

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 034034

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.12.20

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

(21) Номер заявки
201591995

(22) Дата подачи заявки
2014.04.17

(54) СКОНСТРУИРОВАННЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ ФЕНИЛАЛАНИН-АММИАК-ЛИАЗЫ

(31) 61/813,586; 61/897,932

(32) 2013.04.18; 2013.10.31

(33) US

(43) 2016.04.29

(86) PCT/US2014/034500

(87) WO 2014/172541 2014.10.23

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

(72) Изобретатель:
Хейсман Гьялт В., Агард Николас
Дж., Мейтс Бенджамин, Врум
Джонатан, Чжан Сиюнь (US)

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

(56) US-A1-20080008695
US-A-5753487
US-A1-20130039898
WO-A2-2003018759
US-B2-7560263

(57) Изобретение относится к сконструированным полипептидам фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL) и их композициям, а также полинуклеотидам, кодирующим сконструированные полипептиды фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL).

034034 B1

034034 B1

034034

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной патентной заявки США с серийным номером 61/813586, зарегистрированной 18 апреля 2013 г., и предварительной патентной заявки США с серийным номером 61/897932, зарегистрированной 31 октября 2013 г., которые обе полностью включены посредством ссылки для всех целей.

Ссылка на приложение списка последовательностей, списка таблиц или компьютерных программ, предоставленное как текстовый файл ASCII

Список последовательностей, записанный в файле CX7-131WO2_ST25.TXT, созданном 15 апреля 2014 г., 127412 бит, машинного формата IBM-PC, операционной системы MS-Windows, таким образом, полностью включен посредством ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL) и их композициям, а также полинуклеотидам, кодирующим сконструированные полипептиды фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL). В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL оптимизируют для обеспечения повышенной каталитической активности, а также сниженной чувствительности к протеолизу и повышенной устойчивости к кислым уровням pH. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL являются деиммунизированными. Изобретение также относится к использованию композиций, содержащих сконструированные полипептиды PAL, в терапевтических и промышленных целях.

Уровень техники, предшествующий изобретению

Фенилаланин-аммиак-лиаза PAL наряду с гистидин-аммиак-лиазой (HAL) и тирозин-аммиак-лиазой (TAL) являются представителями семейства лиаз ароматических аминокислот (EC 4.3.1.23-1.25 и 4.3.1.3). Более конкретно ферменты, обладающие активностью PAL (EC 4.3.1.23-1.25 и ранее классифицированные как EC 4.3.1.5), катализируют неокислительное дезаминирование L-фенилаланина в (E)-коричную кислоту. PAL представляет собой не принадлежащий млекопитающим фермент, который широко распространен у растений, а также его идентифицировали в грибах и в ограниченном числе бактерий. Ферменты PAL можно использовать в качестве терапевтического белка для лечения нарушения обмена веществ, фенилкетонурии (PKU). PKU представляет собой аутосомальное метаболическое генетическое нарушение, при котором фермент печени фенилаланингидроксилаза (PAH) или один или более ферментов, участвующих в синтезе или кругообороте кофактора тетрагидробиоптерина, является нефункциональным вследствие мутации в одном из соответствующих генов. Такой недостаток функциональности приводит к высоким уровням фенилаланина в кровотоке. Фенилаланин преобразуется в фенилпироват (фенилкетон) и другие производные. У людей, если не проводят лечение PKU на ранней стадии, высокие уровни фенилаланина и некоторых его продуктов распада могут вызывать серьезные медицинские проблемы, включая умственную отсталость, микроцефалию и судороги. Многие исследования были посвящены использованию PAL для лечения PKU путем замены ферментов (Ambrus et al., Science, 201:837-839 [1978]; Bourget et al., Appl. Biochem. Biotechnol., 10:57-59 [1984] и Sarkissian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:2339-2344 [1999]).

Один из способов нейтрализации фенилаланина в кровяном русле заключается в использовании инъектируемой рекомбинантной PAL и вариантов PAL, модифицированных пегилированием (PEG-PAL). Было продемонстрировано, что пегилирование улучшает время полужизни ферментов и снижает антигенный ответ у индивидуума (см., например, WO 2008/153776, WO 2011/097335 и патент США № 7531341). Варианты PAL, пригодные в композициях PEG-PAL были описаны как варианты *Nostoc punctiforme* (NpPAL); *Anabaena variabilis* (AvPAL) и *Rhodospiridium toruloides* (RtPAL) дикого типа. В частности, были описаны варианты AvPAL дикого типа, в которых остатки цистеина в положениях 64, 318, 503 и 565 заменяли серином (см., например, патенты США № 7790433, 7560263 и 7537923).

Альтернативный путь введения PAL в качестве средства снижения концентрации L-фенилаланина в плазме у индивидуумов с PKU, заключается в неинвазивном составе, такой как пероральный состав (Sarkissian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:2339-2344 [1999]). Главным преимуществом пероральной доставки PAL является снижение воздействия фермента на иммунную систему, таким образом, сведение к минимуму иммунного ответа, который наблюдают при инъектируемом PEG-PAL. Однако основным ограничением для перорального состава PAL является потеря ферментативной активности в желудке и просвете кишечника. Для того чтобы являться эффективной и функциональной, PAL должна являться устойчивой к расщеплению под действием кислых pH и протеаз, таких как трипсин, химотрипсин, карбоксипептидазы и пепсин, которые обычно расщепляют белковую пищу до олигопептидов и аминокислот. В некоторых предшествующих исследованиях (Sarkissian, выше) для получения достоверного эффекта при пероральном введении PAL требовалось большое количество фермента частично вследствие ферментативного расщепления протеазами и частично вследствие относительно низкой специфической активности при pH 7,0. Исследовали различные средства для подавления расщепления PAL при пищеварении (Kim et al., Molec. Therap., 10:220-224 [2004] и Shah et al., Int. J. Pharmaceut., 356:61-68 [2008]).

Один из подходов повышения эффективности PAL в жестких условиях желудочно-кишечного тракта заключается в предоставлении сконструированных полипептидов PAL, которые являются устойчивы-

ми к естественным тяжелым условиям. Kang et al. использовали сайт-направленный мутагенез участка расщепления химотрипсина и пегилирование поверхностных лизинов AvPAL для снижения протеолитической инактивации (см., Kang et al., *Mol. Gen. Metabol.*, 99:4-9 [2010]). В этих исследованиях десять участков расщепления подвергали конкретным мутациям и все, кроме двух таких получаемых мутантов (F18A и R94G) теряли более 50% исходной ферментативной активности. Ни один из этих мутантов не обладал повышенной активностью, а для мутанта F18A демонстрировали незначительное увеличение устойчивости к трипсину (Kang et al., выше). Дополнительные исследования PAL, несмотря на то, что являлись эффективными, как правило, не приводили к более устойчивому ферменту. Таким образом, пероральное введение ранее описанных мутантов PAL и их производных не приводит к эффективному лечению PKU.

Несмотря на успехи, достигнутые с различными составами PAL, все еще сохраняется потребность в полипептидах PAL, обладающих улучшенными свойствами для перорального введения. Эти улучшенные свойства включают без ограничения большее время полужизни, повышенную каталитическую активность, улучшенную стабильность в условиях пищеварительного тракта и сниженную агрегацию.

В дополнение к терапевтическим применениям ферменты PAL также можно использовать в промышленном синтезе L-фенилаланина и других замещенных производных L-фенилаланина. В дальнейшем такие производные можно использовать в качестве фармацевтических предшественников (Gloge et al., *Chem.*, 6: 3386-3390 [2000], Bartsch et al., *Prot. Eng. Des. Sel.*, 23:929-933 [2010] и Turner, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 234-240 [2011]).

Ферменты PAL также можно использовать в сельскохозяйственных применениях. PAL играет значительную роль в биосинтезе фенилпропаноидов (таких как флавоноиды и лигнин) в растениях, грибах и бактериях и может действовать в качестве связанного с защитной системой фермента (Bate et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:7608-7612 [1994]). Модуляция активности PAL путем использования рекомбинантных полипептидов, обладающих активностью PAL, могут потенциально приводить к эффективным гербицидам.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL) и их композициям, а также к полинуклеотидам, кодирующим сконструированные полипептиды фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL). В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL оптимизируют для обеспечения повышенной каталитической активности, а также сниженной чувствительности к протеолизу и повышенной устойчивости к кислым уровням pH. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL являются деиммунизированными. Изобретение также относится к использованию композиций, содержащих сконструированные полипептиды PAL, в терапевтических и промышленных целях. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL) и их биологически активным фрагментам и аналогам, обладающим улучшенными свойствами, таким как повышенная устойчивость к кислому pH и/или сниженная чувствительность к протеолизу.

Настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам PAL и их биологически активным фрагментам и аналогам, обладающим улучшенными свойствами по сравнению с ферментом PAL дикого типа или эталонным полипептидом PAL, по существу, в одних и тех же условиях. Изобретение дополнительно относится к способам использования сконструированных полипептидов PAL и их биологически активных фрагментов и аналогов в терапевтических и/или промышленных композициях и способам использования таких композиций для терапевтических и/или промышленных целей.

В первом аспекте изобретение относится к сконструированным полипептидам фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), где сконструированный полипептид PAL обладает улучшенным свойством, выбранным из группы из i) повышенной каталитической активности, ii) сниженной чувствительности к протеолизу, iii) повышенной устойчивости к кислому pH, iv) сниженной агрегации или комбинации любого из i), ii), iii) или iv) по сравнению с эталонной последовательностью при измерении, по существу, в одних и тех же условиях. В некоторых конкретных вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL обладают двумя улучшенными свойствами. В других конкретных вариантах осуществления улучшенное свойство представляет собой сниженную чувствительность к протеолизу и в еще одних других вариантах осуществления улучшенное свойство представляет собой повышенная устойчивость к кислому pH.

Во втором аспекте сконструированные полипептиды PAL включают белки, обладающие по меньшей мере 85% идентичностью аминокислотных последовательностей с SEQ ID NO: 4 или ее функциональным фрагментом и различием аминокислотных остатков в положении, соответствующем положению X39, X91, X158, X180, X195, X243, X245, X256, X257, X270, X290, X307, X308, X326, X349, X364, X394, X399, X400, X404, X407, X443, X453, X459, X460, X463, X474, X522, X524 и X528 при оптимальном выравнивании с полипептидом SEQ ID NO: 4.

В некоторых конкретных вариантах осуществления первого и второго аспектов сконструированные полипептиды PAL облают по меньшей мере одним различием аминокислотных остатков одного или более положений аминокислотных остатков, соответствующих A39, A91, Y158, S180, K195, T243, I245,

A256, L257, N270, N290, H307, E308, I326, L349, L364, A394, S399, N400, P404, L407, F443, N453, Y459, T460, T463, N474, K522, T524 и P528 при оптимальном выравнивании с полипептидом SEQ ID NO: 4. В некоторых конкретных вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL обладают по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15 и по меньшей мере 20 различиями аминокислотных остатков в сравнении с эталонным полипептидом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

В других конкретных вариантах осуществления первого и второго аспектов сконструированные полипептиды PAL обладают по меньшей мере 90% (по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 и 99%) идентичностью аминокислотных последовательностей с SEQ ID NO: 4. В еще одних дополнительных конкретных вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL обладают по меньшей мере 90% (по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 и 99%) идентичностью аминокислотных последовательностей с SEQ ID NO: 4 и содержат одну или более следующих замен: A39V, A91V, Y158H, S180A, K195E, T243I/L, I245L, A256G, L257W/A, N270K, N290G, H307G/Q/M, E308Q, I326F, L349M, L364Q, A394V, S399N, N400K, P404A, L407V, F443H, N453G, Y459F, T460G, T463N, N474Q, K522Y/F/N, T524S и P528L.

