40–70°C für eine ausreichende Zeitdauer zum Erhalt der gewünschten Wirkung durchgeführt, wobei typischer Weise 30 bis 60 Minuten ausreichend sind.

[0131] Gemäß diesem Aspekt der Erfindung ist es möglich, zumindest 60%, vorzugsweise zumindest 75%, stärker bevorzugt zumindest 85%, noch stärker bevorzugt zumindest 95% und besonders bevorzugt zumindest 99% der Aminopeptidaseaktivität zu entfernen. Es wird erwogen, dass eine vollständige Entfernung von Aminopeptidaseaktivität durch Verwendung dieser Verfahren erhalten werden kann.

[0132] Die zum Züchten und Reinigen des Produkts von Interesse verwendeten Verfahren können durch auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren durchgeführt werden.

[0133] Die Verfahren der vorliegenden Erfindung zum Herstellen eines im Wesentlichen Aminopeptidase-freien Produkts sind bei der Herstellung von eukaryontischen Polypeptiden, insbesondere Pilzproteinen, wie Enzymen, von besonderem Interesse. Das Enzym kann z.B. ausgewählt sein aus einem amylytischen Enzym, eine lipolytischen Enzym, einem proteolytischen Enzym, einem cellulolytischen Enzym, einer Oxidoreduktase oder einem die Pflanzenzellwand abbauenden Enzym. Beispiele für derartige Enzyme schließen eine Aminopeptidase, eine Amylase, eine Amyloglucosidase, eine Carbohydase, eine Carboxypeptidase, eine Catalase, eine Cellulase, eine Chitinase, eine Cutinase, eine Cyclodextringlycosyltransferase, eine Deoxyribonuclease, eine Esterase, eine Galactosidase, eine beta-Galactosidase, eine Glucoamylase, eine Glucoseoxidase, eine Glucosidase, eine Halogenperoxidase, eine Hemicellulase, eine Invertase, eine Isomerase, eine Laccase, eine Ligase, eine Lipase, eine Lyase, eine Mannosidase, eine Oxidase, ein pektinolytisches Enzyme, eine Peroxidase, eine Phytase, eine Phenoloxidase, eine Polyphenoloxidase, ein proteolytisches Enzyme, eine Ribonuklease, eine Transferase, eine Transglutaminase oder eine Xylanase ein. Die Aminopeptidase-armen Zellen können auch zum Exprimieren von heterologen Proteinen von pharmazeutischem Interesse, wie Hormonen, Wachstumsfaktoren, Rezeptoren und dergleichen, verwendet werden.

[0134] Es ist klar, dass der Begriff „eukaryontische Polypeptide“ nicht nur native Polypeptide sondern auch diejenigen Polypeptide, z.B. Enzyme, einschließt, die durch Aminosäuresubstitutionen, -deletionen oder -additionen oder andere derartige Modifikationen zum Verbessern der Aktivität, Wärmestabilität, der pH-Toleranz und dergleichen modifiziert worden sind.

[0135] In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Proteinprodukt, das im Wesentlichen frei von Aminopeptidaseaktivität ist, das durch ein Verfahren der vorliegenden Erfindung hergestellt wird.

Verfahren zur Herstellung von Proteinhydrolysaten

[0136] Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung können bei der Herstellung von Proteinhydrolysaten zum Verbessern des Hydrolysegrads und der Geschmackentwicklung verwendet werden.

[0137] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Verfahren zur Verwendung eines Polypeptids der vorliegenden Erfindung in Kombination mit einer Endopeptidase zur Herstellung eines hohen Hydrolysegrads eines proteinreichen Materials. Das Verfahren umfasst die Behandlung eines proteinhaltigen Substrats mit dem Polypeptid und einer Endopeptidase. Das Substrat kann mit den Enzymen gleichzeitig oder nacheinander behandelt werden.

[0138] Ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung wird dem proteinhaltigen Substrat in einer wirksamen, herkömmlicherweise in Proteinhydrolyseverfahren eingesetzten Menge, vorzugsweise im Bereich von etwa 0,1 bis etwa 100.000 Aminopeptidaseeinheiten pro 100 g Protein und stärker bevorzugt im Bereich von etwa 1 bis etwa 10.000 Aminopeptidaseeinheiten pro 100 g Protein, zugesetzt. Wie hier definiert, ist eine Aminopeptidaseeinheit (APU) die Enzymmenge, die zum Freisetzen von 1 Mikromol p-Nitroanilid pro Minute aus Leu-p-Nitroanilid (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) unter den spezifizierten Bedingungen benötigt wird. Alternativ dazu kann die Aminopeptidase vorzugsweise im Bereich von etwa 0,5 bis etwa 500 LAPU/g Protein und stärker bevorzugt im Bereich von etwa 5 bis etwa 50 LAPU/g Protein eingesetzt werden. LAPU ist als die Leucinaminopeptidaseaktivität definiert, die wie in AF 298/1-GB (erhältlich auf Anfrage von Novo Nordisk A/S, Dänemark) beschrieben bestimmt wird.

[0139] Die Endopeptidase kann von einem Stamm von Bacillus, vorzugsweise Bacillus licheniformis oder Bacillus subtilis, einem Stamm von Staphylococcus, vorzugsweise Staphylococcus aureus, einem Stamm von Streptomyces, vorzugsweise Streptomyces thermovularis oder Streptomyces griseus, einem Stamm von Actinomyces-Species, einem Stamm von Aspergillus, vorzugsweise Aspergillus aculeatus, Aspergillus awamori, Aspergillus foetidus, Aspergillus nidulans, Aspergillus niger oder Aspergillus oryzae, oder einem Stamm von Fusarium, vorzugsweise Fusarium venenatum, erhalten werden.

[0140] Die Endopeptidase wird dem proteinhaltigen Substrat in einer wirksamen, herkömmlicherweise in Proteinhydrolyseverfahren eingesetzten Menge, vorzugsweise im Bereich von etwa 0,05 bis etwa 15 AU/100 g Protein und stärker bevorzugt von etwa 0,1 bis etwa 8 AU/100 g Protein zugesetzt. Eine AU (Anson-Unit, Anson-Einheit) ist definiert als die Enzymmenge, die unter Standardbedingungen (d.h. 25°C, pH 7,5 und 10 Min. Reaktionszeit) Hämoglobin mit einer derartigen Anfangsgeschwindigkeit verdaut, dass pro Minute eine Menge von TCA-löslichem Produkt verdaut wird, das dieselbe Farbe mit Phenolreagens wie ein Milliäquivalent Tyrosin ergibt. Das Analyseverfahren AF 4/5 ist auf Anfrage von Novo Nordisk A/S, Dänemark, das hier unter Bezugnahme eingebracht ist, erhältlich.

[0141] Die enzymatische Behandlung, d.h. die Inkubation des Substrats mit den Enzympräparaten, kann bei jeder beliebigen günstigen Temperatur, bei welcher das Enzympräparat nicht inaktiviert wird, vorzugsweise im Bereich von etwa 20°C bis etwa 70°C, stattfinden. Gemäß einer etablierten Praxis können die Enzympräparate durch Erhöhen der Temperatur des Inkubationsgemischs auf eine Temperatur, bei welcher die Enzyme inaktiviert werden, z.B. über etwa 70°C, oder gleichermaßen durch Senken des pH-Werts des Inkubationsgemischs auf einen Punkt, an welchem die Enzyme inaktiviert werden, z.B. unter etwa 4,0, geeignet inaktiviert werden.

[0142] Weiterhin führen die Verfahren der vorliegenden Erfindung zur Verbesserung des Hydrolysegrads eines proteinhaltigen Substrats. Wie hier verwendet, ist der Hydrolysegrad (DH) der Prozentanteil der Gesamtzahl an Aminobindungen in einem Protein, das durch ein proteolytisches Enzym hydrolysiert worden ist. In einer bevorzugten Ausführungsform weisen die Proteinhydrolysate einen erhöhten Gehalt an Leu, Gly, Glu, Ser, Asp, Asn, Pro, Cys, Ala und/oder Gln, z.B. mindestens 1,1 Mal mehr, auf. In einer stärker bevorzugten Ausführungsform weisen die Proteinhydrolysate einen erhöhten Gehalt an Leu auf. In einer anderen stärker bevorzugten Ausführungsform weisen die Proteinhydrolysate einen erhöhten Gehalt an Gly auf. In einer anderen stärker bevorzugten Ausführungsform weisen die Proteinhydrolysate einen erhöhten Gehalt an Glu auf. In einer anderen stärker bevorzugten Ausführungsform weisen die Proteinhydrolysate einen erhöhten Gehalt an Ser auf. In einer anderen stärker bevorzugten Ausführungsform weisen die Proteinhydrolysate einen erhöhten Gehalt an Asp auf. In einer anderen stärker bevorzugten Ausführungsform weisen die Proteinhydrolysate einen erhöhten Gehalt an Asn auf. In einer anderen stärker bevorzugten Ausführungsform weisen die Proteinhydrolysate einen erhöhten Gehalt an Pro auf. In einer anderen stärker bevorzugten Ausführungsform weisen die Proteinhydrolysate einen erhöhten Gehalt an Cys auf. In einer anderen stärker bevorzugten Ausführungsform weisen die Proteinhydrolysate einen erhöhten Gehalt an Ala auf. In einer anderen stärker bevorzugten Ausführungsform weisen die Proteinhydrolysate einen erhöhten Gehalt an Gln auf.

[0143] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Verfahren zum Erhalt eines Proteinhydrolysats, das in Bezug auf freie Glutaminsäure und/oder Peptidgebundenen Glutaminsäureresten angereichert ist, wobei das Verfahren umfasst:

- (a) Unterziehen des Substrats einem Deamidierungsverfahren; und
- (b) Unterziehen des Substrats der Wirkung eines Polypeptids mit Aminopeptidaseaktivität.

[0144] Die beiden Schritte können gleichzeitig durchgeführt werden, oder der zweite Schritt kann nach dem ersten Schritt durchgeführt werden.

[0145] Diese Verfahren der vorliegenden Erfindung stellen Proteinhydrolysate mit ausgezeichnetem Geschmack her, da Glutaminsäure (Glu), egal ob frei oder Peptid-gebunden, eine wichtige Rolle beim Geschmack und der Schmeckhaftigkeit von Proteinhydrolysaten spielt. Diese Verfahren stellen auch Proteinhydrolysate mit verbesserter Funktionalität, insbesondere verbesserter Löslichkeit, verbesserten Emulgiereigenschaften, einem erhöhten Hydrolysegrad und verbesserten Schäumungseigenschaften her.

[0146] Die Umwandlung von Amidien (Glutamin oder Asparagin) zu geladenen Säuren (Glutaminsäure oder Aspartamsäure) über Freisetzung von Ammoniak ist als Deamidierung bekannt. Die Deamidierung kann als nicht-enzymatisches oder als enzymatisches Deamidierungsverfahren stattfinden.

[0147] In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Deamidierung als enzymatisches Deamidierungsverfahren, z.B. durch Unterziehen des Substrats einer Transglutaminase und/oder Peptidoglutaminase, durchgeführt.

[0148] Die Transglutaminase kann von jeder beliebigen günstigen Quelle, einschließlich Säugern, siehe z.B. JP 1050382 und JP 5023182, einschließlich aktiviertem Faktor XIII, siehe z.B. WO 93/15234; derjenigen, die von Fisch abgeleitet sind, siehe z.B. EP 555,649; und derjenigen, die von Mikroorganismen erhalten werden, siehe z.B. EP 279,606, WO 96/06931 und WO 96/22366, stammen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Transglutaminase von einem Oomyceten, einschließlich einem Stamm von Phytophthora, vorzugsweise Phytophthora cactorum, oder einem Stamm von Pythium, vorzugsweise Pythium irregulare, Pythium sp., Pythium intermedium, Pythium ultimum oder Pythium perillium (oder Pythium periplocum) erhalten. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist die Transglutaminase bakteriellen Ursprungs und wird von einem Stamm von Bacillus, vorzugsweise Bacillus subtilis, einem Stamm von Streptovorticillium, vorzugsweise Streptovorticillium mobaraensis, Streptovorticillium griseocarneum oder Streptovorticillium cinnamoneum, und einem Stamm von Streptomyces, vorzugsweise Streptomyces lydicus, erhalten.

[0149] Die Peptidoglutaminase kann eine Peptidoglutaminase I (Peptidylglutaminase; EC 3.5.1.43) oder eine

Peptidoglutaminase II (Proteinglutaminylglutaminase; EC 3.5.1.44) oder ein beliebiges Gemisch davon sein. Die Peptidoglutaminase kann von einem Stamm von *Aspergillus*, vorzugsweise *Aspergillus japonicus*, einem Stamm von *Bacillus*, vorzugsweise *Bacillus circulans*, einem Stamm von *Cryptococcus*, vorzugsweise *Cryptococcus albidus* oder einem Stamm von *Debaryomyces*, vorzugsweise *Debaryomyces hansenii*, erhalten werden.

[0150] Die Transglutaminase wird dem proteinhaltigen Substrat in einer wirksamen, herkömmlich in Deamidierungsverfahren eingesetzten Menge, vorzugsweise im Bereich von etwa 0,01 bis etwa 5 Gew.-% und stärker bevorzugt im Bereich von etwa 0,1 bis etwa 1 Gew.-% Enzympräparat in Bezug auf die Substratmenge, zugesetzt.

[0151] Die Peptidoglutaminase wird dem proteinhaltigen Substrat in einer wirksamen, herkömmlich in Deamidierungsverfahren eingesetzten Menge, vorzugsweise im Bereich von etwa 0,01 bis etwa 100.000 PGase-Einheiten pro 100 g Substrat und stärker bevorzugt im Bereich von etwa 0,1 bis etwa 10.000 PGase-Einheiten pro 100 g Substrat, zugesetzt.

[0152] Die Peptidoglutaminaseaktivität kann gemäß dem Verfahren von Cedrangoro et al. (1965, *Enzymologia* 29: 143) bestimmt werden. Gemäß diesem Verfahren werden 0,5 ml einer mit 1 N NaOH auf pH 6,5 eingestellten Enzymprobe in ein kleines Gefäß gefüllt. Dann wird 1 ml einer Boratpufferlösung, pH 10,8, dem Gefäß zugesetzt. Der abgeführte Ammoniak wird durch 5 N Schwefelsäure absorbiert, und durch Verwendung von Nessler-Reagens lässt man das Gemisch Farbe bilden, die bei 420 nm gemessen wird. Eine PGase-Einheit ist die Enzymmenge, die unter diesen Bedingungen 1 Mikromol Ammoniak pro Minute herstellen kann.

[0153] Alternativ dazu kann die Peptidoglutaminaseaktivität gemäß dem in US 3,857,967 oder im nachstehenden Beispiel 20 beschriebenen Verfahren bestimmt werden.

[0154] In Schritt (b) der Verfahren der vorliegenden Erfindung wird das Substrat einem Polypeptid der vorliegenden Erfindung unterzogen. Ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung wird dem proteinhaltigen Substrat in einer wirksamen, herkömmlich in Proteinhydrolyseverfahren eingesetzten Menge, vorzugsweise im Bereich von etwa 0,001 bis etwa 0,5 AU/100 g Substrat, stärker bevorzugt im Bereich von etwa 0,01 bis etwa 0,1 AU/100 g Substrat, zugesetzt.

[0155] In einer anderen Ausführungsform umfassen die Verfahren der vorliegenden Erfindung zur Herstellung eines Hydrolysats, das in Bezug auf freie Glutaminsäure und/oder peptidgebundenen Glutaminsäureresten angereichert ist, ferner:

(c) Unterziehen des Substrats einem oder mehreren unspezifisch wirkenden Endo- und/oder Exopeptidaseenzym(en).

[0156] Dieser Schritt kann gleichzeitig mit den Schritten (a) und (b) stattfinden oder den Schritten (a) und (b) folgen.

[0157] In einer bevorzugten Ausführungsform wird das unspezifisch wirkende Endo- und/oder Exopeptidaseenzym von einem Stamm von *Aspergillus*, vorzugsweise *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* oder *Aspergillus sojae*, oder einem Stamm von *Bacillus*, vorzugsweise *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis* oder *Bacillus subtilis*, erhalten.

[0158] Das unspezifisch wirkende Endo- und/oder Exopeptidaseenzym wird dem Substrat in einer wirksamen, herkömmlich in Proteinhydrolyseverfahren eingesetzten Menge, vorzugsweise im Bereich von etwa 0,05 bis etwa 15 CPU/100 g Substrat und stärker bevorzugt im Bereich von etwa 0,1 bis etwa 5 CPU/100 g Substrat, zugesetzt. Eine CPU (Caseinprotease-Einheit) ist als die Enzymmenge definiert, die 1 Mikromol primäre Aminogruppen (bestimmt durch Vergleich mit einem Serin-Standard) pro Minute von Casein unter Standardbedingungen, d.h. Inkubation für eine Dauer von 30 Minuten bei 25°C und pH 9,5, freisetzt. Das Analyseverfahren AF 228/1, das hier unter Bezugnahme eingebracht ist, ist auf Anfrage von Novo Nordisk A/S, Bagsværd, Dänemark, erhältlich.

[0159] Jede enzymatische Behandlung kann bei einer beliebigen Temperatur, bei welcher das Enzympräparat nicht inaktiviert wird, vorzugsweise im Bereich von etwa 20°C bis etwa 70°C, stattfinden. Das Enzympräparat kann dann durch Erhöhen der Temperatur, z.B. über etwa 70°C, oder durch Senken des pH-Werts, z.B. unter etwa 4,0, inaktiviert werden.

[0160] Das in den Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendete proteinhaltige Substrat kann aus intakten Proteinen, vorhydrolysierten Proteinen (d.h. Peptiden) oder einem Gemisch davon bestehen. Das proteinhaltige Substrat kann pflanzlichen oder tierischen Ursprungs sein. Vorzugsweise ist das proteinhaltige Substrat pflanzlichen Ursprungs, z.B. Sojaprotein, Getreideprotein, z.B. Weizengluten, Maisgluten, Gerste, Roggen, Hafer, Reis, Zein, Lupin, Baumwollsaamenprotein, Rapssamenprotein, Erdnuss, Alfalfaprotein, Erbsenprotein, Fabaceenbohnprotein, Sesamsamenprotein oder Sonnenblumen. Ein proteinhaltiges Substrat tierischen Ursprungs kann Molkeprotein, Casein, Fleischproteine, Fischprotein, rote Blutzellen, Eiklar, Gelatine oder Lactoalbumin sein.

[0161] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Proteinhydrolysate, die durch diese Verfahren hergestellt werden.

Andere Verwendungen

[0162] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Verfahren zum Deaktivieren von Enzymen mit einem Polypeptid der vorliegenden Erfindung.

[0163] Weiterhin kann ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung für eine Anzahl von Zwecken nützlich sein, in welchen eine spezifische Spaltung von Peptidsequenzen erwünscht ist. Zum Beispiel werden einige Proteine oder Peptide in Form von inaktiven Vorläufern synthetisiert, die eine Anzahl von zusätzlichen Aminosäureresten am N-Terminus des reifen Proteins umfassen. Ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung könnte die notwendige post-translationale Verarbeitung zum Aktivieren derartiger Vorläuferproteine bereitstellen.

Zusammensetzungen

[0164] In einem noch weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung Polypeptidzusammensetzungen, die ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung umfassen. Vorzugsweise sind die Zusammensetzungen in Bezug auf ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung angereichert. Im vorliegenden Zusammenhang weist der Begriff „angereichert“ darauf hin, dass die Aminopeptidaseaktivität der Polypeptidzusammensetzung z.B. mit einem Anreicherungsfaktor von 1,1 erhöht wurde.

[0165] Die Polypeptidzusammensetzung kann ein Polypeptid der Erfindung als enzymatischen Hauptbestandteil umfassen, z.B. eine Einkomponenten-Polypeptidzusammensetzung. Alternativ dazu kann die Zusammensetzung mehrfache enzymatische Aktivitäten, wie eine Aminopeptidase, eine Amylase, eine Carboxypeptidase, eine Catalase, eine Cellulase, eine Chitinase, eine Cutinase, eine Cyclodextringlycosyltransferase, eine Deoxyribonuclease, eine Esterase, eine alpha-Galactosidase, eine beta-Galactosidase, eine Glucoamylase, eine alpha-Glucosidase, eine beta-Glucosidase, eine Haloperoxidase, eine Invertase, eine Laccase, eine Lipase, eine Mannosidase, eine Oxidase, ein pektinolytisches Enzym, eine Peptidoglutaminase, eine Peroxidase, eine Phytase, eine Polyphenoloxidase, ein proteolytisches Enzym, eine Ribonuklease, eine Transglutaminase oder eine Xylanase, umfassen. Das (Die) zusätzliche(n) Enzym(e) kann (können) mit Hilfe eines Mikroorganismus herstellbar sein, der zur Gattung *Aspergillus*, vorzugsweise *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger* oder *Aspergillus oryzae*, oder *Trichoderma*, *Humicola*, vorzugsweise *Humicola insolens*, oder *Fusarium*, vorzugsweise *Fusarium bacridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides* oder *Fusarium venenatum* gehört.

[0166] In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung eine geschmackverbessernde Zusammensetzung, die ein Polypeptid mit Aminopeptidaseaktivität und einen geeigneten Träger umfasst. Jeder beliebige geeignete auf dem Fachgebiet bekannte Träger kann verwendet werden. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform umfasst die geschmackverbessernde Zusammensetzung ferner eine Endopeptidase. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform umfasst die Aroma-Zusammensetzung ein oder mehrere unspezifisch wirkende Endo- und/oder Exopeptidaseenzym(e). In einer anderen bevorzugten Ausführungsform umfasst die Aroma-Zusammensetzung ferner ein oder mehrere spezifisch wirkende Endo- und/oder Exopeptidaseenzym(e).

[0167] In einer bevorzugten Ausführungsform ist das spezifisch wirkende proteolytische Enzym eine Endopeptidase, wie eine Glutamylendopeptidase (EC 3.4.21.19); eine Lysylendopeptidase (EC 3.4.21.50); eine Leucylendopeptidase (EC 3.4.21.57); eine Glycylendopeptidase (EC 3.4.22.25); eine Prolylendopeptidase (EC

3.4.21.26); Trypsin (EC 3.4.21.4) oder eine trypsinartige (Lysin/Argininspezifische) Endopeptidase; oder eine Peptidyl-Asp-Metalloendopeptidase (EC 3.4.24.33).

[0168] Die Glutamylendopeptidase (EC 3.4.21.19) kann vorzugsweise von einem Bacillus-Stamm, insbesondere Bacillus licheniformis und Bacillus subtilis, einem Staphylococcus-Stamm, insbesondere Staphylococcus aureus, einem Streptomyces-Stamm, insbesondere Streptomyces thermovulgaris und Streptomyces griseus, oder einem Actinomyces-Stamm erhalten werden.

[0169] Die Lysylendopeptidase (EC 3.4.21.50) kann vorzugsweise von einem Achromobacter-Stamm, insbesondere Achromobacter lyticus, einem Lysobacter-Stamm, insbesondere Lysobacter enzymogenes, oder einem Pseudomonas-Stamm, insbesondere Pseudomonas aeruginosa, erhalten werden.

[0170] Die Leucylendopeptidase (EC 3.4.21.57) kann pflanzlichen Ursprungs sein.

[0171] Die Glycylendopeptidase (EC 3.4.22.25) kann vorzugsweise von der Papayapflanze (Carica papaya) erhalten werden.

[0172] Die Prolylendopeptidase (EC 3.4.21.26) kann vorzugsweise von einem Flavobacterium-Stamm erhalten werden oder pflanzlichen Ursprungs sein.

[0173] Die trypsinartige Endopeptidase kann vorzugsweise von einem Fusarium-Stamm, insbesondere Fusarium oxysporum, z.B. wie beschrieben in WO 89/06270 oder WO 94/25583, erhalten werden.

[0174] Die Peptidyl-Asp-Metalloendopeptidase (EC 3.4.24.33) kann vorzugsweise von einem Pseudomonas-Stamm, insbesondere Pseudomonas fragi, erhalten werden.

[0175] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist das spezifisch wirkende proteolytische Enzym eine Exopeptidase, die von jedem der beiden Enden des Peptids her wirken kann.

[0176] In einer bevorzugten Ausführungsform ist das spezifisch wirkende proteolytische Enzym eine Amino-peptidase, wie eine Leucylaminopeptidase (EC 3.4.11.1); oder eine Tripeptidaminopeptidase (EC 3.4.11.4).

[0177] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist das spezifisch wirkende proteolytische Enzym eine Carboxypeptidase, wie eine Prolincarboxypeptidase (EC 3.4.16.2); eine Carboxypeptidase A (EC 3.4.17.1); eine Carboxypeptidase B (EC 3.4.17.2); eine Carboxypeptidase C (EC 3.4.16.5); eine Carboxypeptidase D (EC 3.4.16.6); eine Lysin-(Arginine)-Carboxypeptidase (EC 3.4.17.3); eine Glyncarboxypeptidase (EC 3.4.17.4); eine Alanincarboxypeptidase (EC 3.4.17.6); eine Glutamatcarboxypeptidase (EC 3.4.17.11); eine Peptidyldipeptidase A (EC 3.4.15.1) oder eine Peptidyldipeptidase (EC 3.4.15.5).

[0178] Die Polypeptidzusammensetzungen können gemäß auf dem Fachgebiet bekannten Verfahren hergestellt werden und in Form einer Flüssigkeit oder einer trockenen Zusammensetzung vorliegen. Das Polypeptid kann durch auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren stabilisiert werden.

[0179] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Nahrungsmittelprodukte, z.B. Backprodukte, die ein durch die Verfahren der vorliegenden Erfindung erhaltenes Proteinhydrolysat umfassen. Derartige Nahrungsmittelprodukte zeigen verbesserte organoleptische Qualitäten, wie Verbesserung im Hinblick auf Geschmack, Schmackhaftigkeit, Mundgefühl, Aroma und Krustenfarbe.

[0180] Im vorliegenden Zusammenhang schließt der Begriff „Backprodukte“ jedes beliebige aus Teig hergestellte Nahrungsmittel, entweder von weichem oder knusprigem Charakter, ein. Beispiele für Backprodukte, ob vom weißen, hellen oder dunklen Typ, die vorteilhafter Weise durch die vorliegende Erfindung hergestellt werden können, sind Brot, insbesondere Weiß-, Vollkorn- oder Roggenbrot, typischer Weise in Form von Laiben oder Brötchen; französische Baguettebrote; Pitabrote; Tacos; Kuchen; Pfannkuchen; Kekse; Knäckebröte; und dergleichen.

[0181] Derartige Backprodukte werden herkömmlich aus einem Teig hergestellt, der Mehl und Wasser umfasst und typischerweise angereicht ist. Der Teig kann auf verschiedene Weise, wie durch Zugabe von Natriumbicarbonat oder dergleichen oder durch Zugabe von Sauerteig angereicht werden, jedoch wird der Teig vorzugsweise durch Zugabe einer geeigneten Hefekultur, wie einer Kultur von Saccharomyces cerevisiae (Backhefe), angereicht. Jeder beliebige der im Handel erhältlichen Stämme von Saccharomyces cerevisiae kann

eingesetzt werden.

[0182] Ferner kann der bei der Herstellung der Backprodukte verwendete Teig frisch oder gefroren sein. Die Herstellung von Gefrierteig ist von K. Kulp und K. Lorenz in „Frozen and Refrigerated Doughs and Batters“ beschrieben. Eine geschmackverbessernde Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung ist typischerweise in einer Menge im Bereich von 0,01–5%, stärker bevorzugt 0,1–3% im Teig eingeschlossen.

[0183] In den Verfahren der vorliegenden Erfindung können ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung, eine Endopeptidase, eine Transglutaminase, eine Peptidoglutaminase, ein oder mehrere spezifisch und/oder unspezifisch wirkende Endo- und/oder Exopeptidaseenzyme, und/oder ein oder mehrere vorstehend spezifizierte Enzyme entweder getrennt oder gemeinsam dem Gemisch, aus welchem der Teig hergestellt wird, oder einem beliebigen Inhaltsstoff, z.B. Mehl, aus welchem der Teig herzustellen ist, zugesetzt werden.

[0184] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner eine Vormischung, z.B. in Form einer Mehlmischung, für Teig und/oder aus Teig hergestellte Backprodukte, wobei die Vormischung ein Polypeptid oder eine geschmackverbessernde Zusammensetzung der Erfindung und einen Träger oder einen Backinhaltsstoff und wahlweise ein oder mehrere vorstehend spezifizierte Enzyme umfasst.

[0185] In einer anderen Ausführungsform umfasst die Vormischung ein Hydrolysat, das durch die Verfahren der Erfindung erhalten wird.

[0186] Die Vormischung kann durch Mischen der jeweiligen Enzyme mit einem geeigneten Träger, wie Mehl, Stärke, einem Zucker oder einem Salz, hergestellt werden. Die Vormischung kann andere teigverbessernde und/oder brotverbessernde Zusätze umfassen.

[0187] Im vorliegenden Zusammenhang ist der Begriff „Vormischung“ ein Gemisch aus normalerweise Mehl einschließenden Backmitteln, die derart zubereitet wurde, dass deren Lagerung unter festgelegten Bedingungen ermöglicht wird und Bequemlichkeit bei der Handhabung während des der Teigzubereitungsverfahrens bereitgestellt wird. Eine derartige Vormischung kann in industriellen und kommerziellen Brotbackfabriken und -anlagen sowie in Kleinbäckereien von vorteilhafter Verwendung sein.

[0188] Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung eines durch die Verfahren der Erfindung hergestellten Hydrolysats als Zusatz zu Nahrungsmittelprodukten, wie Backnahrungsmitteln, zum Verbessern der organoleptischen Qualitäten, wie Geschmack, Schmeckhaftigkeit und Aroma.

[0189] Die Hydrolysate, die in Bezug auf freie Glutaminsäure und/oder peptidgebundenen Glutaminsäureresten angereichert sind, die durch die Verfahren der vorliegenden Erfindung erhalten werden, können in verschiedenen industriellen Anwendungen, insbesondere wo ein Bedarf zum Einbringen von funktionellen Proteinen vorliegt, verwendet werden.

[0190] Zum Beispiel betrifft die vorliegende Erfindung auch Nahrungsmittelprodukte, die ein Hydrolysat umfassen, das in Bezug auf freie Glutaminsäure und/oder peptidgebundenen Glutaminsäureresten angereichert ist, die durch das Verfahren der Erfindung erhalten werden, und Tierfutterzusätze, die ein Hydrolysat umfassen, das in Bezug auf freie Glutaminsäure und/oder peptidgebundenen Glutaminsäureresten angereichert ist, die durch das Verfahren der Erfindung erhalten werden.

[0191] Die vorliegende Erfindung wird weiter durch die folgenden Beispiele beschrieben, die nicht als Beschränkung des Umfangs der Erfindung gelten sollten.

BEISPIELE

Beispiel 1: Reinigung von FLAVOURZYME™-Aminopeptidase II

[0192] Aminopeptidase wurde aus einer FLAVOURZYME™-Brühe (Novo Nordisk A/S, Bagsværd, Dänemark) gereinigt. Die FLAVOURZYME™-Brühe wurde durch Züchten des Stamms 1568 von *Aspergillus oryzae* (ATCC 20386) in einem aus Kohlenstoff- und Stickstoffquellen und Spurenmetallen zusammengesetzten Medium hergestellt. Zunächst wurde die Brühe (20 ml, enthaltend 720 mg Protein) mit 180 ml 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, verdünnt und unter Verwendung von Nalgene-Filterware, ausgestattet mit einem 0,45 µm Filter (Nalgene, Rochester, NY), filtriert. Die filtrierte Lösung wurde auf eine Säule mit 24 × 130 mm, enthaltend 31 ml Q-Sepharose, Big Beads (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden), voräquilibriert mit 20

mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, geladen. Das Protein wurde unter Verwendung von pH-Gradienten von 7,0 (20 mM Natriumphosphatpuffer) bis 5,0 (20 mM Natriumacetatpuffer), von 5,0 bis 3,5 (20 mM Natriumacetatpuffer) und dann von 3,5 bis 3,0 (20 mM Natriumacetatpuffer) eluiert. Fraktionen, die zwischen pH 3,5 und 3,0 eluierten, wurden aufgefangen, gepoolt und durch Ultrafiltration mit einer PM10-Membran (Amicon, New Bedford, MA) auf 20 ml eingeeengt.

[0193] Die eingeeengte Lösung wurde mit 100 ml 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, verdünnt und dann auf eine Säule mit 20 × 100 mm, enthaltend Pharmacia MonoQ Beads (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden), voräquiliert mit 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, geladen. Das Protein wurde mit einem Gradienten aus 0 bis 0,4 M NaCl in 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, eluiert. Die Fraktionen zwischen 0,330 und 0,343 M NaCl wurden aufgefangen, gepoolt und unter Verwendung von Ultrafiltration gegen 20 mM Natriumacetatpuffer, pH 4,0, eingeeengt.

[0194] Es wurde durch Beurteilung durch SDS-PAGE-Analyse gefunden, dass das gereinigte Präparat drei Hauptbanden enthielt. Die Probe bestand aus Bestandteilen mit Molekulargewichten von etwa 65, 50 und 33 kDa.

Beispiel 2: Aminosäuresequenzieren von Aminopeptidase II

[0195] Ein Aliquot des in Beispiel 1 beschriebenen gereinigten Aminopeptidase-II-Präparats wurde elektro-phoresiert und anschließend auf eine PVDF-Membran (Novex, San Diego, CA) unter Verwendung von 10 mM CAPS (3-[Cyclohexylamino]-1-propansulfonsäure), pH 11, in 10%igem Methanol für eine Dauer von 2 Stunden blot-transferiert. Die PVDF-Membran wurde mit 0,1%igem Coomassie-Blue R-250 in 40% Methanol/1% Essigsäure für eine Dauer von 20 Sekunden gefärbt und in 50%igem Ethanol zum Beobachten der Proteinbanden entfärbt. Drei Bestandteile mit 65, 50 und 33 kDa wurden herausgeschnitten und einem aminoterminalen Sequenzieren auf einer Proteinsequenziervorrichtung des Typs Applied Biosystems Modell 476A (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) unter Verwendung einer Blot-Patrone und einer Flüssigphasen-TFA-Abgabe gemäß den Anweisungen des Herstellers unterzogen. Alle drei Bestandteile ergaben dieselbe aminoterminal Sequenz, RALVSPDEFDPEDIQLEDLLEGSQQLEDFAY (Aminosäuren 17–47 von SEQ ID NR:2).