В других конкретных вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL получают из PAL дикого типа *Anabaena variabilis* (таких как ATCC29413; эталонная последовательность белка NCBI YP_324488.1, SEQ ID NO: 4).

В третьем аспекте сконструированные полипептиды, обладающие активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), предусматриваемые изобретением, содержат аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 10 или ее функциональным фрагментом.

В четвертом аспекте сконструированные полипептиды, обладающие активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), предусматриваемые изобретением, содержат аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 10, или ее функциональным фрагментом и дополнительно обладающую различием аминокислотных остатков по сравнению с SEQ ID NO: 10 в одном, двух, трех, четырех, пяти, шести или более положениях аминокислот.

В пятом аспекте изобретение относится к полинуклеотидной последовательности, кодирующей любой из сконструированных полипептидов PAL, как описано в настоящем описании.

В шестом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции или промышленной композиции, содержащей любой из сконструированных полипептидов PAL, как описано в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам, обладающим активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), а) содержащим аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 4 или ее функциональным фрагментом; б) обладающих различием аминокислотных остатков по сравнению с SEQ ID NO: 4 или ее функциональным фрагментом в одном или более положениях аминокислот, и с) которые обладают улучшенным свойством, выбранным из i) повышенной каталитической активности, ii) сниженной чувствительности к протеолизу, iii) повышенной устойчивости к кислому pH, iv) сниженной агрегации или комбинаций любого из i), ii), iii) или iv), по сравнению с эталонной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления одно или более положений аминокислот выбраны из X39, X54, X59, X73, X91, X158, X112, X134, X180, X195, X240, X243, X245, X256, X257, X270, X290, X304, X305, X307, X308, X326, X349, X353, X364, X394, X399, X400, X404, X407, X443, X453, X459, X460, X463, X474, X509, X521, X522, X524, X528, X546, X564 и/или их сочетаний при оптимальном выравнивании с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4. В некоторых дополнительных вариантах осуществления улучшенное свойство выбрано из сниженной чувствительности к протеолизу и/или повышенной устойчивости к кислому pH. В дополнительных вариантах осуществления эталонная последовательность представляет собой PAL дикого типа, получаемый из *Anabaena variabilis*. В некоторых дополнительных вариантах осуществления аминокислотный остаток эталонной последовательности SEQ ID NO: 4 соответствует A39, T54, G59, S73, A91, Y158, S180, K195, A112, R134, Q240, T243, I245, A256, L257, N270, N290, Y304, R305, H307, E308, I326, L349, D353, L364, A394, S399, N400, P404, L407, F443, N453, Y459, T460, T463, N474, E509, Q521, K522, T524, P528, S546 и/или P564. В некоторых вариантах осуществления различие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 4 выбрано из одной или более следующих замен: A39V, T54K, G59R, S73K, A112C, R134Q, A91V, Y158H, S180A, K195E, Q240R/W, T243I/L, I245L, A256G, L257W/A, N270K, N290G, Y304H, R305M, H307G/Q/M, E308Q, I326F, L349M, D353A/N, L364Q, A394V, S399N, N400K, P404A, L407V, F443H, N453G, Y459F, T460G, T463N, N474Q, E509L, Q521K/S, K522Y/F/N, T524S, P528L, S546R и P564G/L/M при оптимальном выравнивании с полипептидом SEQ ID NO: 4. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полипептид обладает по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизи-

В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированные полипептиды, обладающие активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), содержат аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12 и/или 14 или ее функциональным фрагментом.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированные полипептиды, обладающие активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), содержат аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12 и/или 14 или ее функциональным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды, обладающие активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), содержат аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12 и/или 14 или ее функциональным фрагментом. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированные полипептиды, обладающие активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), содержат аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12 и/или 14 или ее функциональным фрагментом.

- 4 -

дающую по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или по меньшей мере приблизительно 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4 или ее функциональным фрагментом, где сконструированный полипептид является деиммунизированным. Настоящее изобретение также относится к сконструированным полипептидам, обладающим активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), содержащим аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4 или ее функциональным фрагментом, где сконструированный полипептид является деиммунизированным. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды, обладающие активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), содержат аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4 или ее функциональным фрагментом, где сконструированный полипептид является деиммунизированным. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полипептид, обладающий активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), представляет собой вариант PAL, приведенный в любой из табл. с 9-1 по 9-7. В некоторых вариантах осуществления деиммунизированный сконструированный полипептид, обладающий активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12 и/или 14.

Настоящее изобретение также относится к полинуклеотидным последовательностям, кодирующим сконструированные полипептиды, обладающие активностью PAL, представленной в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность является функционально связанной с контролирующей последовательностью. Настоящее изобретение дополнительно относится к векторам, содержащим по меньшей мере одну полинуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере неконструируемый полипептид, обладающий активностью PAL. Настоящее изобретение также относится к клеткам-хозяевам, трансформируемым по меньшей мере одной полинуклеотидной последовательностью, кодирующей сконструированный полипептид, обладающий активностью PAL, как предоставлено в настоящем описании.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способам продукции сконструированного полипептида PAL в клетке-хозяине, включающим культивирование клетки-хозяина, содержащей по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один сконструированный полипептид PAL, в подходящих условиях культивирования. Настоящее изобретение дополнительно относится к способам продукции сконструированного полипептида PAL в клетке-хозяине, включающим культивирование клетки-хозяина, содержащей полинуклеотид, кодирующий сконструированный полипептид PAL в подходящих условиях культивирования. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают выделения сконструированного полипептида PAL из культуры и/или клеток-хозяев.

Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим по меньшей мере один сконструированный полипептид, обладающий активностью PAL, как предоставлено в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой фармацевтическую композицию, дополнительно содержащую фармацевтически приемлемый носитель. Настоящее изобретение дополнительно относится к видам использования таких композиций.

Настоящее изобретение также относится к сконструированным полипептидам, обладающим активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), содержащим: а) аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 86%, по меньшей мере приблизительно 87%, по меньшей мере приблизительно 88%, по меньшей мере приблизительно 89%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или большей идентичностью последовательности с эталонной последовательностью, обладающей активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), или ее функциональным фрагментом; b) полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере одним различием аминокислотного остатка по сравнению с эталонной последовательностью, обладающей активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), или ее функциональным фрагментом в одном или более положений аминокислот, и c) которые обладают улучшенным свойством, выбранным из i) повышенной каталитической активности, ii) сниженной чувствительности к протеолизу, iii) повышенной устойчивости к кислому pH, iv) сниженной агрегации, v) сниженной иммуногенности или сочетания любых из i), ii), iii), iv) или v) по сравнению с эталонной последовательностью, обладающей активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL). В некоторых вариантах осуществления эталонная последовательность представляет собой прокариотическую PAL, при этом в

некоторых других вариантах осуществления эталонная последовательность представляет собой эукариотическую PAL. В некоторых вариантах осуществления эталонная последовательность представляет собой бактериальную PAL (например, PAL *Anabaena variabilis*), при этом в некоторых других вариантах осуществления он представляет собой PAL человека или другую PAL. В некоторых дополнительных вариантах осуществления эталонная последовательность представляет собой последовательность дикого типа (например, PAL дикого типа *A. variabilis*), при этом в некоторых альтернативных вариантах осуществления эталонная последовательность представляет собой вариант фермента (например, сконструированный полипептид, обладающий активностью PAL).

В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды, обладающие активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), по настоящему изобретению содержат: а) аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 86%, по меньшей мере приблизительно 87%, по меньшей мере приблизительно 88%, по меньшей мере приблизительно 89%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или большей идентичностью последовательности с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 4 или ее функциональным фрагментом; б) полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере одним различием аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 4 или ее функциональным фрагментом в одном или более положений аминокислот, и с) которые обладают улучшенным свойством, выбранным из i) повышенной каталитической активности, ii) сниженной чувствительности к протеолизу, iii) повышенной устойчивости к кислому pH, iv) сниженной агрегации, v) сниженной иммуногенности или сочетания любых из i), ii), iii), iv) или v) по сравнению с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 4.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированные полипептиды, обладающие активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), содержат: а) аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или большей идентичностью последовательности с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 4, или ее функциональный фрагмент; б) полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере одним различием аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 4 или ее функциональным фрагментом в одном или более положений аминокислот; и с) которые обладают улучшенным свойством, выбранным из i) повышенной каталитической активности, ii) сниженной чувствительности к протеолизу, iii) повышенной устойчивости к кислому pH, iv) сниженной агрегации, v) сниженной иммуногенности или сочетания любых из i), ii), iii), iv) или v), по сравнению с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды, обладающие активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), содержат по меньшей мере одну замену(ы) в одном или более из следующих положений аминокислот: 20, 24, 27, 39, 43, 45, 47, 54, 58, 59, 62, 70, 73, 80, 82, 91, 94, 98, 104, 105, 110, 112, 115, 117, 118, 119, 121, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 133, 134, 135, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 149, 150, 151, 153, 154, 156, 157, 158, 159, 172, 174, 175, 176, 177, 178, 180, 187, 191, 195, 199, 205, 206, 210, 212, 213, 214, 232, 240, 243, 245, 247, 248, 250, 256, 257, 266, 270, 275, 278, 279, 285, 286, 289, 290, 292, 304, 305, 307, 308, 309, 319, 321, 326, 331, 332, 334, 349, 353, 355, 364, 365, 369, 370, 371, 372, 374, 375, 377, 378, 379, 381, 382, 383, 384, 385, 387, 389, 394, 396, 399, 400, 403, 404, 407, 417, 418, 425, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 443, 446, 447, 453, 456, 459, 460, 461, 463, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 482, 483, 503, 507, 509, 521, 522, 524, 525, 528, 538, 546, 547, 551, 558, 560, 564, 565 и/или любых их сочетаниях, где положения аминокислот нумеруют со ссылкой на SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотный остаток эталонной последовательности SEQ ID NO: 4 соответствует A39, T54, G59, S73, A91, Y158, S180, K195, A112, R134, Q240, T243, I245, A256, L257, N270, N290, Y304, R305, H307, E308, I326, L349, D353, L364, A394, S399, N400, P404, L407, F443, N453, Y459, T460, T463, N474, E509, Q521, K522, T524, P528, S546 и/или P564. В некоторых дополнительных вариантах осуществления различие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 4 выбрано из одной или более следующих замен: A39V, T54K, G59R, S73K, A112C, R134Q, A91V, Y158H, S180A, K195E, Q240R/W, T243I/L, I245L, A256G, L257W/A, N270K, N290G, Y304H, R305M, H307G/Q/M, E308Q, I326F, L349M, D353A/N, L364Q, A394V, S399N, N400K, P404A, L407V, F443H, N453G, Y459F, T460G, T463N, N474Q, E509L, Q521K/S, K522Y/F/N, T524S, P528L, S546R и P564G/L/M, при оптимальном выравнивании с полипептидом SEQ ID NO: 4. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полипептид обладает по меньшей мере приблизительно 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4 и различием аминокислотного остатка в положении H307. В некоторых вариантах осуществления различие аминокислотного остатка представляет собой

H307G/Q/M. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления различие аминокислотного остатка выбрано из комбинации одного или более A39, A91, Q240, A256, N290, Y304, R305, H307, D353, A394, S399, P404, L407, Q521, K522 и T524.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления улучшенное свойство сконструированных полипептидов, обладающих активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), выбрано из сниженной чувствительности к протеолизу и/или повышенной устойчивости к кислому pH.

Настоящее изобретение также относится к сконструированным полипептидам, обладающим активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), содержащим: а) аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 86%, по меньшей мере приблизительно 87%, по меньшей мере приблизительно 88%, по меньшей мере приблизительно 89%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или большей идентичностью последовательности с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 10 или ее функциональным фрагментом; б) полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере одним различием аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 10 или ее функциональным фрагментом в одном или более положений аминокислот, и с) которые обладают улучшенным свойством, выбранным из i) повышенной каталитической активности, ii) сниженной чувствительности к протеолизу, iii) повышенной устойчивости к кислому pH, iv) сниженной агрегации, v) сниженной иммуногенности или сочетания любых из i), ii), iii), iv) или v), по сравнению с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к сконструированным полипептидам, обладающим активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), содержащим: а) аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или большей идентичностью последовательности с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 10 или ее функциональным фрагментом; б) полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере одним различием аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 10 или ее функциональным фрагментом в одном или более положений аминокислот, и с) которые обладают улучшенным свойством, выбранным из i) повышенной каталитической активности, ii) сниженной чувствительности к протеолизу, iii) повышенной устойчивости к кислому pH, iv) сниженной агрегации, v) сниженной иммуногенности или сочетания любых из i), ii), iii), iv) или v), по сравнению с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к сконструированным полипептидам, обладающим активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), содержащим: а) аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 10 или ее функциональным фрагментом; б) полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере одним различием аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 10 или ее функциональным фрагментом в одном или более положений аминокислот; и с) которые обладают улучшенным свойством, выбранным из i) повышенной каталитической активности, ii) сниженной чувствительности к протеолизу, iii) повышенной устойчивости к кислому pH, iv) сниженной агрегации, v) сниженной иммуногенности или сочетания любых из i), ii), iii), iv) или v), по сравнению с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к сконструированным полипептидам, обладающим активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), содержащим аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 10 и по меньшей мере одним различием аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 10, и которая обладает по меньшей мере одним улучшенным свойством, выбранным из повышенной каталитической активности, сниженной чувствительности к протеолизу, повышенной устойчивости к кислому pH, сниженной агрегации и/или сниженной иммуногенности по сравнению с SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к сконструированным полипептидам, обладающим активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), где различие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 10 выбрано из одной или более следующих ниже замен или серии замен:

I27E/V39A; I27E/V39A/R43L/V105C/A153R/L214E/P266H/L278D/C503Q;
I27E/V39A/R43L/L214E/A547D;
I27E/V39A/V105C/A112C/R134Q/L214E/L278D/C503Q/A547D/C565N;
I27E/V39A/V105C/A112C/R134Q/A153R/Q205T/L214E/P266H/L278D/C503Q/
A551D; I27E/V39A/V105C/A112C/Q205T/P210C/P266H/C503Q/A547D;
I27E/V39A/V105C/A112C/Q205T/P266H/I285E/C503Q/A551D;
I27E/V39A/V105C/A112C/L214E/I285E/C503Q/A547D;
I27E/V39A/V105C/S131N/R134Q/Q205T/L214E/C503Q/A547D/C565N;
I27E/V39A/V105C/R134Q/A153R/P210C/L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D;
I27E/V39A/V105C/R134Q/Q205T/P210C/L278D/C503Q/A547D;
I27E/V39A/V105C/R134Q/Q205T/L214E;
I27E/V39A/V105C/R134Q/Q205T/L214E/A551D/C565N;
I27E/V39A/V105C/R134Q/Q205T/L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N;
I27E/V39A/V105C/R134Q/P210C; I27E/V39A/V105C/R134Q/P210C/L214E;
I27E/V39A/V105C/R134Q/P210C/L214E/I285E/A547D;
I27E/V39A/V105C/R134Q/P210C/L214E/C503Q/A551D/C565N;
I27E/V39A/V105C/R134Q/L214E/L278D/A547D/A551D;
I27E/V39A/V105C/R134Q/L214E/I285E/C503Q/A547D/A551D;
I27E/V39A/V105C/R134Q/P266H/C503Q;
I27E/V39A/V105C/R134Q/P266H/C503Q/A547D/A551D;
I27E/V39A/V105C/R134Q/L278D/C503Q/C565N;
I27E/V39A/V105C/R134Q/L278D/I285E/C503Q;
I27E/V39A/V105C/R134Q/L278D/A551D;
I27E/V39A/V105C/R134Q/I285E/A547D/A551D;
I27E/V39A/V105C/R134Q/C503Q/A551D;

I27E/V39A/V105C/A153R/Q205T/L278D/C503Q/A547D/A551D;
I27E/V39A/V105C/A153R/L214E; I27E/V39A/V105C/A153R/I285E;
I27E/V39A/V105C/A153R/C503Q/A547D/C565N;
I27E/V39A/V105C/A153R/A551D/C565N;
I27E/V39A/V105C/Q205T/P210C/L214E/L278D/A547D;
I27E/V39A/V105C/Q205T/P210C/L278D/C503Q;
I27E/V39A/V105C/Q205T/P210C/L278D/A547D;
I27E/V39A/V105C/Q205T/L214E/L278D/C503Q/A547D;
I27E/V39A/V105C/Q205T/L278D/C503Q/A547D;
I27E/V39A/V105C/P210C/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N;
I27E/V39A/V105C/P210C/L214E/P266H/L278D;
I27E/V39A/V105C/L214E/P266H/C503Q/A547D/C565N;
I27E/V39A/V105C/L214E/L278D/L309P/C503Q/A547D/A551D;
I27E/V39A/V105C/L278D/C503Q/A547D/C565N;
I27E/V39A/V105C/I285E/A547D; I27E/V39A/V105C/C503Q/A551D;
I27E/V39A/V105C/C503Q/A547D/A551D/C565N;
I27E/V39A/A112C/R134Q/Q205T/P210C/L214E/A551D/C565N;
I27E/V39A/A112C/R134Q/L214E/P266H/A551D;
I27E/V39A/A112C/R134Q/L214E/C503Q/A547D;
I27E/V39A/A112C/R134Q/P266H/I285E;
I27E/V39A/A112C/Q205T/L214E/P266H/C503Q/A551D/C565N;
I27E/V39A/A112C/Q205T/L278D/I285E; I27E/V39A/A112C/L214E;
I27E/V39A/A112C/L214E/L278D/C503Q/A547D/A551D;
I27E/V39A/A112C/I285E; I27E/V39A/A112C/A547D; I27E/V39A/R134Q;
I27E/V39A/R134Q/A153R/Q205T/L214E/P266H/C503Q;
I27E/V39A/R134Q/A153R/P210C/L214E/L278D/I285E/A547D/C565N;
I27E/V39A/R134Q/A153R/L214E/P266H/L278D/C503Q/A547D/C565N;
I27E/V39A/R134Q/A153G/L214E/P266H/I285E/C503Q/A551D/C565N;
I27E/V39A/R134Q/A153R/L214E/C503Q/A547D;
I27E/V39A/R134Q/A153R/L278D;
I27E/V39A/R134Q/A153R/L278D/A547D/A551D;
I27E/V39A/R134Q/A153R/A547D;
I27E/V39A/R134Q/Q205T/L214E/P266H/I285E/C503Q/A551D/C565N;
I27E/V39A/R134Q/Q205T/P266H/C503Q/A551D/C565N;
I27E/V39A/R134Q/P210C/L214E/C503Q;
I27E/V39A/R134Q/P210C/C503Q/A551D;

I27E/V39A/R134Q/L214E/P266H/A551D;
I27E/V39A/R134Q/L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D;
I27E/V39A/R134Q/L278D/C503Q/A547D; I27E/V39A/R134Q/C503Q/A547D;
I27E/V39A/R134Q/A547D/C565N; I27E/V39A/Q205T/L214E/C503Q/C565N;
I27E/V39A/Q205T/P266H/I285E/A547D/A551D/C565N;
I27E/V39A/Q205T/P266H/A551D;
I27E/V39A/Q205T/L278D/C503Q/A551D/C565N;
I27E/V39A/Q205T/L278D/C503Q/C565N;
I27E/V39A/Q205T/C503Q/A547D/C565N; I27E/V39A/P210C/T212S;
I27E/V39A/P210C/L214E/L278D/C503Q/A551D;
I27E/V39A/P210C/L214E/I285E/C503Q/A551D;
I27E/V39A/P210C/P266H/I285E/C503Q/A547D;
I27E/V39A/P210C/P266H/C503Q/A551D; I27E/V39A/L214E;
I27E/V39A/L214E/P266H/L278D/C503Q/A547D/A551D/C565N;
I27E/V39A/L214E/L278D/C503Q;
I27E/V39A/L214E/L278D/C503Q/A547D/C565N;
I27E/V39A/L214E/C503Q/A551D; I27E/V39A/P266H;
I27E/V39A/P266H/L278D; I27E/V39A/L278D; I27E/V39A/L278D/A547D;
I27E/V39A/L278D/I285E/C503Q/A547D; I27E/V39A/L278D/C503Q/C565N;
I27E/V39A/C503Q; I27E/G45D/Q205T/P266H/C565N; I27E/V105C;
I27E/V105C/R134Q/A153R/P210C/L214E/C503Q/A547D;
I27E/V105C/R134Q/A153R/I285E/A547D;
I27E/V105C/R134Q/A153R/C503Q;
I27E/V105C/R134Q/Q205T/P210C/C503Q;
I27E/V105C/R134Q/Q205T/L214E/P266H/L278D/C503Q/C565N;
I27E/V105C/Q205T/P266H/C503Q;
I27E/V105C/R134Q/P210C/L214E/P266H/L278D/A551D/C565N;
I27E/V105C/R134Q/P210C/L214E/C503Q/A551D/C565N;
I27E/V105C/R134Q/P210C/P266H/L278D/I285E/C503Q/A551D/C565N;
I27E/V105C/R134Q/L214E/L278D/C503Q/A547D;
I27E/V105C/R134Q/L214E/L278D/C503Q/A547D/A551D/C565N;
I27E/V105C/Q205T; I27E/V105C/Q205T/L214E/P266H;
I27E/V105C/Q205T/L214E/P266H/A551D/C565N;
I27E/V105C/Q205T/L214E/L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N;
I27E/V105C/Q205T/C503Q/A547D/A551D/C565N; I27E/V105C/L214E;
I27E/V105C/L214E/P266H/C503Q;