[0196] Eine Probe mit 300 µl des Proteins wurde auf einem Savant Speed Vac AS160 (Savant Instruments, Farmingdale, NY) getrocknet und dann mit 300 µl 70%iger Ameisensäure (wässrig) rekonstituiert. Ein paar Kristalle von Cyanogenbromid wurden zugesetzt und bei Raumtemperatur im Dunkeln über Nacht inkubiert. Die Probe wurde erneut im Speed Vac getrocknet und in Tricin-Probenpuffer (Novex, San Diego, CA), rekonstituiert. Die Cyanogenbromid-Spaltfragmente wurden unter Verwendung eines 10–20%igen Tricin-SDS-Polyacrylamidgels in die Banden von 6, 10, 15, 22, 27, 40 und 50 kDa aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran blot-transferiert. Die Banden mit 6, 10, 15 und 22 kDa wurden herausgeschnitten und einem aminoterminalen Sequenzieren unterzogen.

[0197] Die aminoterminalen Sequenzen der Banden mit 15 und 22 kDa waren mit der vorstehenden aminoterminalen Sequenz identisch, während bestimmt wurde, dass die Sequenzen der beiden Banden mit 6 und 10 kDa die Sequenz TYSPSVEVTADVAVVKNLGTSEADYPDVEGKVAL (Aminosäuren 108–142 von SEQ ID NR:2) enthielten.

Beispiel 3: RNA-Isolation des Stamms 1568 von *Aspergillus oryzae*

[0198] Stamm 1568 von *Aspergillus oryzae* wurde in einem Fermentationstank in einem Medium, zusammengesetzt aus 7,5 g Kartoffelstärke, 10 g Sojabohnenmehl, 2 g KH_2PO_4 , 5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 0,1 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ pro Liter, gezüchtet. Eine Probe mit zwei Liter wurde nach fünftägigem Wachstum bei 30°C entnommen, und die Mycelien wurden aufgefangen, in flüssigem N_2 eingefroren und bei –80°C aufbewahrt. Die gesamte RNA wurde aus den gefrorenen, pulverisierten Mycelien von *Aspergillus oryzae* 1568 durch Extraktion mit Guanidiniumthiocyanat, gefolgt von Ultrazentrifugation durch ein 5,7 M Cäsiumchloridkissen (Chirgwin et al., 1979, *Biochemistry* 18: 5294–5299), hergestellt. Poly(A)+ RNA wurde durch Oligo(dT)-Cellulose-Affinitätschromatographie gemäß Aviv und Leder (1972, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 69: 1408–1412) isoliert.

Beispiel 4: Konstruktion einer cDNA-Bibliothek

[0199] Doppelsträngige cDNA wurde aus 5 µg Poly(A)+ RNA von *Aspergillus oryzae* 1568 von Beispiel 3 unter Verwendung der Prozedur, beschrieben von Gubler und Hoffman (1983, *Gene* 25: 263–269) und Sambrook

et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York), synthetisiert, außer dass ein Oligo(dT)-NotI-Ankerprimer anstelle eines Oligo(dT)12-18-Primers bei der Reaktion des ersten Strangs verwendet wurde. Nach der Synthese wurde die cDNA mit Mungobohnennuklease (Life Technologies, Gaithersburg, MD) behandelt, mit T4-DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) mit stumpfen Enden versehen, und unter Verwendung eines etwa 50fachen molaren Überschusses der Adapter an nicht-palindrome BstXI-Adapter (Invitrogen, San Diego, CA) ligiert. Die adaptierte cDNA wurde mit NotI verdaut, für 1,2–2,0 kb cDNAs durch Agarosegelelektrophorese größenfraktioniert und in pYES2.0 (Invitrogen, San Diego, CA), gespalten mit BstXI/NotI, ligiert. Das Ligationsgemisch wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers in elektrokompente DH10B-Zellen von E. coli (Life Technologies, Gaithersburg, MD) transformiert. Die aus 1×10^6 unabhängigen Klonen bestehende Bibliothek wurde als einzelne Pools (25.000–30.000 kolonienbildende Einheiten/Pool) in 20%igem Glycerin bei -80°C und als doppelsträngige cDNA und Ligationsgemisch bei -20°C aufbewahrt.

Beispiel 5: Extraktion von genomischer DNA

[0200] Man ließ *Aspergillus oryzae* 1568 in 25 ml eines Mediums aus 0,5% Hefeextrakt und 2% Glucose (YEG) für eine Dauer von 24 Stunden bei 37°C und 250 UpM wachsen. Die Mycelien wurden dann durch Filtration durch Miracloth (Calbiochem, La Jolla, CA) aufgefangen und ein Mal mit 25 ml 10 mM Tris-1 mM EDTA-(TE)-Puffer gewaschen. Überschüssiger Puffer wurde von dem Mycelienpräparat abgelassen, das anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren wurde. Das eingefrorene Mycelienpräparat wurde in einer elektrischen Kaffeemühle zu einem feinen Pulver gemahlen, und das Pulver einem Einweg-Kunststoffzentrifugenröhrchen, enthaltend 20 ml TE-Puffer und 5 ml 20%igem (G/V) Natriumdodecylsulfat (SDS), zugesetzt. Das Gemisch wurde mehrmals sanft gewendet, um das Mischen zu gewährleisten, und zwei Mal mit einem gleichen Volumen von Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1 V/V/V) extrahiert. Natriumacetat (3 M Lösung) wurde der extrahierten Probe auf eine Endkonzentration von 0,3 M zugesetzt, gefolgt von 2,5 Volumina eiskaltem Ethanol zum Ausfällen der DNA. Das Röhrchen wurde mit $15000 \times g$ für eine Dauer von 30 Minuten zentrifugiert, um die DNA zu pelletisieren. Man ließ das DNA-Pellet für eine Dauer von 30 Minuten vor der erneuten Suspension in 0,5 ml TE-Puffer lufttrocknen. DNase-freie Ribonuklease A wurde dem erneut suspendierten DNA-Pellet auf eine Konzentration von 100 µg pro ml zugesetzt und das Gemisch dann bei 37°C für eine Dauer von 30 Minuten inkubiert. Proteinase K (200 µg/ml) wurde zugesetzt, und das Röhrchen für eine Dauer von einer zusätzlichen Stunde bei 37°C inkubiert. Schließlich wurde die Probe zwei Mal mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol extrahiert und die DNA mit Ethanol ausgefällt. Die ausgefällte DNA wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, unter Vakuum getrocknet, in TE-Puffer erneut suspendiert und bei 4°C aufbewahrt.

Beispiel 6: PCR-Amplifikation der Aminopeptidase II von *Aspergillus oryzae* 1568

[0201] Auf der Basis der Aminosäuresequenzen der in Beispiel 2 beschriebenen Aminopeptidase-II-Teilpeptide von *Aspergillus oryzae* 1568 wurden die nachstehend dargestellten, degenerierten Oligonukleotidprimer mit einer DNA/RNA-Syntheseapparatur des Typs Applied Biosystems Modell 394 gemäß den Anweisungen des Herstellers synthetisiert, um Aminopeptidase-II-Genfragmente von genomischer DNA von *Aspergillus oryzae* 1568 durch PCR zu amplifizieren.

Vorwärtsprimer: 5'-CCIGAYGARTTYCCIGARGA-3' (SEQ ID NR:3)

Rückwärtsprimer: 5'-RTTYTTIACIACIGCIACRTICIGCIACIACIACIAC-3' (SEQ ID NR:4)

(R = A oder G, Y = C oder T, N = G oder A oder C oder T, H = A oder C oder T, I = Inosin)

[0202] Amplifikationsreaktionen (50 µl) wurden unter Verwendung von etwa 1 µg genomischer DNA von *Aspergillus oryzae* 1568, hergestellt wie beschrieben in Beispiel 5, als Templat hergestellt. Jede Reaktion enthielt die folgenden Bestandteile: 1 µg genomische DNA, 40 pmol Vorwärtsprimer, 40 pmol Rückwärtsprimer, je 200 µM von dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 1 × Taq-Polymerasepuffer (Perkin-Elmer Corp., Branchburg, NJ) und 2,5 Einheiten Taq-Polymerase (Perkin-Elmer Corp., Branchburg, NJ). Die Reaktionen wurden in einem Temperaturzyklengerät des Typs Perkin-Elmer Modell 480 inkubiert, das wie folgt programmiert war: Zyklus 1 bei 94°C für eine Dauer von 5 Minuten, 50°C für eine Dauer von 2 Minuten und 72°C für eine Dauer von 2 Minuten; und Zyklen 2–26 bei 94°C für eine Dauer von 2 Minuten, 50°C für eine Dauer von 1 Minute und 72°C für eine Dauer von 2 Minuten. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem 1,5%igen Agarosegel (Eastman Kodak, Rochester, NY) isoliert, wobei ein Produktband mit 309 bp vom Gel herausgeschnitten und unter Verwendung von Qiaex II (Qiagen, Chatsworth, CA) gemäß den Anweisungen des Herstellers gereinigt wurde. Das gereinigte PCR-Produkt wurde anschließend in einen pCRII-Vektor (Invitrogen, San Diego, CA) kloniert, und die DNA-Sequenz unter Verwendung von lac-Vorwärts- und Rückwärtsprimern (New England BioLabs, Beverly, MA) bestimmt.

[0203] Das aus 103 Kodonen bestehende Aminopeptidase-II-Gensegment (309 bp) wurde aus *Aspergillus oryzae* 1568 mit den vorstehend beschriebenen Aminopeptidase-II-spezifischen PCR-Primern amplifiziert. Eine DNA-Sequenzanalyse zeigte, dass das amplifizierte Gensegment einen Teil des entsprechenden Aminopeptidase-II-Gens von *Aspergillus oryzae* 1568 kodierte. Das Aminopeptidase-II-Gensegment wurde zum Sondieren der in Beispiel 5 beschriebenen cDNA-Bibliothek von *Aspergillus oryzae* 1568 verwendet.

Beispiel 7: Identifikation von Aminopeptidase-II-Klonen von *Aspergillus oryzae* 1568

[0204] Die cDNA-Bibliothek von *Aspergillus oryzae* 1568 wurde auf Agarplatten aus Luria plus 50 µg/ml Carbenicillin aufgestrichen. Kolonieranhebungen (Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York) wurden an etwa 10.000 Kolonien durchgeführt, und die DNA wurde auf Membranen (Hybond N+, Amersham, Arlington Heights, IL) unter Verwendung eines UV-Stratalinkers (Stratagene, La Jolla, CA) vernetzt. Die Membranen wurden für eine Dauer von drei Stunden bei 45°C in eine Hybridisierungslösung, enthaltend 5 × SSPE, 0,3% SDS, 50% Formamid und 10 µg/ml denaturierte und gescherte Heringssperma-DNA, getaucht. Das Aminopeptidase-II-Genfragment, isoliert von dem *Aspergillus oryzae* 1568, wie beschrieben in Beispiel 6, wurde unter Verwendung des Markierungskits von für statistisch primierte DNA (Random Primed DNA Labeling Kits; Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland), radiomarkiert, durch Zugabe von NaOH auf eine Endkonzentration von 0,1 M denaturiert und der Hybridisierungslösung mit einer Aktivität von etwa 1 × 10⁶ cpm pro ml Hybridisierungslösung zugesetzt. Das Gemisch wurde über Nacht bei 45°C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Membranen drei Mal in 2 × SSC mit 0,2% SDS bei 55°C gewaschen. Die Membranen wurden dann auf Löschpapier für eine Dauer von 15 Minuten getrocknet, in SaranWrapTM eingewickelt und einem Röntgenfilm für eine Dauer von 48 Stunden bei -70°C mit intensivierenden Filtern (Kodak, Rochester, NY) ausgesetzt.

[0205] Elf Kolonien stellten starke Hybridisierungssignale mit der Sonde her. Die elf Kolonien wurden in fünf ml Medium aus LB plus 50 µg/ml Carbenicillin geimpft und man ließ sie bei 37°C über Nacht wachsen. Miniprep-DNA wurde von jedem dieser Klone unter Verwendung des DNA-Reinigungskits des Typs Wizard 373 (Wizard 373 DNA Purification Kit; Promega, Madison, WI) hergestellt. Klon 9 und Klon 10 enthielten Aminopeptidase-II-kodierende Sequenz, wie durch DNA-Sequenzieren festgestellt. Klon 9 (pEJG18) wies die volle Länge auf. Das Plasmid pEJG18 wurde in DHSα-Zellen von *E. coli* subgeklont, um *E. coli* DHSα EJG18 herzustellen.

Beispiel 8: DNA-Sequenzanalyse des Aminopeptidase-II-Gens von *Aspergillus oryzae* 1568

[0206] DNA-Sequenzieren des in pEJG18 in *E. coli* DHSα EJG18, beschrieben in Beispiel 7, enthaltenen Aminopeptidase-II-Gens wurde mit einer automatischen DNA-Sequenzierapparatur des Typs Applied Biosystems Modell 373A (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) an beiden Strängen unter Verwendung der Primerwandertechnik mit Farbstoffterminatorchemie (Giesecke et al., 1992, Journal of Virology Methods 38: 47–60) durchgeführt. Oligonukleotidsequenzierende Primer wurden zu Komplementärsequenzen im Aminopeptidase-II-Gen konstruiert und auf einer DNA/RNA-Syntheseapparatur des Typs Applied Biosystems Modell 394 gemäß den Anweisungen des Herstellers synthetisiert.

[0207] Die Nukleotidsequenz des Gens, das die Aminopeptidase II von *Aspergillus oryzae* 1568 kodiert, und die gefolgerte Aminosäuresequenz davon sind in **Fig. 1** (SEQ ID NR:1 bzw. 2) dargestellt. Eine Sequenzanalyse der klonierten Einfügung zeigte ein großes offenes Leseraster von 1488 Nukleotiden (ausschließlich des Stoppkodons), die ein Protein mit einer Sequenz mit 496 Aminosäuren (SEQ ID NR:2) kodierten. Der G + C-Gehalt dieses offenen Leserasters beträgt 58%. Auf der Basis der Regeln von van Heijne (van Heijne, 1984, Journal of Molecular Biology 173: 243–251) umfassen die ersten 15 Aminosäuren wahrscheinlich ein sekretorisches Signalpeptid, welches das werdende Polypeptid in das endoplasmatische Reticulum lenkt (doppelt unterstrichen in **Fig. 1**).

[0208] Die Aminosäuresequenzen der Teilpeptide, die von der wie in Beispiel 2 beschriebenen, gereinigten Aminopeptidase II abgeleitet sind, sind in **Fig. 1** unterstrichen und stimmten mit denjenigen, die in der gefolgerten Aminosäuresequenz (SEQ ID NR:2) der Aminopeptidase-II-cDNA von *Aspergillus oryzae* 1568 gefunden wurden, überein.

[0209] Unter Verwendung des Clustal-Abgleichprogramms (Higgins, 1989, vorstehend) zum Vergleichen der gefolgerten Aminosäuresequenz der Aminopeptidase II von *Aspergillus oryzae* 1568 mit derjenigen der Aminopeptidase II Y von *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ ID NR:5) wurde eine 33,7%ige Identität beobachtet.

Beispiel 9: Konstruktion eines Aminopeptidase-II-Expressionsvektors von *Aspergillus oryzae* 1568 für einen *Aspergillus*-Wirt

[0210] Zwei synthetische Oligonukleotidprimer, nachstehend dargestellt, wurden zum PCR-Amplifizieren der Aminopeptidase-II-Genkodierungssequenz von *Aspergillus oryzae* A1568 von Plasmid pEJG18 (*E. coli* DH- α -EJG18) zum Subklonieren und Exprimieren in einem *Aspergillus*-Wirt konstruiert.

Vorwärtsprimer: 5'-ATGATGAGGTCGCTTTTGTGGGC-3' (SEQ ID NR:6)

Rückwärtsprimer: 5'-GGGATGCATCTATGCCTCGACTT-3' (SEQ ID NR:7) Fettbuchstaben stellen die Kodierungssequenz dar.

[0211] Zum Erleichtern des Subklonierens des Genfragments in einen Expressionsvektor, bezeichnet als pMWR3 (Fig. 2), wurde eine NsiI-Restriktionsenzymstelle am 3'-Ende des Aminopeptidase-II-Gens eingebracht. Das 5'-Ende wurde durch Zugabe eines ATG zum Einfügen in die Swal-Stelle abgestumpft gelassen. Der Vektor pMWR3 enthielt den TAKA-Promoter und Terminator als regulatorische Sequenzen. Da das Plasmid keine selektierbare Markierung für Pilztransformationen enthält, wurde es zusammen mit pToC90 (WO 91/17243), das amdS als selektierbare Markierung enthält, transformiert.