I27E/V105C/L214E/I285E/A551D/C565N;
 I27E/V105C/L214E/A547D/A551D/C565N;
 I27E/V105C/L214E/A551D/C565N; I27E/V105C/P266H;
 I27E/V105C/P266H/I285E/C503Q/A547D/C565N;
 I27E/V105C/L278D/A547D;
 I27E/V105C/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N;
 I27E/V105C/C503Q/A547D/C565N;
 I27E/V105C/C503Q/A547D/A551D/C565N;
 I27E/A112C/R134Q/A153R/L214E/P266H/C503Q;
 I27E/A112C/R134Q/L278D/I285E/C503Q/A551D/C565N;
 I27E/A112C/R134Q/Q205T/L278D/C503Q;
 I27E/A112C/R134Q/Q205T/I285E/C503Q;
 I27E/A112C/Q205T/P266H/L278D/I285E/C503Q;
 I27E/A112C/P210C/L214E/C503Q/A547D; I27E/R134Q;
 I27E/R134Q/A153R/I285E/C503Q/A547D;
 I27E/R134Q/Q205T/I285E/C503Q/A551D;
 I27E/R134Q/Q205T/P266H/L278D/A547D; I27E/R134Q/P210C;
 I27E/R134Q/L214E/C503Q; I27E/R134Q/L214E/C503Q/A547D;
 I27E/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D;
 I27E/R134Q/L214E/C503Q/C565N;
 I27E/R134Q/L278D/I285E/A551D/C565N; I27E/R134Q/I285E/C503Q;
 I27E/A153R/L214E/L278D/I285E/A551D/C565N;
 I27E/A153R/L214E/L278D/A551D; I27E/Q205T;
 I27E/Q205T/L214E/L278D/I285E/C503Q/C565N;
 I27E/Q205T/L214E/C503Q/A547D/C565N;
 I27E/Q205T/P266H/L278D/I285E/A551D/C565N;
 I27E/Q205T/L278D/A551D; I27E/P210C;
 I27E/P210C/L214E/C503Q/A547D; I27E/P210C/L278D/C503Q;
 I27E/P210C/C503Q; I27E/P210C/C503Q/C565N; I27E/P210C/A551D;
 I27E/L214E; I27E/L214E/P266H/L278D/I285E/A551D;
 I27E/L214E/L278D; I27E/L214E/L278D/C503Q; I27E/L214E/C503Q;
 I27E/L214E/C503Q/A547D; I27E/L214E/C503Q/A547D/C565N;
 I27E/L214E/A551D; I27E/P266H/L278D/C503Q;
 I27E/P266H/A547D/A551D; I27E/L278D/C503Q/A551D;
 I27E/L278D/C503Q/A551D/C565N; I27E/A547D/C565N;
 V39A/G45S/L278D/C503Q/A551D; V39A/V105C/R134Q/A153R/Q205T/A551D;

V39A/V105C/R134Q/P210C/L214E/A551D;
 V39A/V105C/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D;
 V39A/V105C/A153R/P266H/A547D/A551D; V39A/V105C/Q205T/C503Q;
 V39A/V105C/Q205T/A551D; V39A/V105C/P210C/A547D;
 V39A/V105C/L214E/P266H/A547D/C565N;
 V39A/V105C/L214E/I285E/C503Q/A551D/C565N;
 V39A/A112C/R134Q/Q205T/L214E/L278D;
 V39A/A112C/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D;
 V39A/A112C/A153R/Q205T/L278D/C503Q/A547D; V39A/R134Q;
 V39A/R134Q/Q205T/L214E/C503Q/C565N;
 V39A/R134Q/P210C/L214E/A547D/C565N; V39A/A153R/C503Q/A547D;
 V39A/Q205T/L278D/A547D/A551D;
 V39A/P210C/L214E/L278D/I285E/C503Q/A551D; V39A/P266H;
 V39A/P275R/L278D/C503Q/A551D; V39A/C503Q;
 V39A/C503Q/A551D/C565N; V105C;
 V105C/A112C/R134Q/Q205T/L214E/Y492H/C503Q/A547D;
 V105C/R134Q/A153R/Q205T/L214E/C503Q;
 V105C/R134Q/Q205T/L214E/A547D; V105C/R134Q/Q205T/P266H/L278D;
 V105C/R134Q/L214E/P266H/I285E/C503Q/A551D/C565N;
 V105C/R134Q/L214E/L278D/C565N; V105C/R134Q/L214E/C503Q/A547D;
 V105C/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D; V105C/R134Q/C503Q;
 V105C/R134Q/C503Q/A547D; V105C/R134Q/C503Q/A547D/C565N;
 V105C/A153R/Q205T/L214E/P266H/C503Q/A547D;
 V105C/A153R/Q205T/P266H/I285E/A547D/C565N;
 V105C/Q205T/P210C/L214E/C503Q/A547D; V105C/Q205T/L214E/L278D;
 V105C/Q205T/L214E/C503Q/A547D/A551D/C565N;
 V105C/Q205T/C503Q/A551D; V105C/L214E/P266H/L278D/A547D;
 V105C/L214E/L278D/C503Q/A547D/A551D; V105C/L214E/I285E;
 V105C/L214E/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N;
 V105C/L214E/I285E/A547D/C565N; V105C/L278D/C503Q/A551D;
 V105C/I285E; V105C/I285E/A547D; V105C/C503Q; V105C/A547D/A551D;
 A112C/R134Q/A153R/L214E/L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N;
 A112C/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D/C565N; A112C/L214E/L278D;
 A112C/L278D/C503Q/A547D;
 R134Q/Q205T/L214E/I285E/C503Q/A551D/C565N; R134Q/Q205T/C503Q;
 R134Q/P210C/L214E/L278D/C503Q/A547D/C565N;
 R134Q/P210C/L214E/C503Q/A547D/A551D; R134Q/L214E;
 R134Q/L214E/L278D/C503Q; R134Q/L214E/L278D/C503Q/A551D;
 R134Q/L214E/I285E/C503Q; R134Q/C503Q; R134Q/C503Q/A547D/A551D;
 A153R; Q205T/L214E/I285E/C503Q/A551D;
 Q205T/L214E/I285E/C503Q/C565N; Q205T/L214E/C503Q/A547D/C565N;
 Q205T/L278D/I285E/A547D/A551D; P210C/L214E; P210C/L214E/P266H;
 L214E/P266H; L214E/P266H/C503Q/A547D/A551D/C565N;
 L214E/C503Q/A547D; L214E/A547D; P266H/L278D/C503Q; P266H/C565N;
 L278D/A547D; C503Q; C503Q/A547D; C503Q/A547D/A551D/C565N;
 C503Q/A547D/C565N; C503Q/A551D; C503Q/A551D/C565N; A547D и/или
 C565N.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к сконструированным полипептидам, обладающим активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), где различие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 10 выбрано из одной или более следую-

щих ниже замен или серии замен:

V80I/R134C/P564Q; V121C; A123G; A124G; M125L;
L126I/T; L126M/R134L; L127A; A129G/L; N130Q; N130C/M370I R134W;
M133R; R134I; R134N/G307C; G135C/S и/или G135A/A394E.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к сконструированным полипептидам, обладающим активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), где различие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 10 выбрано из одной или более следующих ниже замен или серии замен:

G20S/I144L; R43S; L47M/I144L; L47M/R146E;
L47M/M147G/A383E; L47M/P157C; Q58H/L143V; Q58K/P157D/G369C;
A62S/M147V; S82I/G135C/P157F/W279L; R94C/I149E; T110I/I139R;
L118M/L141H; A119E/T156H/A289D; I139M/V; R140D/G/M; R140N/A199E;
R140E/A334S/A551D; L141K/Q/P/T; E142H/P/V; E142D/G371D; L143F/M;
I144L/N/V; K145N/Q/R; K145G/P157T; R146H/L; R146W/D191Y; M147A;
I149L/R; F150K/L/M; L151M; A153C/G; A153S/H250N; G154R;
G154Y/L174M/Q321K/S456I/G483C; T156K/G483C; P157D/F/H/Y; Y158E;
V159C/H/L/M; M247I; L319M и/или Q389K.

В еще одних некоторых дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к сконструированным полипептидам, обладающим активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), где различие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 10 выбрано из одной или более следующих ниже замен или серии замен:

P117T/Y176Q; V172I/C/L;
L174M; S175G; Y176E/I/M/R/V; I177M/V; T178L/A477S и/или S180C/T.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к сконструированным полипептидам, обладающим активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), где различие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 10 выбрано из одной или более следующих ниже замен или серии замен:

R43S/H374K; R43S/H374R; A112S/M370A/A507E;
M147I/H374S; S187R/L381V; D191Y/H385N; A232S; Q240K/H374R;
A256S/L381N; P275Q/M370S; P275T/H374R; Q332K/Y377M; A334S/H374V;
L349M; Q355K/H374S; M370G/I/S; G371H/N/Q/S; M372A/V;
H374A/D/G/L/N/R/S/T; H374Q/P396Q; H374R/G417C; L375I; L375M;
Y377C/I/N; Y378C/D/E/I/L/N/S; Y378F/P404Q; I379C/H/L/M/N;
L381G/V; L381M/Q560K; L382C/H/I/M/S; A383S/V; K384R; H385C/G/N;
H385M/P403H; H385S/P403H; D387S; L418M; G425V; A447S; S461G
и/или S525L.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к сконструированным полипептидам, обладающим активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), где различие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 10 выбрано из одной или более следующих ниже замен или серии замен:

A24S/F434M; A62S/T433N; S98I; L213M/S438L;
Q240K/T433Y; S286R/Y435T; A289S/L431E; S331I; L431C/E/G/P/S/V;
L432C/V; T433A/I/L/N/P/Q/R/S/V/W; F434C; Y435L; Y435Q/H446N;
G436M; G436D/T; N437E/G/Q; N437T/L538M; S438C/F/M/R/T;
I439C/F/L/V и/или A477S.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к сконструированным полипептидам, обладающим активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), где различие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 10 выбрано из одной или более следующих ниже замен или серии замен:

A24E; Q58R/Y475H; A70S/N474E; L104M/V476L;
A119E/G365A; L206M; P275Q; G276V; Q292H/A479G; Q355H/I478C;
P404T/A477V; I471F/G/K/M/N/R/V/W; F472G; Q473H/K/M/R/S;
Q473H/A507S; N474A/H/R/W; N474D/R490H; Y475C/F/L/Q; V476C/I/L;
I478N/S; A479G/S; F482C/L; G483C/H/S; G483A/S524I; G483R/G537C
и/или A558S.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к сконструированным полипептидам, обладающим активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), где различие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 10 выбрано из одной или более следующих ниже замен или серии замен:

	V39A/K115E/M133R/C565N;
V39A/M133R/F472G/C503Q/C565N;	V39A/M133R/F472G/C565N;
V39A/M133R/C503Q;	V39A/M133R/C503Q/C565N;
V39A/M147A/Y378E/C503Q/C565N;	V39A/M147A/Y378E/C565N;
V39A/M147A/L381G/F472G/C503Q/C565N;	
V39A/M147A/L381G/C503Q/C565N;	V39A/M147A/F472G/C503Q/C565N;
V39A/M147A/F472G/C565N;	V39A/M147A/C565N;
V39A/G248C/L381G/F472G/C503Q/C565N;	V39A/Y378E/C503Q/C565N;
V39A/Y378E/C565N;	V39A/L381G;
	V39A/F472G/C503Q/C565N;
V39A/C503Q/C565N;	M133R/L381G/C565N;
	M133R/C503Q;
	Y378D/C503Q;
Y378E/F472G/C503Q/C565N;	L381G/F472G/C503Q/C565N
	и/или
F472G/C503Q/C565N.	

В еще одних других некоторых дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к сконструированным полипептидам, обладающим активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), где различие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 10 выбрано из одной или более следующих ниже замен или серии замен:

I27E/V39A;

I27E/V39A/R43L/V105C/A153R/L214E/P266H/L278D/C503Q;

I27E/V39A/R43L/L214E/A547D;

I27E/V39A/V105C/A112C/R134Q/L214E/L278D/C503Q/A547D/C565N;

I27E/V39A/V105C/A112C/R134Q/A153R/Q205T/L214E/P266H/L278D/C503Q/A551D;

I27E/V39A/V105C/A112C/Q205T/P210C/P266H/C503Q/A547D;

I27E/V39A/V105C/A112C/Q205T/P266H/I285E/C503Q/A551D;

I27E/V39A/V105C/A112C/L214E/I285E/C503Q/A547D;

I27E/V39A/V105C/S131N/R134Q/Q205T/L214E/C503Q/A547D/C565N;

I27E/V39A/V105C/R134Q/A153R/P210C/L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D;

I27E/V39A/V105C/R134Q/Q205T/P210C/L278D/C503Q/A547D;

I27E/V39A/V105C/R134Q/Q205T/L214E;
I27E/V39A/V105C/R134Q/Q205T/L214E/A551D/C565N;
I27E/V39A/V105C/R134Q/Q205T/L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N;
I27E/V39A/V105C/R134Q/P210C; I27E/V39A/V105C/R134Q/P210C/L214E;
I27E/V39A/V105C/R134Q/P210C/L214E/I285E/A547D;
I27E/V39A/V105C/R134Q/P210C/L214E/C503Q/A551D/C565N;
I27E/V39A/V105C/R134Q/L214E/L278D/A547D/A551D;
I27E/V39A/V105C/R134Q/L214E/I285E/C503Q/A547D/A551D;
I27E/V39A/V105C/R134Q/P266H/C503Q;
I27E/V39A/V105C/R134Q/P266H/C503Q/A547D/A551D;
I27E/V39A/V105C/R134Q/L278D/C503Q/C565N;
I27E/V39A/V105C/R134Q/L278D/I285E/C503Q;
I27E/V39A/V105C/R134Q/L278D/A551D;
I27E/V39A/V105C/R134Q/I285E/A547D/A551D;
I27E/V39A/V105C/R134Q/C503Q/A551D;
I27E/V39A/V105C/A153R/Q205T/L278D/C503Q/A547D/A551D;
I27E/V39A/V105C/A153R/L214E; I27E/V39A/V105C/A153R/I285E;
I27E/V39A/V105C/A153R/C503Q/A547D/C565N;
I27E/V39A/V105C/A153R/A551D/C565N;
I27E/V39A/V105C/Q205T/P210C/L214E/L278D/A547D;
I27E/V39A/V105C/Q205T/P210C/L278D/C503Q;
I27E/V39A/V105C/Q205T/P210C/L278D/A547D;
I27E/V39A/V105C/Q205T/L214E/L278D/C503Q/A547D;
I27E/V39A/V105C/Q205T/L278D/C503Q/A547D;
I27E/V39A/V105C/P210C/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N;
I27E/V39A/V105C/P210C/L214E/P266H/L278D;
I27E/V39A/V105C/L214E/P266H/C503Q/A547D/C565N;
I27E/V39A/V105C/L214E/L278D/L309P/C503Q/A547D/A551D;
I27E/V39A/V105C/L278D/C503Q/A547D/C565N;
I27E/V39A/V105C/I285E/A547D; I27E/V39A/V105C/C503Q/A551D;
I27E/V39A/V105C/C503Q/A547D/A551D/C565N;
I27E/V39A/A112C/R134Q/Q205T/P210C/L214E/A551D/C565N;
I27E/V39A/A112C/R134Q/L214E/P266H/A551D;
I27E/V39A/A112C/R134Q/L214E/C503Q/A547D;
I27E/V39A/A112C/R134Q/P266H/I285E;
I27E/V39A/A112C/Q205T/L214E/P266H/C503Q/A551D/C565N;

I27E/V39A/A112C/Q205T/L278D/I285E; I27E/V39A/A112C/L214E;
 I27E/V39A/A112C/L214E/L278D/C503Q/A547D/A551D;
 I27E/V39A/A112C/I285E; I27E/V39A/A112C/A547D; I27E/V39A/R134Q;
 I27E/V39A/R134Q/A153R/Q205T/L214E/P266H/C503Q;
 I27E/V39A/R134Q/A153R/P210C/L214E/L278D/I285E/A547D/C565N;
 I27E/V39A/R134Q/A153R/L214E/P266H/L278D/C503Q/A547D/C565N;
 I27E/V39A/R134Q/A153G/L214E/P266H/I285E/C503Q/ A551D/ C565N;
 I27E/V39A/R134Q/A153R/L214E/C503Q/A547D;
 I27E/V39A/R134Q/A153R/L278D;
 I27E/V39A/R134Q/A153R/L278D/A547D/A551D;
 I27E/V39A/R134Q/A153R/A547D;
 I27E/V39A/R134Q/Q205T/L214E/P266H/I285E/C503Q/A551D/C565N;
 I27E/V39A/R134Q/Q205T/P266H/C503Q/A551D/C565N;
 I27E/V39A/R134Q/P210C/L214E/C503Q;
 I27E/V39A/R134Q/P210C/C503Q/A551D;
 I27E/V39A/R134Q/L214E/P266H/A551D;
 I27E/V39A/R134Q/L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D;
 I27E/V39A/R134Q/L278D/C503Q/A547D; I27E/V39A/R134Q/C503Q/A547D;
 I27E/V39A/R134Q/A547D/C565N; I27E/V39A/Q205T/L214E/C503Q/C565N;
 I27E/V39A/Q205T/P266H/I285E/A547D/A551D/C565N;
 I27E/V39A/Q205T/P266H/A551D;
 I27E/V39A/Q205T/L278D/C503Q/A551D/C565N;
 I27E/V39A/Q205T/L278D/C503Q/C565N;
 I27E/V39A/Q205T/C503Q/A547D/C565N; I27E/V39A/P210C/T212S;
 I27E/V39A/P210C/L214E/L278D/C503Q/A551D;
 I27E/V39A/P210C/L214E/I285E/C503Q/A551D;
 I27E/V39A/P210C/P266H/I285E/C503Q/A547D;
 I27E/V39A/P210C/P266H/C503Q/A551D; I27E/V39A/L214E;
 I27E/V39A/L214E/P266H/L278D/C503Q/A547D/A551D/C565N;
 I27E/V39A/L214E/L278D/C503Q;
 I27E/V39A/L214E/L278D/C503Q/A547D/C565N;
 I27E/V39A/L214E/C503Q/A551D; I27E/V39A/P266H;
 I27E/V39A/P266H/L278D; I27E/V39A/L278D; I27E/V39A/L278D/A547D;
 I27E/V39A/L278D/I285E/C503Q/A547D; I27E/V39A/L278D/C503Q/C565N;
 I27E/V39A/C503Q; I27E/G45D/Q205T/P266H/C565N; I27E/V105C;
 I27E/V105C/R134Q/A153R/P210C/L214E/C503Q/A547D;

I27E/V105C/R134Q/A153R/I285E/A547D;
 I27E/V105C/R134Q/A153R/C503Q;
 I27E/V105C/R134Q/Q205T/P210C/C503Q;
 I27E/V105C/R134Q/Q205T/L214E/P266H/L278D/C503Q/C565N;
 I27E/V105C/Q205T/P266H/C503Q;
 I27E/V105C/R134Q/P210C/L214E/P266H/L278D/A551D/C565N;
 I27E/V105C/R134Q/P210C/L214E/C503Q/A551D/C565N;
 I27E/V105C/R134Q/P210C/P266H/L278D/I285E/C503Q/A551D/C565N;
 I27E/V105C/R134Q/L214E/L278D/C503Q/A547D;
 I27E/V105C/R134Q/L214E/L278D/C503Q/A547D/A551D/C565N;
 I27E/V105C/Q205T; I27E/V105C/Q205T/L214E/P266H;
 I27E/V105C/Q205T/L214E/P266H/A551D/C565N;
 I27E/V105C/Q205T/L214E/L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N;
 I27E/V105C/Q205T/C503Q/A547D/A551D/C565N; I27E/V105C/L214E;
 I27E/V105C/L214E/P266H/C503Q;
 I27E/V105C/L214E/I285E/A551D/C565N;
 I27E/V105C/L214E/A547D/A551D/C565N;
 I27E/V105C/L214E/A551D/C565N; I27E/V105C/P266H;
 I27E/V105C/P266H/I285E/C503Q/A547D/C565N;
 I27E/V105C/L278D/A547D;
 I27E/V105C/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N;
 I27E/V105C/C503Q/A547D/C565N;
 I27E/V105C/C503Q/A547D/A551D/C565N;
 I27E/A112C/R134Q/A153R/L214E/P266H/C503Q;
 I27E/A112C/R134Q/L278D/I285E/C503Q/A551D/C565N;
 I27E/A112C/R134Q/Q205T/L278D/C503Q;
 I27E/A112C/R134Q/Q205T/I285E/C503Q;
 I27E/A112C/Q205T/P266H/L278D/I285E/C503Q;
 I27E/A112C/P210C/L214E/C503Q/A547D; I27E/R134Q;
 I27E/R134Q/A153R/I285E/C503Q/A547D;
 I27E/R134Q/Q205T/I285E/C503Q/A551D;
 I27E/R134Q/Q205T/P266H/L278D/A547D; I27E/R134Q/P210C;
 I27E/R134Q/L214E/C503Q; I27E/R134Q/L214E/C503Q/A547D;
 I27E/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D;
 I27E/R134Q/L214E/C503Q/C565N;
 I27E/R134Q/L278D/I285E/A551D/C565N; I27E/R134Q/I285E/C503Q;

I27E/A153R/L214E/L278D/I285E/A551D/C565N;
 I27E/A153R/L214E/L278D/A551D; I27E/Q205T;
 I27E/Q205T/L214E/L278D/I285E/C503Q/C565N;
 I27E/Q205T/L214E/C503Q/A547D/C565N;
 I27E/Q205T/P266H/L278D/I285E/A551D/C565N;
 I27E/Q205T/L278D/A551D; I27E/P210C;
 I27E/P210C/L214E/C503Q/A547D; I27E/P210C/L278D/C503Q;
 I27E/P210C/C503Q; I27E/P210C/C503Q/C565N; I27E/P210C/A551D;
 I27E/L214E; I27E/L214E/P266H/L278D/I285E/A551D;
 I27E/L214E/L278D; I27E/L214E/L278D/C503Q; I27E/L214E/C503Q;
 I27E/L214E/C503Q/A547D; I27E/L214E/C503Q/A547D/C565N;
 I27E/L214E/A551D; I27E/P266H/L278D/C503Q;
 I27E/P266H/A547D/A551D; I27E/L278D/C503Q/A551D;
 I27E/L278D/C503Q/A551D/C565N; I27E/A547D/C565N;
 V39A/G45S/L278D/C503Q/A551D; V39A/V105C/R134Q/A153R/Q205T/A551D;
 V39A/V105C/R134Q/P210C/L214E/A551D;
 V39A/V105C/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D;
 V39A/V105C/A153R/P266H/A547D/A551D; V39A/V105C/Q205T/C503Q;
 V39A/V105C/Q205T/A551D; V39A/V105C/P210C/A547D;
 V39A/V105C/L214E/P266H/A547D/C565N;
 V39A/V105C/L214E/I285E/C503Q/A551D/C565N;
 V39A/A112C/R134Q/Q205T/L214E/L278D;
 V39A/A112C/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D;
 V39A/A112C/A153R/Q205T/L278D/C503Q/A547D; V39A/R134Q;
 V39A/R134Q/Q205T/L214E/C503Q/C565N;
 V39A/R134Q/P210C/L214E/A547D/C565N; V39A/A153R/C503Q/A547D;
 V39A/Q205T/L278D/A547D/A551D;
 V39A/P210C/L214E/L278D/I285E/C503Q/A551D; V39A/P266H;
 V39A/P275R/L278D/C503Q/A551D; V39A/C503Q;
 V39A/C503Q/A551D/C565N; V105C;
 V105C/A112C/R134Q/Q205T/L214E/Y492H/C503Q/A547D;
 V105C/R134Q/A153R/Q205T/L214E/C503Q;
 V105C/R134Q/Q205T/L214E/A547D; V105C/R134Q/Q205T/P266H/L278D;
 V105C/R134Q/L214E/P266H/I285E/C503Q/A551D/C565N;
 V105C/R134Q/L214E/L278D/C565N; V105C/R134Q/L214E/C503Q/A547D;
 V105C/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D; V105C/R134Q/C503Q;