[0212] Fünfzig Picomol von jedem der vorstehenden Primer wurden in einer PCR-Reaktion (50 μ l), enthaltend 70 ng pEJG18 (ein cDNA-Klon von *Aspergillus oryzae* 1568 in pYES2), 1X Pwo-Puffer (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), 8 μ l einer 10 mM Mischung von dATP, dTTP, dGTP und dCTP, und 2,5 Einheiten PwoI (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), verwendet. Die Amplifikationsbedingungen waren ein Zyklus bei 94°C für eine Dauer von 2 Minuten, 55°C für eine Dauer von 30 Sekunden und 72°C für eine Dauer von 1 Minute; 9 Zyklen mit 94°C für eine Dauer von 15 Sekunden, 55°C für eine Dauer von 30 Sekunden und 72°C für eine Dauer von 1 Minute; 15 Zyklen bei 94°C für eine Dauer von 15 Sekunden, 55°C für eine Dauer von 30 Sekunden und 72°C für eine Dauer von 1 Minute, mit einer Verlängerung von 20 Sekunden pro Zyklus; und einem Endzyklus bei 94°C für eine Dauer von 15 Sekunden, 55°C für eine Dauer von 30 Sekunden und 72°C für eine Dauer von 7 Minuten. Der Heizblock lief dann zu einem Tauchzyklus bei 4°C. Das amplifizierte DNA-Fragment mit 1500 bp wurde durch Gelelektrophorese und Qiaex II gereinigt. Das Aminopeptidaseklon wurde mit NsiI (unter Verwendung von vom Hersteller spezifizierten Bedingungen) verdaut. Das Fragment wurde mit Phenol-Chloroform extrahiert und durch Ethanol ausgefällt. Das geschnittene Fragment wurde in pMWR3 kloniert, das vorher mit Swal und NsiI geschnitten wurde, was zum Expressionsplasmid pEJG19 (Fig. 3) führte, in welchem die Transkription des Aminopeptidase-II-Gens unter der Kontrolle des TAKA-Promoters stand. Das Plasmid pEJG19 wurde in DH α S-Zellen von *E. coli* (Life Technologies, Gaithersburg, MD) transformiert. Ein Transformant von *E. coli*, enthaltend das pEJG19-Plasmid, wurde isoliert und die Plasmid-DNA gemäß den Prozeduren, beschrieben von Sambrook et al., 1989, vorstehend, hergestellt.

Beispiel 10: Expression des Aminopeptidase-II-Gens von *Aspergillus oryzae* 168 in *Aspergillus oryzae*

[0213] Plasmid pEJG19 wurde in einen alkalischen proteasearmen Wirt JaL142-6 von *Aspergillus oryzae* unter Verwendung der folgenden Protoplasttransformationsverfahren eingebracht. Die Transformation wurde mit Protoplasten mit einer Konzentration von ca. 2×10^7 Protoplaste pro ml durchgeführt. Einhundert μ l Protoplaste wurden auf Eis gegeben, wobei etwa 5 μ g pEJG19 und 5 μ g pTOC90; 250 μ l 60%iger PEG 4000, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM CaCl₂ zugesetzt wurden, und die Protoplaste wurden bei 37°C für eine Dauer von 30 Minuten inkubiert. Drei ml STC (1,2 M Sorbit, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 und 10 mM CaCl₂) wurden zugesetzt. Die Lösung wurde sanft gemischt und auf COVE-Transformationsplatten (pro Liter: 0,52 g KCl, 0,52 g MgSO₄·7H₂O, 1,52 g KH₂PO₄, 1 ml nachstehend beschriebene Spurenmetalllösung, 342,3 g Saccharose, 25 g Noble-Agar, 10 ml 1 M Acetamid, 10 ml 3 M CsCl) gegossen. Die Spurenmetalllösung (1000X) war aus 22 g ZnSO₄·7H₂O, 11 g H₃BO₃, 5 g MnCl₂·4H₂O, 5 g FeSO₄·7H₂O, 1,6 g CoCl₂·5H₂O, 1,6 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄ und 50 g Na₄EDTA pro Liter zusammengesetzt. Die Platten wurden für eine Dauer von 7 Tagen bei 37°C inkubiert. Die Transformanten wurden auf Platten desselben Mediums überführt und für eine Dauer von 2 Tagen bei 37°C inkubiert. Insgesamt wurden 140 Transformanten durch deren Fähigkeit, auf COVE-Medium unter Verwendung von Acetamid als einzige Stickstoffquelle zu wachsen, gewonnen.

[0214] Man ließ die Transformanten für eine Dauer von 4 Tagen bei 34°C, 200 UpM in 24-Mulden-Platten, enthaltend 1 ml pro Mulde 25%iges MY50-Medium, verdünnt mit 75% MY50-Salzen, wachsen. MY50 war pro Liter aus 50 g Maltodextrin, 2,0 g MgSO₄·7H₂O, 10 g KH₂PO₄, 2 g Zitronensäure, 10 g Hefeextrakt, 2,0 g Harnstoff, 2 g K₂SO₄ und 0,5 ml Spurenelementlösung, eingestellt auf einen pH-Wert von 6,0, zusammengesetzt. Die Spurenmetalllösung war pro Liter aus 14,3 g ZnSO₄·7H₂O, 2,5 g CuSO₄·5H₂O, 0,5 g NiCl₂·6H₂O, 13,8 g FeSO₄·7H₂O, 8,5 g MnSO₄·H₂O, 3 g Zitronensäure zusammengesetzt. Die MY50-Salze waren pro Liter aus 2,0 g MgSO₄·7H₂O, 10 g KH₂PO₄, 2 g Zitronensäure und 2 g K₂SO₄, pH 6,0, zusammengesetzt.

[0215] Jede der 140 Mulden wurde auf Aminopeptidase-II-Aktivität unter Verwendung von Leu-pNA (Hydrochloridsalz) als Substrat getestet. In einer 96-Mulden-Mikrotiterplatte wurden 4 µl Überstand zu 100 µl 1 mg/ml Leu-pNA in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5, zugesetzt. Die Absorption wurde bei 405 nm überwacht.

[0216] Vier Transformanten, 20, 88, 90 und 137, mit dem höchsten Grad an Aminopeptidase-II-Aktivität ließ man dann in Schüttelkolben mit einem Volumen von 125 ml für eine Dauer von 4 Tagen bei 34°C, enthaltend 25 ml MY50-Medium, wachsen.

[0217] Proben wurden an den Tagen 2, 3 und 4 durch Mischen von 100 µl 10fach verdünntem Überstand mit 100 µl 2 mg/ml Leu-pNA in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5, auf Aminopeptidase-II-Aktivität getestet. Die Transformanten 20, 90 und 137 waren die besten Hersteller. Für eine Reinigung der Aminopeptidase II ließ man die Transformanten 20 und/oder 90 in Schüttelkolben wie vorstehend oder in aus geeigneten Kohlenstoff- und Stickstoffquellen zusammengesetztem Fermentationsmedium wachsen.

Beispiel 11: Reinigung von in *Aspergillus* hergestellter rekombinanter Aminopeptidase II von *Aspergillus oryzae* 168

[0218] Die vereinigten Überstände aus den in Beispiel 10 beschriebenen Schüttelkolbenbrühen wurden vereinigt (etwa 100 mg Protein in etwa 100 ml) und auf 3,7 mS verdünnt und auf pH 7,0 eingestellt. Die verdünnte Probe wurde dann auf eine Q-Sepharose, Big Beads, voräquiliert mit 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, geladen. Die Aminopeptidase II wurde mit einem Gradienten aus 0–0,4 M NaCl in 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, eluiert, gefolgt von einer Waschung mit 0,4 M NaCl. Fraktionen wurden durch Mischen von 100 µl von jeder Fraktion mit 100 µl 2 mg Leu-pNA pro ml 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5, auf Aminopeptidase-II-Aktivität getestet. Die Testergebnisse wiesen darauf hin, dass die Aminopeptidase II am Ende des Gradienten und während der Waschung in 0,4 M NaCl eluierte. Eine Analyse durch SDS-PAGE zeigte, dass das Enzym homogen war.

Beispiel 12: Konstruktion eines Aminopeptidase-II-Expressionsvektors von *Aspergillus oryzae* 1568 für einen *Fusarium*-Wirt

[0219] Zwei synthetische Oligonukleotidprimer, nachstehend dargestellt, wurden zum PCR-Amplifizieren der Aminopeptidase-II-Genkodierungssequenz von *Aspergillus oryzae* A1568 von Plasmid pEJG18 (*E. coli* DH-Sα-EJG18) zum Subklonieren und Exprimieren in einem *Fusarium*-Wirt konstruiert.

Vorwärtsprimer: 5'-ATTTAAATcaccATGAGGTGCTTTTGTGGGC-3' (SEQ ID NR:8)

Rückwärtsprimer: 5'-GGGTAACTAATACTATGCCTCGACTTGAGAATG-3' (SEQ ID NR:9)

Fettbuchstaben stellen die Kodierungssequenz dar. Kleinbuchstaben stellen eine Kozak-Konsensussequenz zum Erhöhen der Expression dar. (Kozak, 1981, *Nucleic Acids Research* 12: 857–872)

[0220] Zum Erleichtern des Subklonierens des Genfragments in einen als pDM181 ([Fig. 4](#)) bezeichneten Expressionsvektor wurden Swal- und PaeI-Restriktionsenzymstellen am 5'- bzw. 3'-Ende des Aminopeptidase-II-Gens eingebracht. Der Vektor pDM181 enthielt den Promoter und Terminator der trypsinartigen Protease (SP387) (WO 96/00787) von *Fusarium oxysporum* als regulatorische Sequenzen. Das Plasmid enthielt auch das bar-Gen als selektierbare Markierung für Pilztransformationen (de Block et al., 1987, *EMBO Journal* 6:2513–2518).

[0221] Fünzig Picomol von jedem der vorstehenden Primer wurden in einer PCR-Reaktion, enthaltend 70 ng pEJG18, 1X Pwo-Puffer, 5 µl 10 mM Mischung von dATP, dTTP, dGTP und dCTP und 2,5 Einheiten PwoI, verwendet. Die Amplifikationsbedingungen lauteten ein Zyklus bei 94°C für eine Dauer von 2 Minuten, 55°C für eine Dauer von 30 Sekunden und 72°C für eine Dauer von 1 Minute; 9 Zyklen jeweils bei 94°C für eine Dauer von 15 Sekunden, 55°C für eine Dauer von 30 Sekunden und 72°C für eine Dauer von 1 Minute; 15 Zyklen jeweils bei 94°C für eine Dauer von 15 Sekunden, 55°C für eine Dauer von 30 Sekunden und 72°C für eine Dauer von 1 Minute, mit einer Verlängerung von 20 Sekunden pro Zyklus; und ein letzter Zyklus bei 94°C für eine Dauer von 15 Sekunden, 55°C für eine Dauer von 30 Sekunden und 72°C für eine Dauer von 7 Minuten. Der Heizblock wurde dann bei einem Tauchzyklus von 4°C gehalten. Das amplifizierte DNA-Fragment mit 1500 bp wurde durch Gelelektrophorese und Qiaex II gereinigt und dann in pCRII TOPO TA Klonierungsvektor (Stratagene, San Diego, CA) subkloniert. Das pCRII-Aminopeptidaseklon wurde mit den Restriktionsendonukleasen Swal und PaeI (unter durch den Hersteller spezifizierten Bedingungen) geschnitten. Das Fragment wurde durch Gelelektrophorese und Qiaex II gereinigt. Das geschnittene Fragment wurde in pDM181 kloniert, das vorher mit Swal und PaeI geschnitten wurde, was zum Expressionsplasmid pEJG28 ([Fig. 5](#)) führte, in welchem die Transkription des Aminopeptidase-II-Gens unter der Kontrolle des trypsinartigen Proteasepromoters von

Fusarium oxysporum stand. Das Plasmid pEJG28 wurde in ABLE-K-Zellen von *E. coli* (Stratagene, San Diego, CA) transformiert. Der Transformant von *E. coli*, der das pEJG28-Plasmid enthielt, wurde isoliert und Plasmid-DNA wurde gemäß den von Sambrook et al., 1989, vorstehend, beschriebenen Prozeduren hergestellt.

Beispiel 13: Transformation von *Fusarium* CC1-3 und Analyse der Transformanten

[0222] *Fusarium*-Stamm CC1-3, eine stark verzweigte morphologische Mutante des *Fusarium*-Stamms A3/5 (ATCC 20334) (Wiebe et al., 1992, *Mycological Research* 96: 555–562; Wiebe et al., 1991, *Mycological Research* 95: 1284–1288; Wiebe et al., 1991, *Mycological Research* 96: 555–562), ließ man in einem flüssigem Medium, enthaltend Vogel-Salze (Vogel, 1964, *Am. Nature* 98: 435–446), 25 mM NaNO₃ und 1,5% Glucose, für eine Dauer von 4 Tagen bei 28°C und 150 UpM wachsen. Die Conidien wurden durch Filtration durch 4 Schichten Sehtuch und schließlich durch eine Schicht Miracloth gereinigt. Die Conidiensuspensionen wurden durch Zentrifugation eingengt. Fünfzig ml YPG-Medium, zusammengesetzt aus 1% Hefeextrakt, 2% Bactopepton und 2% Glucose, wurden mit etwa 10⁸ Conidien geimpft und für eine Dauer von 14 Stunden bei 24°C und 150 UpM inkubiert. Die erhaltenen Hyphen wurden auf einem sterilen Filter mit 0,4 mm aufgefangen und aufeinander folgend mit sterilem destilliertem Wasser und 1,0 M MgSO₄ gewaschen. Die Hyphen wurden erneut in 10 ml einer Lösung von NOVOZYM 234™ (2–10 mg/ml in 1,0 M MgSO₄) suspendiert und für eine Dauer von 15–30 Minuten bei 34°C unter Rühren bei 80 UpM verdaut. NOVOZYM 234™ wurde von Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Dänemark, erhalten. Unverdautes hyphales Material wurde aus der erhaltenen Protoplastsuspension durch aufeinander folgende Filtration durch 4 Schichten Sehtuch und durch Miracloth entfernt. Zwanzig ml 1 M Sorbit wurden mit der Protoplastlösung vereinigt. Nach dem Mischen wurden die Protoplasten durch Zentrifugation pelletiert und aufeinander folgend durch erneute Suspension und Zentrifugation in 20 ml 1 M Sorbit und 20 ml STC (0,8 M Sorbit, 0,05 M Tris, pH 8,0, 0,05 M CaCl₂) gewaschen. Die gewaschenen Protoplasten wurden in 4 Teilen STC und 1 Teil SPTC (0,8 M Sorbit, 40% PEG 4000, 0,05 M Tris, pH 8,0, 0,05 M CaCl₂) mit einer Konzentration von 5 × 10⁷/ml erneut suspendiert.

[0223] Einhundert ml Protoplastsuspension wurden zu 10 µg pEJG28 in Polypropylenröhrchen (17 × 100 mm) zugesetzt, gemischt und auf Eis für eine Dauer von 30 Minuten inkubiert. Ein ml SPTC wurde sanft in die Protoplastsuspension gemischt und die Inkubation bei Raumtemperatur für eine Dauer von 20 Minuten fortgesetzt. 12,5 ml geschmolzene Lösung (abgekühlt auf 40°C), bestehend aus 1 × Vogel-Salzen, 25 mM NaNO₃, 0,8 M Saccharose und 1% niederschmelzender Agarose (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO), wurden mit den Protoplasten gemischt und dann auf eine leere Petrischale mit 100 mm aufgestrichen. Die Inkubation wurde bei Raumtemperatur für eine Dauer von 10 bis 14 Tagen fortgesetzt. Nach der Inkubation bei Raumtemperatur für eine Dauer von 24 Stunden wurden 12,5 ml des identischen Mediums plus 10 mg BASTA™ (Hoechst Schering, Rodovre, Dänemark) pro ml auf die Petrischale aufgestrichen. BASTA™ wurde zwei Mal mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) und ein Mal mit Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) vor der Verwendung extrahiert.

[0224] Nach zwei Wochen erschienen 2 Transformanten, bezeichnet als #1 und #2. Ein Mycelienfragment vom Rand von jedem Transformanten wurde in einzelne Mulden einer 24-Mulden-Platte, enthaltend Vogel/BASTA™-Medium, überführt. Das Medium enthielt 25 g Saccharose, 25 g Noble-Agar, 20 ml 50X Vogel-Salze (Vogel, 1964, vorstehend), 25 mM NaNO₃ und 10 g BASTA™ pro Liter. Die Platte wurde in einer Plastiktüte versiegelt, um die Feuchtigkeit beizubehalten, und für eine Dauer von etwa einer Woche bei Raumtemperatur inkubiert.