V105C/R134Q/C503Q/A547D; V105C/R134Q/C503Q/A547D/C565N;
 V105C/A153R/Q205T/L214E/P266H/C503Q/A547D;
 V105C/A153R/Q205T/P266H/I285E/A547D/C565N;
 V105C/Q205T/P210C/L214E/C503Q/A547D; V105C/Q205T/L214E/L278D;
 V105C/Q205T/L214E/C503Q/A547D/A551D/C565N;
 V105C/Q205T/C503Q/A551D; V105C/L214E/P266H/L278D/A547D;
 V105C/L214E/L278D/C503Q/A547D/A551D; V105C/L214E/I285E;
 V105C/L214E/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N;
 V105C/L214E/I285E/A547D/C565N; V105C/L278D/C503Q/A551D;
 V105C/I285E; V105C/I285E/A547D; V105C/C503Q; V105C/A547D/A551D;
 A112C/R134Q/A153R/L214E/L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N;
 A112C/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D/C565N; A112C/L214E/L278D;
 A112C/L278D/C503Q/A547D;
 R134Q/Q205T/L214E/I285E/C503Q/A551D/C565N; R134Q/Q205T/C503Q;
 R134Q/P210C/L214E/L278D/C503Q/A547D/C565N;
 R134Q/P210C/L214E/C503Q/A547D/A551D; R134Q/L214E;
 R134Q/L214E/L278D/C503Q; R134Q/L214E/L278D/C503Q/A551D;
 R134Q/L214E/I285E/C503Q; R134Q/C503Q; R134Q/C503Q/A547D/A551D;
 A153R; Q205T/L214E/I285E/C503Q/A551D;
 Q205T/L214E/I285E/C503Q/C565N; Q205T/L214E/C503Q/A547D/C565N;
 Q205T/L278D/I285E/A547D/A551D; P210C/L214E; P210C/L214E/P266H;
 L214E/P266H; L214E/P266H/C503Q/A547D/A551D/C565N;
 L214E/C503Q/A547D; L214E/A547D; P266H/L278D/C503Q; P266H/C565N;
 L278D/A547D; C503Q; C503Q/A547D; C503Q/A547D/A551D/C565N;
 C503Q/A547D/C565N; C503Q/A551D; C503Q/A551D/C565N; A547D; C565N;
 V80I/R134C/P564Q; V121C; A123G; A124G; M125L; L126I/T;
 L126M/R134L; L127A; A129G/L; N130Q; N130C/M370I R134W; M133R;
 R134I; R134N/G307C; G135C/S; G135A/A394E; G20S/I144L; R43S;
 L47M/I144L; L47M/R146E; L47M/M147G/A383E; L47M/P157C;
 Q58H/L143V; Q58K/P157D/G369C; A62S/M147V;
 S82I/G135C/P157F/W279L; R94C/I149E; T110I/I139R; L118M/L141H;
 A119E/T156H/A289D; I139M/V; R140D/G/M; R140N/A199E;
 R140E/A334S/A551D; L141K/Q/P/T; E142H/P/V; E142D/G371D; L143F/M;
 I144L/N/V; K145N/Q/R; K145G/P157T; R146H/L; R146W/D191Y; M147A;
 I149L/R; F150K/L/M; L151M; A153C/G; A153S/H250N; G154R;
 G154Y/L174M/Q321K/S456I/G483C; T156K/G483C; P157D/F/H/Y; Y158E;

V159C/H/L/M; M247I; L319M; Q389K; P117T/Y176Q; V172I/C/L; L174M;
 S175G; Y176E/I/M/R/V; I177M/V; T178L/A477S; S180C/T; R43S/H374K;
 R43S/H374R; A112S/M370A/A507E; M147I/H374S; S187R/L381V;
 D191Y/H385N; A232S; Q240K/H374R; A256S/L381N; P275Q/M370S;
 P275T/H374R; Q332K/Y377M; A334S/H374V; L349M; Q355K/H374S;
 M370G/I/S; G371H/N/Q/S; M372A/V; H374A/D/G/L/N/R/S/T;
 H374Q/P396Q; H374R/G417C; L375I; L375M; Y377C/I/N;
 Y378C/D/E/I/L/N/S; Y378F/P404Q; I379C/H/L/M/N; L381G/V;
 L381M/Q560K; L382C/H/I/M/S; A383S/V; K384R; H385C/G/N;
 H385M/P403H; H385S/P403H; D387S; L418M; G425V; A447S; S461G;
 S525L; A24S/F434M; A62S/T433N; S98I; L213M/S438L; Q240K/T433Y;
 S286R/Y435T; A289S/L431E; S331I; L431C/E/G/P/S/V; L432C/V;
 T433A/I/L/N/P/Q/R/S/V/W; F434C; Y435L; Y435Q/H446N; G436M;
 G436D/T; N437E/G/Q; N437T/L538M; S438C/F/M/R/T; I439C/F/L/V;
 A477S; A24E; Q58R/Y475H; A70S/N474E; L104M/V476L; A119E/G365A;
 L206M; P275Q; G276V; Q292H/A479G; Q355H/I478C; P404T/A477V;
 I471F/G/K/M/N/R/V/W; F472G; Q473H/K/M/R/S; Q473H/A507S;
 N474A/H/R/W; N474D/R490H; Y475C/F/L/Q; V476C/I/L; I478N/S;
 A479G/S; F482C/L; G483C/H/S; G483A/S524I; G483R/G537C; A558S;
 V39A/K115E/M133R/C565N; V39A/M133R/F472G/C503Q/C565N;
 V39A/M133R/F472G/C565N; V39A/M133R/C503Q;
 V39A/M133R/C503Q/C565N; V39A/M147A/Y378E/C503Q/C565N;
 V39A/M147A/Y378E/C565N; V39A/M147A/L381G/F472G/C503Q/C565N;
 V39A/M147A/L381G/C503Q/C565N; V39A/M147A/F472G/C503Q/C565N;
 V39A/M147A/F472G/C565N; V39A/M147A/C565N;
 V39A/G248C/L381G/F472G/C503Q/C565N; V39A/Y378E/C503Q/C565N;
 V39A/Y378E/C565N; V39A/L381G; V39A/F472G/C503Q/C565N;
 V39A/C503Q/C565N; M133R/L381G/C565N; M133R/C503Q; Y378D/C503Q;
 Y378E/F472G/C503Q/C565N; L381G/F472G/C503Q/C565N и/или
 F472G/C503Q/C565N.

Настоящее изобретение также относится к сконструированным полипептидам, обладающим активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), содержащим: а) аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 86%, по меньшей мере приблизительно 87%, по меньшей мере приблизительно 88%, по меньшей мере приблизительно 89%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или большей идентичностью последовательности с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 26 или ее функциональным фрагментом; б) полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере одним различием аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 26 или ее функциональным фрагментом в одном или более положений аминокислот, и с) которые обладают улучшенным свойством, выбранным из i) повышенной каталитической активности, ii) сниженной чувствительности к протеолизу, iii) повышенной устойчивости к кислому pH, iv) сниженной агрегации, v) сниженной иммуногенности или сочетания любых из i), ii), iii), iv) или v), по сравнению с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 26.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к сконструированным полипептидам, обладающим активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), содержащим: а) аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или большей идентичностью последовательности с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 26 или ее функциональным фрагментом; б) полипептидную последовательность, содержащую по меньшей мере одним различием аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 26 или ее функциональный фрагмент в

одном или более положений аминокислот, и с) которые обладают улучшенным свойством, выбранным из i) повышенной каталитической активности, ii) сниженной чувствительности к протеолизу, iii) повышенной устойчивости к кислому pH, iv) сниженной агрегации, v) сниженной иммуногенности или сочетания любых из i), ii), iii), iv) или v), по сравнению с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 26.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам, обладающим активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), содержащим: а) аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 26 или ее функциональным фрагментом; б) полипептидную последовательность, обладающую по меньшей мере одним различием аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 26 или ее функциональным фрагментом в одном или более положений аминокислот, и с) которые обладают улучшенным свойством, выбранным из i) повышенной каталитической активности, ii) сниженной чувствительности к протеолизу, iii) повышенной устойчивости к кислому pH, iv) сниженной агрегации, v) сниженной иммуногенности или сочетания любых из i), ii), iii), iv) или v), по сравнению с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды, обладающие активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL) по настоящему изобретению, содержат аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 26 и по меньшей мере одним различием аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 126, и которая обладает по меньшей мере одним улучшенным свойством, выбранным из повышенной каталитической активности, сниженной чувствительности к протеолизу, повышенной устойчивости к кислому pH, сниженной агрегации и/или сниженной иммуногенности, по сравнению с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления сконструированных полипептидов различие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 26 выбрано из одной или более следующих ниже замен или серии замен:

A24E/G381L, L127V, A129I/V, S131C/T, H132L/S, R134C/F/H/K, R134H/Y378E/G381L, R134H/Y378E/G381L/V388T, R134H/V388T, A136K, A289S, M372L, H374G/M/Q, G381A/C/F/L/L/M/N/Q/S/T, A383C/M, V388C/T, L431M и/или L563M.

В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид, обладающий активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL) по настоящему изобретению, обладает по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательности с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид, обладающий активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL) по настоящему изобретению, обладает по меньшей мере приблизительно 90% идентичностью последовательности с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 4, при этом в некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полипептид обладает по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью последовательности с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид, обладающий активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), по настоящему изобретению обладает по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид, обладающий активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL) по настоящему изобретению, обладает по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 4, при этом в некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полипептид обладает по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 4. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированные полипептиды содержат функциональные фрагменты полипептидов (например, любого из вариантов, предоставленных в таблицах в настоящем описании), обладающих активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL) по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид, обладающий активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL) по настоящему изобретению, обладает по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 и/или 26. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид, обладающий активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL) по настоящему изобретению, обладает по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 6, 8,

10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 и/или 26. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид, обладающий активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере приблизительно 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 и/или 26. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид, обладающий активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 и/или 26 или ее функциональным фрагментом. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированные полипептиды содержат функциональные фрагменты полипептидов (например, функциональные фрагменты SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 и/или 26, а также любой из вариантов, предоставленных в таблицах в настоящем описании), обладающих активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL) по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также относится к сконструированным полипептидам, обладающим активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), где сконструированные полипептиды представляют собой варианты PAL, приведенные в любой из табл. 2-1 - 2-5 и/или табл. с 9-1 по 9-7.

В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид, обладающий активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), представляет собой фермент *Anabaena variabilis*. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированные полипептиды, обладающие активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), являются термостабильными. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды, обладающие активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), являются устойчивыми к протеолизу. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированные полипептиды, обладающие активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), являются устойчивыми к протеолизу по меньшей мере одним ферментом желудочно-кишечного тракта. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированные полипептиды, обладающие активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), являются устойчивыми к протеолизу химотрипсином, трипсином, карбоксипептидазами и/или эластазами. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полипептид, обладающий активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), является кислотостойким.

Настоящее изобретение также относится к сконструированным полипептидам, обладающим активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), которые являются деиммунизированными. В некоторых вариантах осуществления деиммунизированные сконструированные полипептиды содержат аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или большей идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 и/или 26. В некоторых дополнительных вариантах осуществления деиммунизированные сконструированные полипептиды содержат аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или большей идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 и/или 26. В некоторых вариантах осуществления деиммунизированные сконструированные полипептиды содержат аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 и/или 26. В некоторых вариантах осуществления деиммунизированные сконструированные полипептиды содержат аминокислотную последовательность, обладающую 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 и/или 26.