Beispiel 14: Expression des Aminopeptidase-II-Gens von *Aspergillus oryzae* 1568 in *Fusarium*

[0225] Ein Mycelienfragment von jedem der in Beispiel 13 beschriebenen 2 CCI-3-Transformanten von *Fusarium* wurde in 20 ml M400Da-Medium, zusammengesetzt aus 50 g Maltodextrin, 2,0 g MgSO₄·7H₂O, 2,0 g KH₂PO₄, 4,0 g Zitronensäure, 8,0 g Hefeextrakt, 2,0 g Harnstoff und 0,5 ml Spurenmetalllösung pro Liter geimpft und für eine Dauer von 7 Tagen bei 30°C und 150 UpM inkubiert. Das Medium wurde mit 5 N NaOH auf pH 6,0 eingestellt. Die Spurenmetalllösung enthielt 14,3 g ZnSO₄·7H₂O, 2,5 g CuSO₄·5H₂O, 0,5 g NiCl₂·6H₂O, 13,8 g FeSO₄·7H₂O, 8,5 g MnSO₄·H₂O und 3,0 g Zitronensäure pro Liter. Der untransformierte Wirt wurde ebenfalls als Kontrolle verwendet. Ein ml Kulturüberstand wurde an 7 Tagen geerntet und aufbewahrt und getestet. Die Aminopeptidase-II-Aktivität wurde durch Mischen von 10 µl Überstand mit 200 µl einer Substratstammlösung, enthaltend 2 mg Leu-para-Nitroanilid pro ml 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5, und Überwachen der Änderung der Absorption bei 405 nm über eine Dauer von 4 Minuten bestimmt. Beide Transformanten zeigten Aktivität gegenüber Leu-pNA, die größer war als diejenige der untransformierten Kontrolle.

[0226] Der in Beispiel 13 beschriebene Haupt-*Fusarium*-Transformant #2 wurde in Schüttelkolben mit einem

Volumen von 125 ml für eine Dauer von 5 Tagen bei 30°C in 25 ml M400Da-Medium gezüchtet. Die gesamte Kulturbrohe wurde unter Verwendung einer Doppelschicht von Miracloth filtriert. Das Filtrat wurde gewonnen und dann bei -20°C eingefroren.

Beispiel 15: Reinigung von durch *Fusarium* hergestellter rekombinanter Aminopeptidase II von *Aspergillus oryzae* 1568

[0227] Ein Volumen mit 20 ml einer 5-tägigen *Fusarium*-Brühe, beschrieben in Beispiel 14, wurde durch einen Spritzenfilter mit 0,45 Mikron filtriert. Die Probe wurde dann in 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, auf das 8fache verdünnt. Die Leitfähigkeit und der pH-Wert der Probe betrugen 3,1 mS bzw. 7,10. Die Probe wurde auf eine Säule des Typs XK-26 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden), enthaltend 60 ml Q-Sepharose, Big Beads, die mit 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, voräquilibriert wurde, geladen. Die Säule wurde gewaschen, bis eine Basislinie erreicht wurde, und dann wurde die Probe mit einem linearen Gradienten aus 0–0,5 M NaCl in 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, über 8,3 Säulenvolumina und mit einer Fließgeschwindigkeit von 5 ml/min eluiert. Die Fraktionen wurden unter Verwendung von Leu-pNA als Substrat durch Mischen von 10 µl von jeder Fraktion mit 90 µl 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5, und 100 µl einer Substratstammlösung, enthaltend 2 mg Leu-pNA pro ml 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5, und Überwachen der Veränderung der Absorption bei 405 nm über eine Dauer von 4 Minuten getestet. Alle Fraktionen, die auf Leu-pNA aktiv waren, wurden dann gepoolt, verdünnt und unter Verwendung einer Amicon-Ultrafiltrationseinheit unter Verwendung einer PM-10-Membran eingengt.

[0228] Die eingengte Probe wurde dann auf eine Säule des Typs Mono Q 16/10 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) geladen, die mit 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, voräquilibriert war. Die Säule wurde dann mit 0,15 M NaCl gewaschen. Ein Gradient wurde von 0,15–0,5 M NaCl über 10 Säulenvolumina mit einer Fließgeschwindigkeit von 2 ml/min durchgeführt. Aktive Fraktionen wurden dann in 1,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, äquilibriert.

[0229] Die Probe wurde dann auf eine Säule des Typs Phenyl Superose 5/5 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden), die mit 1,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, voräquilibriert war, geladen. Die Säule wurde mit 1,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, gewaschen, bis eine Basislinie erzielt wurde. Das Enzym wurde mit einem Gradienten von 1,7 M bis 0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ über 30 Säulenvolumina mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min eluiert. Der Durchfluss wies eine Aktivität auf Leu-pNA wie die Fraktionen, die eluiert wurden, auf. Das Enzym erschien als eine Reihe von unterschiedlich glycosylierten Formen auf der Basis einer SDS-PAGE-Analyse. Als die verschiedenen Formen des Enzyms mit Endoglycosidase F/N Glycosidase F (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) gemäß dem durch den Hersteller vorgeschlagenen Protokoll behandelt wurden, erschien eine einzelne Bande mit einem Molekulargewicht von ~58 kDa in sämtlichen analysierten Proben. Die unterschiedlich glycosylierten Formen wurden dann gepoolt, unter Verwendung von 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5, entsalzt und einer biochemischen Charakterisierung unterzogen.

Beispiel 16: Charakterisierung von rekombinanter Aminopeptidase II von *Aspergillus oryzae* 1568

[0230] Die in Beispiel 11 beschriebene gereinigte Aminopeptidase II wurde bei der folgenden Charakterisierung verwendet.

[0231] Die kinetischen Parameter der Aminopeptidase II wurden für mehrere p-Nitroanilide (pNA), einschließlich Leu-pNA, Gly-pNA, Ala-pNA und Pro-pNA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, oder Bachem, Torrance, CA), bestimmt. Stammlösungen von 100 mg von jedem p-Nitroanilid pro ml Dimethylsulfoxid wurden mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, auf Konzentrationen im Bereich von 0,0064 bis 9,56 mM verdünnt. Es sollte angemerkt werden, dass die Löslichkeit der Substrate nicht immer ausreichend war, um Konzentrationen aufzuweisen, die mit K_m vergleichbar waren, was zu Fehlern führen könnte, die höher wären, als normalerweise erwartet. Die Reaktion der Aminopeptidase II mit dem p-Nitroanilid wurde initiiert, als ein Aliquot von 100 µl der Enzymlösung in 50 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, zu 100 µl einer Substratlösung in eine Mikrotiterplattenmulde zugesetzt und bei 405 nm und 25°C unter Verwendung eines Mikroplatten-Lesegeräts des Typs THERMOMax (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA) überwacht wurde. Eine Analyse der anfänglichen Hydrolysegeschwindigkeiten der p-Nitroanilide stellte die in Tabelle 1 dargestellten Ergebnisse her:

Tabelle 1. Kinetische Parameter von Aminopeptidase II bei pH 7,0 und 25°C

Substrat	K_m (mM)	V_{max} (relative Einheiten)
Leu-pNA	7	6400
Gly-pNA	0,3	1670
Ala-pNA	11	1200
Pro-pNA	2	120

[0232] Die Ergebnisse zeigten, dass die Aminopeptidase II Substratspezifität besitzt, wobei die Spezifität gegen Ala viel schlechter als gegen Gly ist.

[0233] Die Hemmung der Aminopeptidase II mit 1,10-Phenanthrolin wurde unter Verwendung von Leu-pNA als Substrat bei pH 7,5 in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,5, bewertet, wobei die Hydrolyse bei 405 nm überwacht wurde. Eine Lösung von 200 mM von 1,10-Phenanthrolin in Methanol wurde hergestellt. Die Hemmungsreaktion wurde durch Mischen von 100 μ l von 2 mg Leu-pNA pro ml 50 mM Natriumphosphatlösung, pH 7,5, und 10 μ l der 1,10-Phenanthrolinlösung mit 100 μ l Aminopeptidase II, verdünnt auf das 5fache in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5, durchgeführt. Eine Kontrolle wurde durchgeführt, wobei 10 μ l 20 mM Tris-Puffer, pH 7,6, anstelle der 1,10-Phenanthrolinlösung verwendet wurde.

[0234] Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass 1,10-Phenanthrolin die Aminopeptidase II hemmte, was nahe legt, dass die Aminopeptidase II eine Metalloprotease ist. Die Hydrolysegeschwindigkeit von Leu-pNA nahm von 285 mOD/Minute auf 21 mOD/Minute in Gegenwart von 1,10-Phenanthrolin ab.

[0235] Die in Beispiel 15 beschriebene gereinigte Aminopeptidase II wurde bei den folgenden Charakterisierungen verwendet.

[0236] Das pH-Optimum wurde unter Verwendung von Ala-pNA als Substrat in dem Universalpuffer, zusammengesetzt aus 0,125 M Zitronensäure, 0,125 M einbasigem Natriumphosphat und 0,125 M Borsäure, bestimmt, der pH-Wert wurde auf 4,5–11 mit 10 N NaOH in 0,5 pH-Schrittgrößen eingestellt. Das Ala-pNA-Substrat wurde durch Lösen von 100 mg Ala-pNA in 1 ml DMSO und Zugabe von 20 μ l der Ala-pNA/DMSO-Lösung zu 980 μ l des Universalpuffers bei den verschiedenen pH-Werten hergestellt. Der Test wurde durch Zugabe eines Aliquots mit 15 μ l der Aminopeptidase II in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5, zu 200 μ l 2 mg/ml Ala-pNA bei den verschiedenen pH-Werten bei Umgebungstemperatur initiiert. Die Änderung der Absorption bei 405 nm wurde für eine Dauer von 5 Minuten überwacht. Eine Autohydrolyse des Substrats als Kontrolle wurde durch Zugabe von 15 μ l 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5, zu 200 μ l 2 mg/ml Ala-pNA bei den verschiedenen pH-Werten bestimmt.

[0237] Die in nachstehender Tabelle 2 dargestellten Ergebnisse zeigten, dass die Aminopeptidase II eine Aktivität mit Ala-pNA als Substrat über den gemessenen pH-Bereich von 4,91 bis 10,91 mit der optimalen Aktivität bei pH ~9,5–10 besaß. Keine Autohydrolyse des Substrats wurde bei den pH-Werten von 11 oder weniger beobachtet.

Tabelle 2

pH-Wert	Mittlere Aktivität	Relative Aktivität
4,42	0 mOD/min	0
4,91	2	0,006
5,41	7,8	0,024
5,89	13,9	0,043
6,40	16,37	0,051
6,90	23,48	0,0727
7,27	41,24	0,128
7,59	69,15	0,214
8,03	145,6	0,45
8,62	245,99	0,761
9,25	306,97	0,95
9,68	323,15	1,0
10,51	270,8	0,838
10,95	197,86	0,612

[0238] Die Temperaturstabilität der Aminopeptidase II wurde unter Verwendung des folgenden Protokolls bestimmt: 480 µl 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5, wurde bei 37°, 45°, 55°, 60°, 65°, 70° und 75°C für eine Dauer von 30 Minuten in einem Eppendorf-Röhrchen mit einem Volumen von 1,7 ml vorinkubiert. Dann wurden 20 µl der gereinigten Aminopeptidase II zugesetzt, und die Probe wurde dann für eine Dauer von zusätzlichen 20 Minuten inkubiert. Die Proben wurden dann auf Eis gegeben. Nach Beendigung der Inkubationen für sämtliche Temperaturen wurden die Proben dann auf Aktivität unter Verwendung von Leu-pNA als Substrat getestet.

[0239] Der Test wurde durch Mischen von 100 µl der Inkubationsgemische für die verschiedenen Temperaturen mit 100 µl 2 mg/ml Leu-pNA in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5, bei Umgebungstemperatur durchgeführt. Die Absorption bei 405 nm wurde für eine Dauer von 5 Minuten überwacht.

[0240] Die in Tabelle 3 dargestellten Ergebnisse zeigten, dass die Aminopeptidase II 90% ihrer Aktivität nach 20-minütiger Inkubation bei 60°C, pH 7,5, beibehielt.

Tabelle 3

Temperatur (°C)	Prozentuale Aktivität in Bezug auf 37°C
37	100
45	101
55	99
60	90
65	73,7
70	64,6
75	46

[0241] Die kinetischen Parameter für verschiedene Aminopeptidase-II-Substrate wurden unter Verwendung des folgenden Protokolls bestimmt. Gereinigte Aminopeptidase II mit einem A_{280} von 0,581 wurde verwendet. Jedes Substrat wurde in DMSO auf eine Konzentration von 100 mg/ml gelöst und dann auf das 50fache in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5, auf 2 mg/ml verdünnt. Die Substrate schlossen Leu-pNA, Glu-pNA (Bachem, Torrance, CA) und Ala-pNA ein. In einer 96-Mulden-Mikrotiterplatte wurden 10 µl gereinigte Aminopeptidase II mit jedem Substrat wie folgt inkubiert, außer dass 50 µl gereinigte Aminopeptidase II mit Glu-pNA in-

kubiert wurde, und die Absorption bei 405 nm wurde für eine Dauer von 4 Minuten gemessen:

1. 200 µl 2 mg/ml Substrat + 0 µl 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5
2. 100 µl 2 mg/ml Substrat + 100 µl 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5
3. 50 µl 2 mg/ml Substrat + 150 µl 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5
4. 25 µl 2 mg/ml Substrat + 175 µl 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5

[0242] Ein Lineweaver-Burke-Plot wurde konstruiert, um den K_m und den k_{cat} für jedes Substrat unter Verwendung eines mittleren Molekulargewichts von 97 kDa für die unterschiedlich glycosylierten Formen zu bestimmen.

[0243] Für Leu-pNA wurden K_m und k_{cat} als 5,78 mM bzw. 230,9 min⁻¹ bestimmt.

[0244] Für Glu-pNA wurden K_m und k_{cat} als 1,17 mM bzw. 8,217 min⁻¹ bestimmt.

[0245] Für Ala-pNA wurden K_m und k_{cat} als 1,49 mM bzw. 34,638 min⁻¹ bestimmt.

Beispiel 17: Herstellung von Proteinhydrolysaten mit Aminopeptidase II von *Aspergillus oryzae* 1568

[0246] Die in Beispiel 11 beschriebene gereinigte Aminopeptidase II wurde in Hydrolysegrad-Assays unter Verwendung von Soja, Weizengluten und Casein als Substrate gemäß der folgenden Prozedur getestet.

[0247] Die Hydrolysegrad-(DH)-Assays wurden bei 50°C für eine Dauer von 18 Stunden als Minihydrolyse auf einem Maßstab von 10 ml unter Verwendung von Sojabohnenmehltablets, Weizenglutenmehltablets und Natriumkasein mit einer 2%igen Konzentration, eingestellt auf pH 7, gegebenenfalls ohne pH-Einstellung während der Hydrolyse, durchgeführt. Die Hydrolysate wurden bei 85°C für eine Dauer von 3 Minuten in einem Wasserbad inaktiviert. Die verwendeten Enzyme waren FLAVOURZYME™ und Aminopeptidase II. Die Enzyme wurden wie folgt dosiert. Für Soja wurden 2 LAPU und 5 LAPU Aminopeptidase II (rekombinant), verglichen mit 3 LAPU für FLAVOURZYME™, zugesetzt. Für Gluten wurden 2 LAPU und 5 LAPU Aminopeptidase II (rekombinant), verglichen mit 3 LAPU für FLAVOURZYME™, zugesetzt. Für Casein wurden 1 und 2 LAPU Aminopeptidase II (rekombinant), verglichen mit 3 LAPUs für FLAVOURZYME™, zugesetzt. Ein LAPU (Leucin-Amino-Peptidase-Einheit) ist die Enzymmenge, die 1 Mikromol L-Leucin-p-nitroanilid pro Minute unter den folgenden Bedingungen zersetzt: 26 mM L-Leucin-p-nitroanilid in 0,1 M Tris-Puffer, pH 8,0, bei 40°C für eine Dauer von 10 Minuten. Durch Hydrolyse wird p-Nitroanilid freigesetzt, wodurch die Lösung gelb wird, was bei 405 nm überwacht wird.

[0248] Der Hydrolysegrad (DH), definiert wie durch Adler-Nissen (1986, *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*, Elsevier Applied Science Publishers) beschrieben, wurde durch Reaktion des Überstands mit OPA (ortho-Phthaldialdehyd, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) gemäß der folgenden Prozedur bestimmt: Das Hydrolysat wurde auf das 100fache in destilliertem Wasser verdünnt. Dann wurden 120 µl in 900 µl OPA-Reagens überführt. Für das OPA-Reagens wurden 160 mg OPA in 4 ml Ethanol gelöst und in einen Messkolben mit einem Volumen von 200 ml, enthaltend eine Lösung von 7,62 g Dinatriumtetraboratdecahydrat, 200 mg Natriumdodecylsulfat und 176 mg Dithiothreitol, überführt und der Kolben auf 200 ml mit Wasser aufgefüllt. Die Lösung wurde dann gut geschüttelt und nach genau 2 Minuten die Absorption bei 340 nm gemessen und mit der Absorption einer 0,95 mM L-Serin-Lösung (destilliertes Wasser) nach Subtraktion des Blindwerts (Wasser, umgesetzt mit OPA-Reagens) verglichen. Zum Bestimmen des tatsächlichen DH wurden die Serinäquivalente, gemessen in den Hydrolysaten, mit den von Adler-Nissen vorgeschlagenen Faktoren für das Trinitrobenzolsulfonsäure-Verfahren (Adler-Nissen, 1979, *Agricultural and Food Chemistry* 17: 1256) korrigiert, wodurch dieselbe Antwort wie für das OPA-Verfahren beschrieben erhalten wurde. Der DH wurde auf der Basis der Gesamtproteinmenge im Hydrolysegemisch (nicht auf der Basis des löslichen Proteins) berechnet.