В еще одних других некоторых дополнительных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к очищенным сконструированным полипептидам, обладающим активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL).

Настоящее изобретение также относится к полинуклеотидным последовательностям, кодирующим по меньшей мере один сконструированный полипептид, обладающий активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), как указано в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность является функционально связанной с контролирующей последовательностью. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность является кодон-оптимизированной.

Настоящее изобретение также относится к экспрессирующим векторам, содержащим по меньшей мере одну полинуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один сконструированный полипептид, обладающий активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), как предоставлено в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующий вектор дополнительно содержит по меньшей мере одну контролируемую последовательность. В некоторых вариантах осуществления контролирующая последовательность представляет собой промотор. В некоторых дополни-

тельных вариантах осуществления промотор представляет собой гетерологичный промотор.

Настоящее изобретение также относится к клеткам-хозяевам, трансформированным по меньшей мере одной полинуклеотидной последовательностью, кодирующей по меньшей мере один из сконструированных полипептидов, обладающих активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), и/или по меньшей мере одним экспрессирующим вектором, содержащим по меньшей мере одну полинуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один сконструированный полипептид, обладающий активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), и по меньшей мере одну контролируемую последовательность. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева содержат по меньшей мере один сконструированный полипептид, обладающий активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), который является кодон-оптимизированным. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

Настоящее изобретение также относится к способам продукции по меньшей мере одного сконструированного полипептида PAL в клетке-хозяине, включающим культивирование клетки-хозяина, содержащей по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один сконструированный полипептид, обладающий активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), и/или по меньшей мере один экспрессирующий вектор, содержащий по меньшей мере одну полинуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один сконструированный полипептид, обладающий активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), и по меньшей мере одну контролируемую последовательность, в подходящих условиях культивирования, таких, что продуцируется сконструированный полипептид PAL. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают этап выделения по меньшей мере одного сконструированного полипептида, содержащего фенилаланин-аммиак-лиазу (PAL), из культуры и/или клеток-хозяев. В некоторых дополнительных вариантах осуществления способы дополнительно включают этап очистки по меньшей мере одного сконструированного полипептида, содержащего фенилаланин-аммиак-лиазу (PAL).

Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим по меньшей мере один сконструированный полипептид, обладающий активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), как представлено в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой фармацевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой пищевую и/или питательную добавку. В некоторых дополнительных вариантах осуществления фармацевтические композиции дополнительно содержат по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент и/или носитель. В некоторых дополнительных вариантах осуществления композиция является подходящей для лечения фенилкетонурии. В некоторых дополнительных вариантах осуществления фармацевтическая композиция является подходящей для перорального введения человеку. В некоторых вариантах осуществления композиция находится в форме пилюли, таблетки, капсулы, желатиновой капсулы, жидкости или эмульсии. В еще одних некоторых дополнительных вариантах осуществления пилюля, таблетка, капсула или желатиновая капсула дополнительно содержит растворяющееся в кишечнике покрытие. В некоторых дополнительных вариантах осуществления фармацевтическая композиция является подходящей для парентеральной инъекции человеку. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция вводят совместно по меньшей мере с одним дополнительным терапевтически эффективным соединением. В некоторых дополнительных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере одно дополнительное терапевтически эффективное соединение. В некоторых дополнительных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержится в пищевой и/или питательной добавке.

Настоящее изобретение также относится к способам лечения и/или профилактики симптомов фенилкетонурии у индивидуума, включающим предоставление индивидууму, страдающего фенилкетонурией и предоставление по меньшей мере одной композиции, предоставленной в настоящем описании, индивидууму. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит фармацевтическую композицию, при этом в некоторых альтернативных вариантах осуществления композиция содержит пищевую/питательную добавку. В некоторых вариантах осуществления способов улучшают симптомы фенилкетонурии. В некоторых дополнительных вариантах осуществления получающий лечение индивидуум способен употреблять пищу, которая является в меньшей степени ограниченной по содержанию метионина, фенилаланина и/или тирозина в ней, чем виды пищи, необходимые индивидуумам, проявляющим симптомы фенилкетонурии. В некоторых вариантах осуществления получающий лечение индивидуум (т.е. индивидуум, которому предоставляли по меньшей мере одну композицию, содержащую по меньшей мере один сконструированный полипептид, обладающий активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), как предоставлено в настоящем описании) способен употреблять пищу, которая является в меньшей степени ограниченной по содержанию метионина, фенилаланина и/или тирозина в ней, чем виды пищи, необходимые индивидуумам, которым не предоставляли по меньшей мере одну композицию, как предоставлено в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления композиция, предоставляемая индивидуумам, содержит фармацевтическую композицию, при этом в некоторых альтернативных вариантах осуществления композиция содержит пищевую/питательную добавку. Настоящее изобретение также относится к получающим лечение индивидуумам, где индивидуумам вводили по мень-

шей мере одну композицию и/или фармацевтическую композицию, содержащую по меньшей мере один сконструированный полипептид, обладающий активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), как предоставлено в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления индивидуум представляет собой животное, выбранное из приматов, грызунов и зайцеобразных. В некоторых дополнительных вариантах осуществления индивидуум представляет собой мышь. В некоторых дополнительных вариантах осуществления индивидуум представляет собой человека. В еще одних других некоторых дополнительных вариантах осуществления индивидуум представляет собой грудного ребенка или ребенка, при этом в некоторых альтернативных вариантах осуществления индивидуум представляет собой взрослого человека или молодого человека.

Настоящее изобретение также относится к видам использования композиций, содержащих по меньшей мере один сконструированный полипептид, обладающий активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), предоставленный в настоящем описании.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 предоставлено выравнивание последовательностей белка PAL дикого типа: PAL *Anabaena variabilis* (NCBI YP_324488.1 (SEQ ID NO: 4)); фенилаланин/гистидин-аммиак-лиазы *Nostoc punctiforme* "NpPHAL" (NCBI YP_001865631.1 (SEQ ID NO: 30)); гистидин-аммиак-лиазы *Rivularia* sp. "RspHAL" (NCBI YP_007056096.1 (SEQ ID NO: 31)); гистидин-аммиак-лиазы *Oscillatoria* sp. "OspHAL" (NCBI YP_07108482.1 (SEQ ID NO: 32)) и гистидин-аммиак-лиазы *Gloeocapsa* sp. "GspHAL" (NCBI YP_007127054.1 (SEQ ID NO: 33)).

На фиг. 2A предоставлена сниженная чувствительность к протеолизу (выражаемая в устойчивости к химотрипсину и трипсину) по сравнению с AvPAL дикого типа, тестируемой при pH 7,0 из варианта № 22 (SEQ ID NO: 8), варианта № 30 (SEQ ID NO: 6) и варианта № 36 (SEQ ID NO: 10), как дополнительно описано в примере 4.

На фиг. 2B приведен график, демонстрирующий повышенную устойчивость к кислому pH по сравнению с AvPAL дикого типа, тестируемой при pH от 4,0 до 5,2 для вариантов 22, 30 и 36, как дополнительно описано в примере 4.

На фиг. 3 предоставлены результаты K_M для PAL дикого типа и варианта № 36.

На фиг. 4 предоставлены данные, демонстрирующие аминокислотную специфичность PAL дикого типа и варианта № 36.

На фиг. 5 предоставлены результаты, демонстрирующие относительную стабильность PAL дикого типа и варианта № 36, подвергающихся действию химотрипсина и трипсина человека.

На фиг. 6 предоставлены результаты, демонстрирующие относительную стабильность PAL дикого типа и вариантов № 36, 42 и 43, подвергающихся действию экстракта поджелудочной железы свиньи.

На фиг. 7 представлен график, демонстрирующий результаты, полученные в примере 5.

На фиг. 8 представлен график, демонстрирующий результаты, полученные в примере 8.

Описание изобретения

Настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам PAL, их мутантам, биологически активным фрагментам и аналогам и содержащим их фармацевтическим и промышленным композициям.

Изобретение относится к сконструированным полипептидам фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL) и их композициям, а также полинуклеотидам, кодирующим сконструированные полипептиды фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL). В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL оптимизируют так, чтобы обеспечивать повышенную каталитическую активность, а также сниженную чувствительность к протеолизу и повышенную устойчивость к кислым уровням pH. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL являются деиммунизированными. Изобретение также относится к использованию композиций, содержащих сконструированные полипептиды PAL, в терапевтических и промышленных целях.

Сокращенные обозначения и определения.

Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, как правило, имеют такое же значение, как общепринято понимает специалист в данной области, к которой принадлежит настоящее изобретение. Как правило, номенклатура, используемая в настоящем описании, и описанные ниже лабораторные способы культивирования клеток, молекулярной генетики, микробиологии, органической химии, аналитической химии и химии нуклеиновых кислот представляют собой такие, которые являются хорошо известными и общепринято применяемыми в данной области. Такие техники хорошо известны и описаны во многих учебниках и справочных изданиях, хорошо известных специалистам в данной области. Для химических синтезов и химических анализов используют стандартные способы или их модификации. Все патенты, патентные заявки, статьи и публикации, указанные в настоящем описании как выше, так и ниже, таким образом, явно включены в настоящее описание посредством ссылки.

Несмотря на то, что любые подходящие способы и вещества, аналогичные или эквивалентные таким, которые описываются в настоящем описании, находят применение в практическом осуществлении настоящего изобретения, некоторые способы и вещества описываются в настоящем описании. Следует

понимать, что это изобретение не ограничено конкретной методологией, описываемыми протоколами и реагентами, т.к. они могут изменяться в зависимости от контекста, в котором их используют специалисты в данной области. Таким образом, определяемые непосредственно ниже термины более полно описаны посредством ссылки на заявку в целом. Все патенты, патентные заявки, статьи и публикации, указываемые в настоящем описании как выше, так и ниже, таким образом, явно включены в настоящее описание посредством ссылки.

Кроме того, как используют в настоящем описании, формы единственного числа включают обозначаемые объекты во множественном числе, если из контекста явно не следует иное.

Числовые диапазоны являются включительными для чисел, определяющих диапазон. Таким образом, каждый числовой диапазон, описываемый в настоящем описании, предназначен включать каждый более узкий числовой диапазон, который входит в такой более широкий числовой диапазон, таким образом, как если бы такие более узкие числовые диапазоны являлись все явным образом включенными в настоящее описание. Также предполагают, что каждое максимальное (или минимальное) числовое ограничение, описываемое в настоящем описании, включает каждое более низкое (или более высокое) числовое ограничение, таким образом, как если бы более низкие (или более высокие) числовые ограничения были бы явно описаны в настоящем описании.

Термин "приблизительно" означает приемлемую ошибку для конкретной величины. В некоторых случаях "приблизительно" означает в пределах 0,05, 0,5, 1,0 или 2,0% от данного диапазона величины. В некоторых случаях "приблизительно" означает в пределах 1, 2, 3 или 4 стандартных отклонения данной величины.

Кроме того, заголовки, предоставленные в настоящем описании, не являются ограничениями различных аспектов или вариантов осуществления изобретения, которые можно делать посредством ссылки на заявку в целом. Таким образом, термины, определяемые непосредственно ниже, более полно определены посредством ссылки на заявку в целом. Тем не менее, для облегчения понимания изобретения ниже определяют ряд терминов.

Если не указано иначе, нуклеиновые кислоты записывают слева направо в ориентации 5'-3'; аминокислотные последовательности записывают слева направо в ориентации аминокислот соответственно.