[0249] Ein Volumen von 25 µl von geeignet verdünntem Überstand wurde mit 200 µl OPA-Reagens in einer Mikrotiterplattenmulde gemischt, und man ließ dies für eine Dauer von genau 2 Minuten bei 25°C reagieren. Die Absorption bei 340 nm wurde in einem Mikrotiterplattenlesegerät gemessen und mit der Absorption einer 95 mM L-Serin-Standardlösung nach Subtraktion des Blindwerts (Wasser, umgesetzt mit OPA-Reagens) verglichen. Zum Bestimmen des tatsächlichen DH wurden die in den Überständen gemessenen Serinäquivalente mit den von Adler-Nissen vorgeschlagenen Faktoren für das Trinitrobenzolsulfonsäure-Verfahren (Adler-Nissen, 1979, *Agricultural and Food Chemistry* 17: 1256) korrigiert, wodurch dieselbe Antwort wie für das beschriebene OPA-Verfahren erhalten wurde. Der Hydrolysegrad wurde auf der Basis der Gesamtproteinmenge im Hydrolysegemisch (nicht auf der Basis des löslichen Proteins) berechnet.

[0250] Für Soja erhöhte die Zugabe von 2 LAPU und 5 LAPU Aminopeptidase II zu 3 LAPU FLAVOURZYME™ den absoluten DH um mindestens 8% bzw. 10% gegenüber den Proben mit 3 LAPU FLAVOURZYXME™ allein.

[0251] Für Gluten erhöhte die Zugabe von 2 LAPU und 5 LAPU Aminopeptidase II zu 3 LAPU FLAVOURZYME™ den absoluten DH um 6% bzw. 9%.

[0252] Für Gelatine erhöhte die Zugabe von 2 LAPU und 5 LAPU Dipeptidaminopeptidase II zu 3 LAPU FLAVOURZYME™ den absoluten DH um 4,9% bzw. 5,3%.

[0253] Für Casein erhöhte die Zugabe von 1 und 2 LAPU Aminopeptidase II zu 3 LAPU FLAVOURZYME™ den absoluten DH um 7% bzw. 9% gegenüber der Zugabe von 3 LAPU FLAVOURZYME™ allein.

Beispiel 18: Hydrolyse von Sojaprotein mit Aminopeptidase II von *Aspergillus oryzae*

[0254] Sojaprotein wurde in einem Maßstab von 10 ml (Minihydrolyse) mit einem Anfangs-pH von 7,0 und einer Proteinkonzentration von 2% hydrolysiert. Die Hydrolysezeit und -temperatur betrugen 18 Stunden bzw. 50°C. Die Enzyme wurden bei 85°C für eine Dauer von 5 Minuten inaktiviert und die Hydrolysate zentrifugiert. Die Überstände wurden unter Verwendung des OPA-Verfahrens auf DH analysiert. Der DH, definiert wie von Adler-Nissen (1986, *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*, Elsevier Applied Science Publishers) beschrieben, wurde durch Umsetzung des Überstands mit OPA (ortho-Phtaldialdehyd, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) bestimmt. Für das OPA-Reagens wurden 160 mg OPA in 4 ml Ethanol gelöst und in einen Messkolben mit einem Volumen von 200 ml, enthaltend eine Lösung von 7,62 g Dinatriumtetraboratdecahydrat, 200 mg Natriumdodecylsulfat und 176 mg Dithiothreitol, überführt, und der Kolben wurde auf 200 ml mit Wasser aufgefüllt. Ausgewählte Proben wurden auf den Gehalt an freien Aminosäuren unter Verwendung des Pico-Tag-HPLC-Verfahrens (Waters Associates, Milford, MA) gemäß den Anweisungen des Herstellers analysiert.

[0255] Die Enzymdosierungen für jeden Hydrolysekolben, enthaltend 200 mg Sojaprotein, sind in nachstehender Tabelle 4 dargestellt. Die Aminopeptidase II wurde, wie beschrieben in Beispiel 10, rekombinant in *Aspergillus oryzae* hergestellt und angemessen gereinigt. Die Aminopeptidase-II-Lösung wies einen A_{280} von 8,1 und einen geschätzten Proteingehalt von 5 mg/ml aus der Aminosäurebestimmung auf.

[0256] Die Ergebnisse der DH-Analyse sind in Tabelle 4 dargelegt. Der DH wurde aus der Gesamtproteinkonzentration von 2% – nicht aus dem Gehalt an löslichem Protein – berechnet.

Tabelle 4. Die DH-Ergebnisse für die Hydrolysate

	FLAVOURZYME™ 1000 l %	Aminopeptidase II g Enz.prot./ kg Sojaprotein*	DH %
1	1,5	0	45,1
2	1,5	0,03	50,9
3	1,5	0,06	51,0
4	1,5	0,12	51,3
5	1,5	0,25	55,7
6	1,5	0,50	58,0
7	2,0	0	51,9
8	6,0	0	62,8
9	6,0	0,03	62,9
10	6,0	0,06	62,9
11	6,0	0,12	63,6
12	6,0	0,25	68,5
13	6,0	0,50	67,8
14	7,0	0	63,2

* Die Konzentration an für diese Berechnung verwendeter Aminopeptidase II beträgt 5 mg/ml

[0257] Tabelle 5 zeigt die relative prozentuale Zunahme an einzelnen Aminosäuren durch Zugabe einer maximalen Aminopeptidase-II-Dosierung (0,5 g/kg Sojaprotein) auf eine Hintergrunddosierung von FLAVOURZYME™.

Tabelle 5. Relative prozentuale Zunahme an freien Aminosäuren aufgrund der Zugabe von Aminopeptidase II

Aminosäure	1,5% FLAVOURZYME™	6%
FLAVOURZYME™	+ Aminopeptidase II	+ Aminopeptidase II
asp	123,4	26,0
glu	54,2	24,5
asn	115,1	-7,0
ser	123,8	0,0
gln	91,7	19,8
gly	145,7	22,4
his	31,9	2,8
arg	24,9	6,1
thr	40,4	8,8
ala	77,4	18,5
pro	87,5	59,2
tyr	51,3	10,5
val	41,4	12,7
met	36,8	9,7
cys	74,4	23,2
ile	24,6	13,0
leu	22,4	7,5
phe	22,8	8,0
lys	49,0	10,3
total	49,1	10,6
DH	28,7	8,0

[0258] Die Ergebnisse zeigten, dass nach Zugabe von Aminopeptidase II zu einer niedrigen Dosierung von FLAVOURZYME™ (1,5%) Gly die höchste relative Zunahme, gefolgt von Ser, Asp, Asn, Pro, Cys und Ala zeigte. Als Aminopeptidase II einer hohen FLAVOURZYME™-Dosierung (6%) zugesetzt wurde, zeigte Pro die höchste relative Zunahme, gefolgt von Asp Glu, Cys, Gly und Gln.

Beispiel 19: Erhöhte Proteinlöslichkeit und Freisetzung von Glutamat durch Deamidierung

[0259] Weizengluten (WG) wurde von Cargill (JOB 5141) erhalten, und deamidiertes Weizengluten (DWG) wurde von StaPro Consultancy B. V., Lemdijk 32, 9422 TH Smilde, NL, erhalten. Suspensionen von 8% Protein wurden durch Mischen von 11 g Gluten mit 89 g Wasser hergestellt. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 6,5 eingestellt. Glutamat/Aspartat-spezifische Protease (SP446), erhältlich wie beschrieben in WO 91/13554, oder Lysin/Arginin-spezifische Protease (SP387), erhältlich wie beschrieben in WO 89/06270, wurde den Suspensionen zugesetzt. Die Dosierung betrug 0,01 AU/g Protein für SP446 und 0,006 AU/g Protein für SP387. FLAVOURZYME™ (ein unspezifisch wirkendes Proteasepräparat, erhältlich von Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Dänemark, enthaltend Endo- und Exopeptidaseaktivitäten und erhalten durch Fermentation von Aspergillus

oryzae) wurde zu einigen der Hydrolysate mit einer Dosierung von 20 LAPU/g Protein zugesetzt.

[0260] Die Hydrolysen wurden bei 50°C ohne weitere pH-Einstellung für eine Dauer von 18 Stunden durchgeführt. Die Enzyme wurden durch Erwärmen auf 85°C für eine Dauer von 15 Minuten inaktiviert. Der pH-Wert wurde auf 5 eingestellt, und die Hydrolysate wurden zentrifugiert. Der Gehalt an Protein und freiem Glutamat im Überstand wurde bestimmt.

[0261] Der Proteingehalt wurde durch Kjeldahl-Analyse, unter Verwendung eines Kjeldahl-Faktors von 6,25, bestimmt.

[0262] Der Gehalt an freiem Glutamat wurde durch Verwendung eines Glutamat-Bestimmungskits gemäß den Anweisungen des Herstellers (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN) bestimmt. Das Verfahren wurde auf die Verwendung in Mikrotiterplatten angepasst.

[0263] Beim Vergleichen von Weizengluten (WG) mit deamidiertem Weizengluten (DWG) zeigten die in Tabelle 6 dargestellten Ergebnisse, dass die Deamidierung die Empfänglichkeit des Glutens für spezifische Proteasen derart erhöhte, dass mehr Protein löslich wurde. Durch Zugabe von FLAVOURZYME™ mit einer spezifischen Protease wurde die Freisetzung von Glutamat aufgrund der Deamidierung verdoppelt.

Tabelle 6

Hydrolysat	Proteinlöslichkeit	Glutamatgehalt
	% WG DWG	mg/l WG DWG
SP446	18 54	0 0
SP387	35 44	0 0
SP446 + FLAVOURZYME™	34 87	1000 2000

Beispiel 20: Enzymatische Deamidierung und Freisetzung von Glutamat

[0264] Peptidoglutaminase II wurde durch Wachsenlassen von Stämmen von *Bacillus circulans* ATCC 21590 in Schüttelkolben (400 ml), enthaltend 200 ml eines Mediums, zusammengesetzt aus 1% Polypepton, 0,5% Lactose, 0,025% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,005% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,025% KH_2PO_4 und 17% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (pH eingestellt auf 7,2), bei 30°C für eine Dauer von 20 Stunden unter Mischen bei 270 UpM hergestellt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation mit 4000 UpM in Kolben mit einem Volumen von 1 Liter geerntet. Die Zellen wurden dann eingefroren.

[0265] Die Reinigung von Peptidoglutaminase II aus *Bacillus circulans* wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die eingefrorenen Zellen von *Bacillus circulans* wurden aufgetaut und dann in Lysepuffer (50 mM Tris/HCl; 25% (G/V) Saccharose; 1 mM EDTA, pH 8,0) suspendiert, bis eine homogene Suspension erhalten war – 100 g nasse Zellen pro Liter Lysepuffer. Lysozyme (10 mg/ml) und DNase I (Sigma DN-25, 10 mg/ml) wurden in Lysepuffer gelöst. Dann wurden 100 ml Lysozyme-Lösung, 10 ml 1,0 M MgCl_2 und 1 ml DNase-I-Lösung pro Liter Zellsuspension zugesetzt. Man ließ die Enzyme für eine Dauer von 1 Stunde wirken.

[0266] Die Suspension wurde durch eine Seitz-Tiefenfilterplatte filtriert und das Filtrat in ein 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$, pH 8,0 (Puffer A) auf eine Säule des Typs Sephadex G25 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) überführt. Die Enzymlösung wurde auf eine Säule des Typs SOURCE Q (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden), äquilibriert in Puffer A, aufgebracht und mit einem linearen NaCl-Gradienten (0 → 500 mM) in Puffer A eluiert. Fraktionen aus der Säule wurden auf Peptidoglutaminase-II-Aktivität wie nachstehend beschrieben analysiert, und Fraktionen mit Aktivität wurden gepoolt. Die Absorption für die gepoolten Fraktionen bei 280 nm betrug 1,78, wodurch der Proteingehalt auf 1,8 mg/ml bestimmt wurde.

[0267] Die Reinheit des Proteins in dem Peptidoglutaminase-II-Pool betrug, wie aus einem SDS-PAGE-Gel beurteilt, etwa 25%. Folglich enthielt das Präparat etwa 0,5 mg/ml reine Peptidoglutaminase II.

[0268] Die Peptidoglutaminaseaktivität wurde durch Messen des Ammoniaks, der während der Hydrolyse von γ -Carboxyamid von N-tert-Butoxycarbonyl-Gln-Pro (N-t-BOC-Gln-Pro; SIGMA Nr. B-4403) gebildet wurde, unter Verwendung des Kits von Boehringer-Mannheim zur Ammoniakbestimmung (Kat. Nr. 1112732) bestimmt. In diesem Kit wird Ammoniak durch Bestimmung des Verbrauchs von NADH durch Glutamatdehydrogenase gemessen, und Blindwerte ohne die Zugabe von N-t-BOC-Gln-Pro wurden ebenfalls verwendet, um die Wirkung von anderen NADH-verbrauchenden Enzymen zu subtrahieren.

[0269] Insgesamt 200 mg Weizenglutenprotein wurden zu 9 ml siedendem Wasser zugesetzt, und nach Abkühlen wurde der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Dann wurden 250 μ l des vorstehend beschriebenen Peptidoglutaminase-II-Präparats (PEP) zugesetzt. Die in Beispiel 19 beschriebene Glutamat/Aspartat-spezifische Protease (SP446) wurde in einer Menge von 0,04 AU/g Protein zugesetzt, und in Beispiel 19 beschriebenes FLA-VOURZYME™ wurde in einer Menge von 20 LAPU/g Protein zugesetzt.

[0270] Man ließ die Hydrolyse ohne pH-Einstellung für eine Dauer von 18 Stunden bei 50°C verlaufen. Kontrollen ohne die Zugabe von Peptidoglutaminase wurden ebenfalls durchgeführt. Die Hydrolysate wurden zentrifugiert, und das Glutamat wurde wie in Beispiel 19 beschrieben gemessen. Der DH wurde wie in Beispiel 18 beschrieben bestimmt.

[0271] Die wie in Tabelle 7 nachstehend dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Hydrolyse mit dem Peptidoglutaminasepräparat den DH sowie die Freisetzung von Glutamat erhöhte.

Tabelle 7

Hydrolyse	DH %	Glutamat mg/l
Minus PEP	40	131
Plus PEP	43	171

Hinterlegung von biologischen Materialien

[0272] Das folgende biologische Material wurde unter den Bedingungen des Budapester Vertrags bei der Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center, 1815 University Street, Peoria, Illinois, 61604, unter Erhalt der folgenden Zugangsnummer hinterlegt:

Hinterlegung	Zugangsnummer	Hinterlegungsdatum
<i>E. coli</i> DH5 α pEJG18	NRRL B-677	4. April 1997

SEQUENZLISTE

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Novo Nordisk Biotech, Inc.
- (B) STRASSE: 1445 Drew Avenue
- (C) STADT: Davis, California
- (D) LAND: United States of America
- (E) POSTLEITZAHL (ZIP): 95616-4880
- (F) TELEFONE: (530) 757-8100
- (G) TELEFAX: (530) 758-0317

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: Polypeptide mit Aminopeptidase-
aktivität und diese kodierende Nukleinsäuren

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 9

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

- (A) ADDRESSAT: Novo Nordisk of North America, Inc.
- (B) STRASSE: 405 Lexington Avenue
- (C) STADT: New York
- (D) STAAT: NY
- (E) LAND: U.S.A.
- (F) ZIP: 10174

(v) COMPUTERLESBARE FORM:

- (A) MEDIUMTYP: Diskette
- (B) COMPUTER: IBM Compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: DOS
- (D) SOFTWARE: FastSEQ for Windows Version 2.0

(vi) DERZEITIGE ANMELUNGSDATEN:

- (A) ANMELDUNGSMUMMER:
- (B) EINREICHUNGSDATUM: 13-MAY-1998
- (C) KLASSIFIZIERUNG:

(vii) FRÜHERE ANMELDUNGSDATEN:

- (A) ANMELDUNGSNUMMER:
- (B) EINREICHUNGSDATUM:

(viii) INFORMATION ÜBER DEN ANWALT/BEVOLLMÄCHTIGTEN:

- (A) NAME: Gregg, Valeta A.
- (B) ZULASSUNGSNUMMER: 35,127
- (C) AKTENZEICHEN/PROZESSNUMMER: 5253.204-WO

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATION:

- (A) TELEFONE: 212-867-0123
- (B) TELEFAX: 212-878-9655
- (C) TELEX:

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:1:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 1491 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:1:

ATGAGGTCGC	TTTTGTGGGC	TTCGTTGCTT	TCGGGCGTGT	TGGCTGGGAG	GGCGCTTGTT	60
TCGCCGGATG	AGTTCCCCGA	GGATATTCAG	TTGGAAGATC	TGCTGGAAGG	ATCCCAACAG	120
CTTGAGGACT	TCGCCTATGC	CTACCCCGAG	CGCAATCGCG	TCTTTGGTGG	TAAAGCCCAC	180
GACGACACGG	TTAACTATCT	CTACGAGGAG	CTGAAGAAGA	CTGGCTACTA	TGATGTCTAC	240
AAGCAGCCTC	AGGTGCACCT	GTGGAGCAAT	GCCGACCAGA	CGCTCAAGGT	GGGCGATGAG	300
GAAATCGAGG	CGAAGACCAT	GACCTACAGT	CCCAGCGTCG	AGGTCACCGC	CGATGTAGCC	360
GTCGTCAAGA	ACCTGGGATG	CAGCGAGGCG	GATTACCCAT	CCGATGTCGA	GGGCAAGGTC	420
GCCCTGATCA	AGCGTGGAGA	ATGCCCGTTC	GGCGACAAGT	CGGTTCTCGC	TGCCAAAGCC	480
AAGGCCGCGG	CTTCGATTGT	CTATAACAAT	GTGGCCGGAT	CCATGGCGGG	CACCCTTGGC	540
GCGGCGCAGA	GTGATAAGGG	ACCGTATTCG	GCCATTGTCTG	GTATCAGCTT	GGAGGATGGC	600
CAGAAGCTGA	TCAAGCTTGC	TGAGGCTGGA	TCGGTATCTG	TGGATCTGTG	GGTGGATAGT	660
AAGCAGGAGA	ACCGTACGAC	GTATAACGTT	GTCGCGCAGA	CGAAGGGCGG	CGATCCGAAC	720
AACGTCGTCG	CGCTGGGTGG	CCACACGGAC	TCAGTCGAGG	CGGGCCCTGG	TATCAACGAC	780
GATGGCTCGG	GCATTATTAG	CAACTTGCTC	ATTGCCAAAG	CGCTCACGCA	GTA CTCCGTC	840
AAGAATGCCG	TGCGCTTCCT	CTTCTGGACA	GCAGAGGAGT	TCGGTCTGCT	GGGCAGCAAC	900
TACTACGTCT	CCCATCTGAA	TGCCACCGAG	CTGAACAAGA	TCCGACTGTA	CCTGAACTTC	960
GACATGATCG	CCTCACCTAA	CTACGCCCTC	ATGATCTATG	ACGGTGATGG	ATCGGCGTTC	1020
AACCAGAGCG	GACCGGCCGG	TTCCGCCCAG	ATCGAGAAAC	TGTTGAGGGA	CTACTACGAC	1080
TCCATCGACC	TGCCTCATAT	CCCCACCCAG	TTTGACGGAC	GTTCCGACTA	CGAGGCCTTT	1140
ATCCTGAACG	GCATTCCGTC	CGGTGGACTC	TTCACGGGCG	CCGAGGGCAT	CATGTCCGAA	1200
GAGAACGCAA	GCCGCTGGGG	AGGTCAAGCC	GGCGTGGCCT	ACGACGCCAA	CTACCACGCC	1260
GCGGGAGACA	ACATGACCAA	CCTCAACCAT	GAAGCCTTCC	TGATCAACTC	CAAAGCCACC	1320
GCCTTCGCCG	TCGCCACCTA	CGCCAACGAC	CTCTCCTCGA	TCCCCAAACG	GAATACCACA	1380
TCCTCCTTGC	ACCGACGAGC	CCGCACCATG	CGACCATTCTG	GCAAGAGAGC	TCCGAAGACA	1440
CACGCTCACG	TATCAGGATC	CGGATGCTGG	CATTCTCAAG	TCGAGGCATA	G	1491

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 496 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRANGART: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:2:

```

Met Arg Ser Leu Leu Trp Ala Ser Leu Leu Ser Gly Val Leu Ala Gly
 1           5           10           15
Arg Ala Leu Val Ser Pro Asp Glu Phe Pro Glu Asp Ile Gln Leu Glu
      20           25           30
Asp Leu Leu Glu Gly Ser Gln Gln Leu Glu Asp Phe Ala Tyr Ala Tyr
      35           40           45
Pro Glu Arg Asn Arg Val Phe Gly Gly Lys Ala His Asp Asp Thr Val
      50           55           60
Asn Tyr Leu Tyr Glu Glu Leu Lys Lys Thr Gly Tyr Tyr Asp Val Tyr
65           70           75           80
Lys Gln Pro Gln Val His Leu Trp Ser Asn Ala Asp Gln Thr Leu Lys
      85           90           95
Val Gly Asp Glu Glu Ile Glu Ala Lys Thr Met Thr Tyr Ser Pro Ser
      100          105          110
Val Glu Val Thr Ala Asp Val Ala Val Val Lys Asn Leu Gly Cys Ser
      115          120          125
Glu Ala Asp Tyr Pro Ser Asp Val Glu Gly Lys Val Ala Leu Ile Lys
      130          135          140
Arg Gly Glu Cys Pro Phe Gly Asp Lys Ser Val Leu Ala Ala Lys Ala
145          150          155          160
Lys Ala Ala Ala Ser Ile Val Tyr Asn Asn Val Ala Gly Ser Met Ala
      165          170          175
Gly Thr Leu Gly Ala Ala Gln Ser Asp Lys Gly Pro Tyr Ser Ala Ile
      180          185          190
Val Gly Ile Ser Leu Glu Asp Gly Gln Lys Leu Ile Lys Leu Ala Glu

```

DE 698 37 475 T2 2007.12.13

195	200	205
Ala Gly Ser Val Ser Val Asp Leu Trp Val Asp Ser Lys Gln Glu Asn		
210	215	220
Arg Thr Thr Tyr Asn Val Val Ala Gln Thr Lys Gly Gly Asp Pro Asn		
225	230	235
Asn Val Val Ala Leu Gly Gly His Thr Asp Ser Val Glu Ala Gly Pro		
245	250	255
Gly Ile Asn Asp Asp Gly Ser Gly Ile Ile Ser Asn Leu Val Ile Ala		
260	265	270
Lys Ala Leu Thr Gln Tyr Ser Val Lys Asn Ala Val Arg Phe Leu Phe		
275	280	285
Trp Thr Ala Glu Glu Phe Gly Leu Leu Gly Ser Asn Tyr Tyr Val Ser		
290	295	300
His Leu Asn Ala Thr Glu Leu Asn Lys Ile Arg Leu Tyr Leu Asn Phe		
305	310	315
Asp Met Ile Ala Ser Pro Asn Tyr Ala Leu Met Ile Tyr Asp Gly Asp		
325	330	335
Gly Ser Ala Phe Asn Gln Ser Gly Pro Ala Gly Ser Ala Gln Ile Glu		
340	345	350
Lys Leu Phe Glu Asp Tyr Tyr Asp Ser Ile Asp Leu Pro His Ile Pro		
355	360	365
Thr Gln Phe Asp Gly Arg Ser Asp Tyr Glu Ala Phe Ile Leu Asn Gly		
370	375	380
Ile Pro Ser Gly Gly Leu Phe Thr Gly Ala Glu Gly Ile Met Ser Glu		
385	390	395
Glu Asn Ala Ser Arg Trp Gly Gly Gln Ala Gly Val Ala Tyr Asp Ala		
405	410	415
Asn Tyr His Ala Ala Gly Asp Asn Met Thr Asn Leu Asn His Glu Ala		
420	425	430
Phe Leu Ile Asn Ser Lys Ala Thr Ala Phe Ala Val Ala Thr Tyr Ala		
435	440	445
Asn Asp Leu Ser Ser Ile Pro Lys Arg Asn Thr Thr Ser Ser Leu His		
450	455	460

Arg	Arg	Ala	Arg	Thr	Met	Arg	Pro	Phe	Gly	Lys	Arg	Ala	Pro	Lys	Thr
465					470					475					480
His	Ala	His	Val	Ser	Gly	Ser	Gly	Cys	Trp	His	Ser	Gln	Val	Glu	Ala
				485					490						495

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:3:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGART: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: kein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:3:

Cys	Cys	Ile	Gly	Ala	Tyr	Gly	Ala	Arg	Thr	Thr	Tyr	Cys	Cys	Ile	Gly
1				5					10					15	
Ala	Arg	Gly	Ala												
				20											

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:4:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 36 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGART: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: kein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:4:

```

Arg Thr Thr Tyr Thr Thr Ile Ala Cys Ile Ala Cys Ile Gly Cys Ile
 1           5           10           15
Ala Cys Arg Thr Cys Ile Gly Cys Ile Gly Thr Ile Ala Cys Tyr Thr
          20           25           30
Cys Ile Ala Cys
          35

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:5:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 537 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGART: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:5:

```

Met His Phe Ser Leu Lys Gln Leu Ala Val Ala Ala Phe Tyr Ala Thr
 1           5           10           15
Asn Leu Gly Ser Ala Tyr Val Ile Pro Gln Phe Phe Gln Glu Ala Phe
          20           25           30
Gln Gln Glu Glu Pro Ile Glu Asn Tyr Leu Pro Gln Leu Asn Asp Asp
          35           40           45
Asp Ser Ser Ala Val Ala Ala Asn Ile Pro Lys Pro His Ile Pro Tyr
          50           55           60
Phe Met Lys Pro His Val Glu Ser Glu Lys Leu Gln Asp Lys Ile Lys
          65           70           75           80
Val Asp Asp Leu Asn Ala Thr Ala Trp Asp Leu Tyr Arg Leu Ala Asn

```

DE 698 37 475 T2 2007.12.13

85	90	95
Tyr Ser Thr Pro Asp Tyr Gly His Pro Thr Arg Val Ile Gly Ser Lys		
100	105	110
Gly His Asn Lys Thr Met Glu Tyr Ile Leu Asn Val Phe Asp Asp Met		
115	120	125
Gln Asp Tyr Tyr Asp Val Ser Leu Gln Glu Phe Glu Ala Leu Ser Gly		
130	135	140
Lys Ile Ile Ser Phe Asn Leu Ser Asp Ala Glu Thr Gly Lys Ser Phe		
145	150	155
Ala Asn Thr Thr Ala Phe Ala Leu Ser Pro Pro Val Asp Gly Phe Val		
165	170	175
Gly Lys Leu Val Glu Ile Pro Asn Leu Gly Cys Glu Glu Lys Asp Tyr		
180	185	190
Ala Ser Val Val Pro Pro Arg His Asn Glu Lys Gln Ile Ala Leu Ile		
195	200	205
Glu Arg Gly Lys Cys Pro Phe Gly Asp Lys Ser Asn Leu Ala Gly Lys		
210	215	220
Phe Gly Phe Thr Ala Val Val Ile Tyr Asp Asn Glu Pro Lys Ser Lys		
225	230	235
Glu Gly Leu His Gly Thr Leu Gly Glu Pro Thr Lys His Thr Val Ala		
245	250	255
Thr Val Gly Val Pro Tyr Lys Val Gly Lys Lys Leu Ile Ala Asn Ile		
260	265	270
Ala Leu Asn Ile Asp Tyr Ser Leu Tyr Phe Ala Met Asp Ser Tyr Val		
275	280	285
Glu Phe Ile Lys Thr Gln Asn Ile Ile Ala Asp Thr Lys His Gly Asp		
290	295	300
Pro Asp Asn Ile Val Ala Leu Gly Ala His Ser Asp Ser Val Glu Glu		
305	310	315
Gly Pro Gly Ile Asn Asp Asp Gly Ser Gly Thr Ile Ser Leu Leu Asn		
325	330	335
Val Ala Lys Gln Leu Thr His Phe Lys Ile Asn Asn Lys Val Arg Phe		
340	345	350

DE 698 37 475 T2 2007.12.13

Ala Trp Trp Ala Ala Glu Glu Glu Gly Leu Leu Gly Ser Asn Phe Tyr			
355	360	365	
Ala Tyr Asn Leu Thr Lys Glu Glu Asn Ser Lys Ile Arg Val Phe Met			
370	375	380	
Asp Tyr Asp Met Met Ala Ser Pro Asn Tyr Glu Tyr Glu Ile Tyr Asp			
385	390	395	400
Ala Asn Asn Lys Glu Asn Pro Lys Gly Ser Glu Glu Leu Lys Asn Leu			
405	410	415	
Tyr Val Asp Tyr Tyr Lys Ala His His Leu Asn Tyr Thr Leu Val Pro			
420	425	430	
Phe Asp Gly Arg Ser Asp Tyr Val Gly Phe Ile Asn Asn Gly Ile Pro			
435	440	445	
Ala Gly Gly Ile Ala Thr Gly Ala Glu Lys Asn Asn Val Asn Asn Gly			
450	455	460	
Lys Val Leu Asp Arg Cys Tyr His Gln Leu Cys Asp Asp Val Ser Asn			
465	470	475	480
Leu Ser Trp Asp Ala Phe Ile Thr Asn Thr Lys Leu Ile Ala His Ser			
485	490	495	
Val Ala Thr Tyr Ala Asp Ser Phe Glu Gly Phe Pro Lys Arg Glu Thr			
500	505	510	
Gln Lys His Lys Glu Val Asp Ile Leu Asn Ala Gln Gln Pro Gln Phe			
515	520	525	
Lys Tyr Arg Ala Asp Phe Leu Ile Ile			
530	535		

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:6:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzeln

ATTTAAATCA CCATGAGGTC GCTTTTGTGG GC

32

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:9:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 32 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:9:

GGGTTAATTA ACTATGCCTC GACTTGAGAA TG

32

(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:6:

ATGATGAGGT CGCTTTTGTG GGC

23

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:7:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:7:

GGGATGCATC TATGCCTCGA CTT

23

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:8:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 32 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:8:

Patentansprüche

1. Isoliertes Polypeptid mit Aminopeptidaseaktivität, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus:
 - (a) einem Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz, die eine mindestens 80%ige Identität mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NR:2 aufweist; und
 - (b) einem Fragment von (a), wobei das Fragment Aminopeptidaseaktivität aufweist.

2. Polypeptid nach Anspruch 1, umfassend eine Aminosäuresequenz, die eine mindestens 90%ige Identität mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NR:2 aufweist
3. Polypeptid nach Anspruch 1, umfassend die Aminosäuresequenz von SEQ ID NR:2 oder ein Fragment davon.
4. Polypeptid nach Anspruch 3, umfassend die Aminosäuresequenz von SEQ ID NR:2.
5. Polypeptid nach Anspruch 1, das von einem Aspergillus-Stamm erhalten wird.
6. Polypeptid nach Anspruch 5, das von einem Stamm von *Aspergillus oryzae* erhalten wird.
7. Polypeptid nach Anspruch 1, das durch die Nukleinsäuresequenz kodiert wird, die in Plasmid pEJG18, enthalten in *E. coli* NRRL B-21677, enthalten ist.
8. Isolierte Nukleinsäuresequenz, umfassend eine Nukleinsäuresequenz, die das Polypeptid nach Anspruch 1 kodiert.
9. Nukleinsäurekonstrukt, umfassend die Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 8, funktionsfähig verknüpft mit einer oder mehreren Kontrollsequenzen, die die Herstellung des Polypeptids in einem geeigneten Expressionswirt lenken.
10. Rekombinanter Expressionsvektor, umfassend das Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 9, einen Promotor und Transkriptions- und Translationsstoppsignale.
11. Rekombinante Wirtszelle, umfassend das Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 9.
12. Verfahren zur Herstellung des Polypeptids nach Anspruch 1, umfassend (a) Züchten eines Stamms zur Herstellung eines das Polypeptid umfassenden Überstands und (b) Gewinnen des Polypeptids.
13. Verfahren zur Herstellung des Polypeptids, umfassend (a) Züchten einer Wirtszelle nach Anspruch 11 unter zur Herstellung des Polypeptids geeigneten Bedingungen und (b) Gewinnen des Polypeptids.
14. Verfahren zur Herstellung des Polypeptids nach Anspruch 1, umfassend (a) Züchten einer homolog rekombinanten Zelle, in welche eine neue Transkriptionseinheit, umfassend eine regulatorische Sequenz, ein Exon und/oder eine Spleißdonorstelle, funktionsfähig verknüpft mit einem zweiten Exon einer das Polypeptid kodierenden endogenen Nukleinsäuresequenz, eingebracht wurde, unter für die Herstellung des Polypeptids förderlichen Bedingungen und (b) Gewinnen des Polypeptids.
15. Verfahren zur Herstellung eines Hydrolysats von einem proteinhaltigen Substrat, das das Unterziehen des Substrats einem Polypeptid nach Anspruch 1 und einer Endopeptidase umfasst.
16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei das Hydrolysat in Bezug auf Leu, Gly, Glu, Ser, Asp, Asn, Pro, Cys, Ala und/oder Gln angereichert ist.
17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei das Hydrolysat in Bezug auf Gly angereichert ist.
18. Verfahren zum Erhalt eines Proteinhydrolysats, das in Bezug auf freier Glutaminsäure und/oder peptidgebundenen Glutaminsäureresten angereichert ist, von einem proteinhaltigen Substrat, umfassend das Unterziehen des Substrats einem Deamidierungsverfahren und einem Polypeptid nach Anspruch 1.
19. Verfahren nach Anspruch 18, des Weiteren umfassend das Unterziehen des Substrats einem oder mehreren unspezifisch wirkenden Endo- und/oder Exopeptidaseenzymen.
20. Geschmackverbessernde Zusammensetzung, umfassend ein Polypeptid nach Anspruch 1 und einen geeigneten Träger.
21. Vorgemisch für einen Teig, umfassend ein Polypeptid nach Anspruch 1 und einen Backzusatz.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

ATGAGTGGCTTTTGTGGCTTCGTTGCTTTGGGGCGTGTGGCTGGAGGGCGCTTGTTTCGCCGGAATGAGTTCCTCCCGAGGATATTTCAG 90
M R S L L W A S L L S G V L A G R A L V S P D E F P E D I Q
 TTGGAAGATCTGCTGGAAGGATCCCAACAGCTTGAGGACTTCGCCTATGCCCTACCCCGAGCGCAATCGCGTCTTTGGTGGTAAAGCCAC 180
L E D L L E G S Q Q L E D F A Y A Y P E R N R V F G G K A H
 GACGACACGGTTAACTAICTCTACGAGGAGCTGAAGAAGACTGGCTACTATGATGICTACAGCAGCCTCAGGIGCAGGTGTGGAGCAAT 270
 D D T V N Y L Y E E L K K T G Y Y D V Y K Q P Q V H L W S N
 GCCGACCAGACGCTCAAGGTGGGCGATGAGGAAATCGAGGGGAAGACCATGACCTACAGTCCAGCGTCGAGGTCACCGCGGATGTAGCC 360
A D D T L K V G D E E I E A K T M T Y S P S V E V T A D V A
 GTCGTCAAGAACCTGGGATGCAGCGAGCGGATTACCCATCCGATGTCGAGGGCAAGCTCGCCCTGATCAAGCGTGGAGAATGCCCGTTC 450
V V K N L G C S E A D Y P S D V E G K V A L I K R G E C P F
 GCGGACAAGTCGGTTCCTCGCTGCCAAAGCCAAAGCGCGGCTTCGATTGICTATAACAATIGGCCGGATCCATGGCGGCACCCCTTGGC 540
 G D K S V L A A K A K A A A S I V Y N N V A G S M A G T L G
 GCGGCGCAGAGTGATAAGGACCGTATTCGGCCATTGTCGGTATCAGCTTGGAGGATGGCCAGAAGCTGATCAAGCTTGCTGAGGCTGGA 630
 A A Q S D K G P Y S A I V G I S L E D G Q K L I K L A E A G
 TCGGTATCTGTGGTATCTGTGGTGGATAGTAAGCAGGAGAACCGTACGACGTATAACGTTGTCGCGCAGACGAAGGGCGGATCCGAAC 720
 S V S V D L W V D S K Q E N R T T Y N V V A Q T K G G D P N
 AACGTCGTCGGCTGGTGGCCACACGGACTCAGTCGAGGCGGGCCCTGGTATCAACGACGATGGCTCGGGCATTATTAGCAACTTGGTC 810
 N V V A L G G H T D S V E A G P G I N D D G S G I I S N L V

FIG.1A

ATTGCAAAGCGCTACGCAGTACTCGGTCAAGAAIGCGGTGCGCTTCTCTTCTGGACAGCAGAGGAGTTCGGTCTGCTGGGCAGCAAC 900
 I A K A L T Q Y S V K N A V R F L F W T A E E F G L L G S N

 TACTACGCTCTCCCATCTGAATGCCACCGAGCTGAACAAGATCCGACGTGACCTGAACCTCGCATGATCGCCTACCTAACTACGCCCTC 990
 Y Y V S H L N A T E L N K I R L Y L N F D M I A S P N Y A L

 ATGATCTATGACGGTGATGGATCGGCGTTCAACCAGAGCGGACCGCGGTTCCGCCCAGATCGAGAAACIGTTCGAGGACTACTACGAC 1080
 M I Y D G D G S A F N Q S G P A G S A Q I E K L F E D Y Y D

 TCCATCGACCTGCCTCATATCCCCACCCAGTTTGACGGACGTTCCGACTACGAGGCCCTTATCCTGAACGGCATTCGGTCCGGTGGACTC 1170
 S I D L P H I P T Q F D G R S D Y E A F I L N G I P S G G L

 TTCACGGGCGCGAGGGCATCATGTCCGAAGAGAACGCAAGCCGCTGGGGAGGTCAAGCCGGCGTGGCCTACGACGCCAACTACCCACGCC 1260
 F T G A E G I M S E E N A S R W G G Q A G V A Y D A N Y H A

 GCGGGAGACAACATGACCAACCTCAACCATGAAGCCTTCTGTATCAACTCCAAGCCACCGCCTTCGCCGTGCGCACCTACGCCCAACGAC 1350
 A G D N M T N L N H E A F L I N S K A T A F A V A T Y A N D

 CTCTCCTCGATCCCCAAACGGAATACCACATCCTCCTTGACCGACGAGCCGACCAATGCGACCATTCGGCAAGAGAGCTCCGAAGACA 1440
 L S S I P K R N T T S S L H R R A R T M R P F G K R A P K T

 CACGCTCAGGTATCAGGATCCGGATGCTGGCATTCCTCAAGTCGAGGCATAG 1491
 H A H V S G S G C W H S Q V E A

FIG.1B

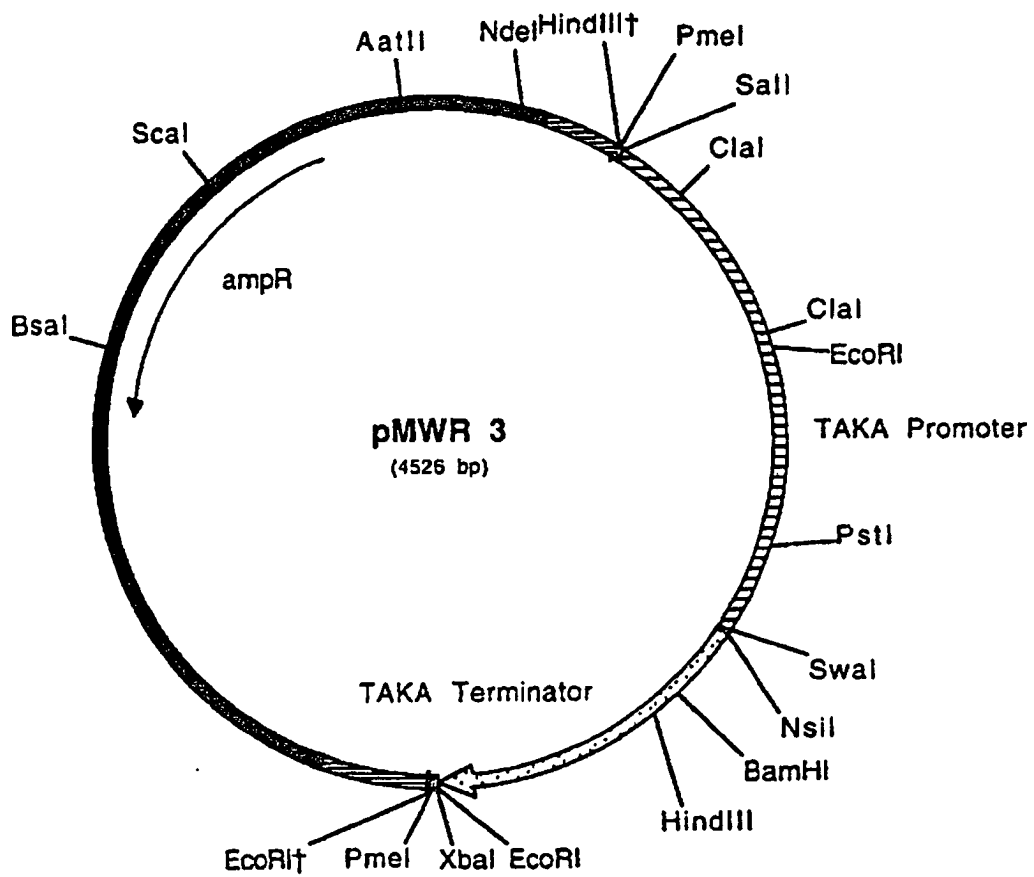


Fig. 2

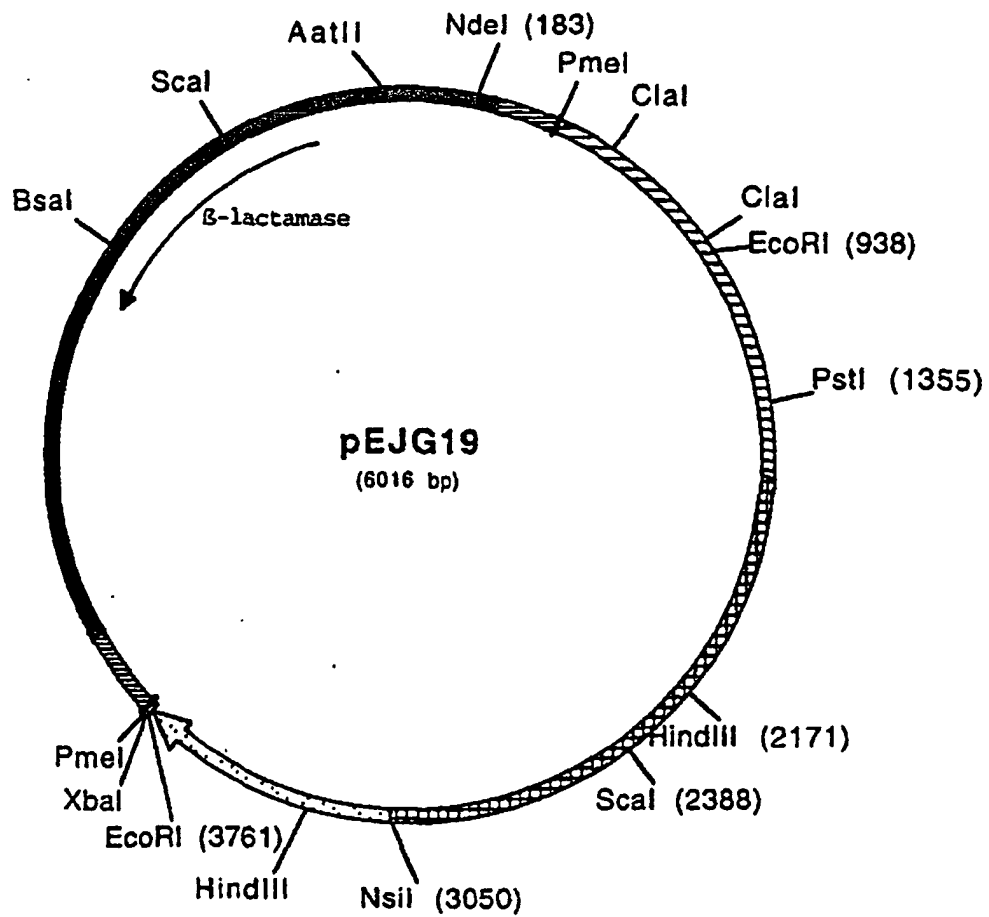


Fig. 3

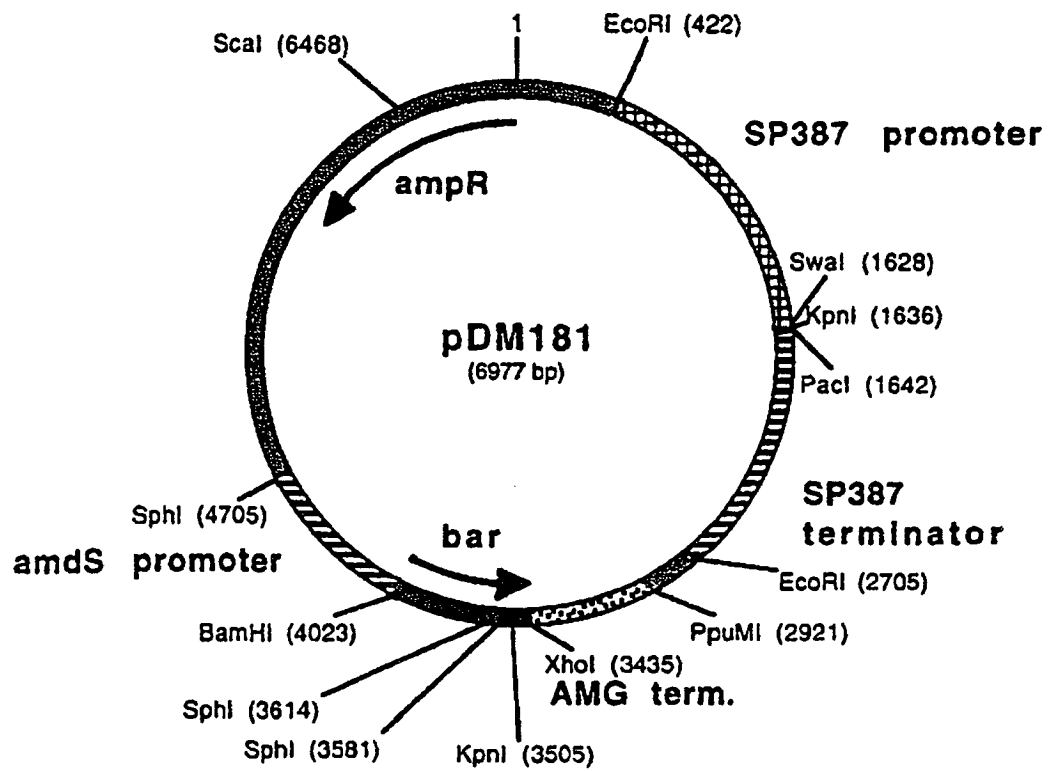


Fig. 4

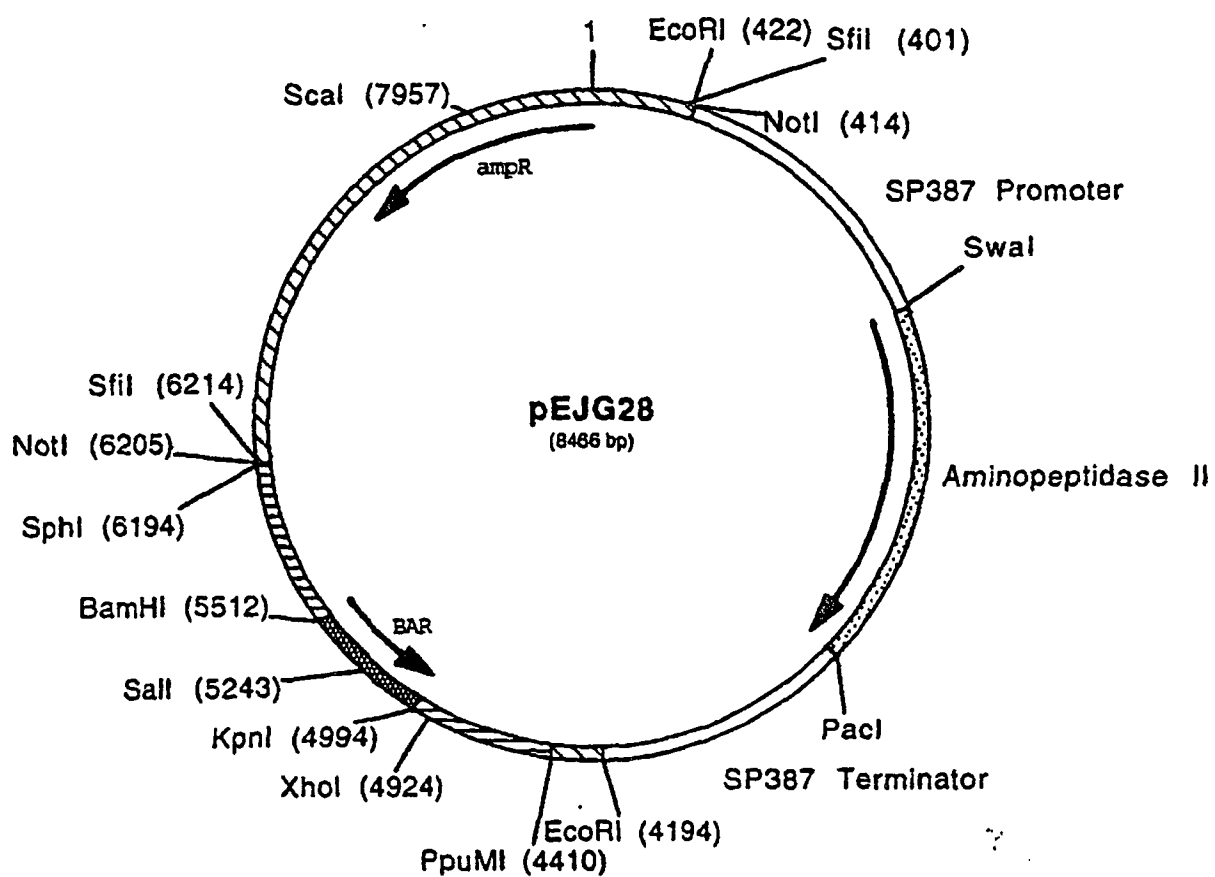


Fig. 5