Как используют в настоящем описании, термин "содержащий" и его родственные формы используют в их широком смысле (т.е. эквивалентном термину "включающий" и его соответствующим родственным формам).

Число "ЕС" относится к номенклатуре ферментов комитета по номенклатуре Международного союза биохимии и молекулярной биологии (NC-IUBMB). Биохимическая классификация IUBMB представляет собой систему нумерической классификации ферментов на основе химических реакций, которые они катализируют.

"ATCC" относится к Американской коллекции типовых культур, хранилище биологических материалов которой содержит гены и штаммы.

"NCBI" относится к Национальному центру биологической информации и базам данных последовательностей, предоставляемых им.

Как используют в настоящем описании, термин "полипептид фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL)" относится к классу ферментов в семействе лиаз ароматических аминокислот (ЕС 4.3.1.23, ЕС 4.3.1.24 и ЕС 4.3.1.25), которое также включает гистидин-аммиак-лиазу и тирозин-аммиак-лиазу. Полипептиды PAL также в некоторых случаях обозначают как фенилаланин/тирозин-аммиак-лиазу, т.к. некоторые ферменты PAL могут использовать тирозин, а также фенилаланин в качестве субстрата. Однако AvPAL и варианты, описываемые и заявляемые в настоящем описании, не используют тирозин в качестве субстрата. Полипептиды PAL катализируют преобразование L-фенилаланина в транс-коричную кислоту и аммиак. Активность PAL относится к ферментативной активности полипептидов PAL. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления фермент PAL также содержит кофактор 3,5-дигидро-5-метилен-4Н-имидазол-4-он (МНО). Этот кофактор может являться необходимым для каталитической активности и образуется в результате кристаллизации и дегидратации консервативного трипептидного сегмента Ala167-Ser168-Gly169 активного центра.

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

"Аминокислоты" обозначают в настоящем описании посредством общеизвестных их трехбуквенных символов или посредством однобуквенных символов, рекомендуемых Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Аналогично нуклеотиды можно обозначать посредством их общепринятых однобуквенных кодов.

Термин "конструируемый", "рекомбинантный", "неприродный" и "вариант" при использовании со ссылкой на клетку, полинуклеотид или полипептид относится к веществу или веществу, соответствующему природной или нативной форме вещества, которое модифицировали таким образом, что в ином случае оно не могло бы существовать в природе или является идентичным такой форме, но получаемым

или выделяемым из синтетических веществ и/или путем обработки рекомбинантными способами.

Как используют в настоящем описании, "дикого типа" и "природная" относятся к форме, встречающейся в природе. Например, полипептид или полинуклеотидная последовательность дикого типа представляет собой последовательность, присутствующую в организме, которую можно выделять из источника в природе, и которая не подвергалась целенаправленным модификациям в результате обработки человеком.

Как используют в настоящем описании, "деиммунизированный" относится к обработке белка с целью получения варианта, который не является таким же иммуногенным, как белок дикого типа или эталонный белок. В некоторых вариантах осуществления деиммунизированный заключается в том, что вариант белка не стимулирует иммунный ответ у пациентов, которым вводят вариант белка. Такой ответ можно измерять различными способами, включая, но не ограничиваясь ими, наличие или относительное содержание нейтрализующих (т.е. антител против лекарственного средства), наличие анафилактического ответа или преобладания или интенсивности высвобождения цитокинов после введения белка. В некоторых вариантах осуществления вариант белка является менее иммуногенным, чем белок дикого типа или эталонный белок. В некоторых вариантах осуществления деиммунизация включает модификации белков (например, эпитопов), которые распознаются Т-клеточными рецепторами. В некоторых вариантах осуществления для получения деиммунизированного варианта белка из белка дикого типа или эталонного белка удаляют Т-клеточные эпитопы. В некоторых вариантах осуществления для деиммунизированного белка демонстрируют более низкие уровни ответа биохимических и клеточно-биологических показателей иммунных ответов человека, включая анализы активации дендритных клеток - Т-клеток или анализы связывания пептидов лейкоцитарного антигена человека (HLA).

"Кодирующая последовательность" относится к части нуклеиновой кислоты (например, гену), кодирующей аминокислотную последовательность белка.

Термин "процент (%) идентичности последовательности" применяют в настоящем описании для обозначения сравнений полинуклеотидов и полипептидов и определяют путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей на протяжении всего окна сравнения, где участок полинуклеотидной или полипептидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (например, пропуски) по сравнению с эталонной последовательностью для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент можно рассчитывать путем определения числа положений, в которых встречаются идентичное основание нуклеиновой кислоты или аминокислотный остаток в обеих последовательностях, с получением числа совпадающих положений, деления числа совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения и умножением результата на 100 с получением процента идентичности последовательности. Альтернативно, процент можно рассчитывать путем определения числа положений, в которых встречается идентичное основание нуклеиновой кислоты или аминокислотного остатка в обеих последовательностях, или в которых основание нуклеиновой кислоты или аминокислотного остатка выравнивают с пропуском с получением числа совпадающих положений, делением числа совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения и умножением результата на 100 с получением процента идентичности последовательности.

Специалистам в данной области понятно, что существует много установленных алгоритмов, доступных для выравнивания двух последовательностей. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, посредством алгоритма локальной гомологии Смита-Ватермана (Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482 [1981]), посредством алгоритма гомологичного выравнивания Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443 [1970]), путем поиска сходства способом Пирсона и Липмана (Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444 [1988]), посредством компьютеризированных реализаций этих алгоритмов (например, GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программ GCG Wisconsin) или визуально, как известно в данной области. Примеры алгоритмов, которые являются подходящими для определения процента идентичности последовательности и сходства последовательности включают, но не ограничиваются ими, алгоритмы BLAST и BLAST 2.0 (см., например, Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410 [1990], и Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 3389-3402 [1977]). Программное обеспечение для проведения анализов BLAST является общедоступным на веб-сайт Национального центра биотехнологической информации (the National Center for Biotechnology Information). Этот алгоритм включает сначала идентификации пар последовательностей с высокими оценками (HSP) путем идентификации коротких слов длиной "W" в запрашиваемой последовательности, которая совпадает или удовлетворяет некоторой положительной пороговой оценки "T" при выравнивании со словом той же длины в последовательности из базы данных. T относится к порогу оценки соседних слов (см. Altschul et al., выше). Такие исходные совпадения соседних слов выступают в качестве заправки для инициации поиска для выявления более длинных HSP, содержащих их. Затем совпадения слов расширяют в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока можно увеличивать совокупную оценку выравнивания. Совокупные оценки для нуклеотидных последовательностей вычисляют с использованием параметров "M" (награда за пару совпадающих остатков; всегда >0) и "N" (штраф за несовпадающие остатки; всегда <0). Для аминокислотных последовательностей для вычисления совокупной оценки используют оценочную матрицу. Расширение совпадений слов в каждом направ-

лении останавливают, если совокупная оценка выравнивания снижается на значение "X" от ее максимального достигнутого значения; совокупная оценка снижается до нуля или ниже вследствие накопления одного или более выравниваний остатков с отрицательной оценкой, или достигают конца любой из последовательностей. Параметры W, T и X алгоритма BLAST определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) используют в качестве значений по умолчанию длину слова (W) 11, ожидание (E) 10, M = 5, N = -4 и сравнение обеих цепей. В программе BLASTP для аминокислотных последовательностей используют в качестве значений по умолчанию длину слова (W) 3, ожидание (E) 10 и оценочную матрицу BLOSUM62 (см., например, Henikoff и Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915 [1989]). Для иллюстративного определения выравнивания последовательностей и % идентичности последовательности можно применять программы BEST-FIT или GAP в пакете программ GCG Wisconsin (Accelrys, Madison WI) с использованием предоставляемых параметров по умолчанию.

"Эталонная последовательность" относится к определенной последовательности, используемой в качестве основы для сравнения последовательностей. Эталонная последовательность может представлять собой подгруппу более крупной последовательности, например сегмент полноразмерного гена или полипептидной последовательности. Как правило, длина эталонной последовательности составляет по меньшей мере 20 нуклеотидов или аминокислотных остатков, по меньшей мере 25 остатков, по меньшей мере 50 остатков, по меньшей мере 100 остатков или представляет собой полную длину нуклеиновой кислоты или полипептида. Вследствие того что каждый из двух полинуклеотидов или полипептидов может (1) содержать последовательность (например, участок полной последовательности), который является одинаковым для двух последовательностей, и (2) может дополнительно содержать последовательность, которая является различной для двух последовательностей, сравнения последовательностей между двумя (или более) полинуклеотидами или полипептидами, как правило, проводят путем сравнения последовательностей двух полинуклеотидов или полипептидов на протяжении всего "окна сравнения" для идентификации и сравнения локальных областей сходства последовательностей. В некоторых вариантах осуществления "эталонная последовательность" может быть основана на первичной аминокислотной последовательности, где эталонная последовательность представляет собой последовательность, которая может содержать одно или более изменений в первичной последовательности. Например, фраза "эталонная последовательность, основанная на SEQ ID NO: 4, содержащая валин в остатке, соответствующем X39" относится к эталонной последовательности, в которой соответствующий остаток в положении X39 в SEQ ID NO: 4 (например, аланин) заменяли на валин.

"Окно сравнения" относится к концептуальному сегменту по меньшей мере приблизительно 20 смежных положений нуклеотидов или аминокислотных остатков, где последовательность можно сравнивать с эталонной последовательностью по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов или аминокислот, и где участок последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (например, пропуски) 20% или менее по сравнению с эталонной последовательностью (которая не содержит добавления или делеции) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Окно сравнения может составлять более 20 смежных остатков и включает, необязательно, 30, 40, 50, 100 или более длинных окон.

"Соответствующий", "относится к" и "относительно" при использовании в отношении нумерации данной аминокислоты или полинуклеотидной последовательности относится к нумерации остатков конкретной эталонной последовательности, когда данную аминокислотную или полинуклеотидную последовательность сравнивают с эталонной последовательностью. Другими словами, число остатков или положение остатка данного полимера обозначают относительно эталонной последовательности, а не по фактическому нумерационному положению остатка в данной аминокислотной или полинуклеотидной последовательности. Например, данную аминокислотную последовательность, такую как последовательность сконструированной PAL, можно выравнивать с эталонной последовательностью путем введения пропусков для оптимизации совпадений остатков между двумя последовательностями. В этих случаях, несмотря на то, что присутствуют пропуски, нумерацию остатка в данной аминокислотной или полинуклеотидной последовательности проводят относительно эталонной последовательности, с которой ее выравнивали.

"Различие аминокислоты" и "различие остатка" относятся к различию аминокислотного остатка в положении полипептидной последовательности относительно аминокислотного остатка в соответствующем положении в эталонной последовательности. Положения различий аминокислот в настоящем описании, как правило, обозначают как "Xn", где n относится к соответствующему положению в эталонной последовательности, на котором основано различие остатка. Например, "различие остатка в положении X91 по сравнению с SEQ ID NO: 4" относится к различию аминокислотного остатка в положении полипептида, соответствующем положению 91 SEQ ID NO: 4. Таким образом, если эталонный полипептид SEQ ID NO: 4 содержит аланин в положении 91, то "различие остатка в положении X91 по сравнению с SEQ ID NO: 4" относится к замене аминокислоты любого остатка аминокислотой, отличной от аланина, в положении полипептида, соответствующем положению 91 SEQ ID NO: 4. В большинстве случаев в настоящем описании конкретное различие аминокислотного остатка в положении обозначают как

"XnY", где "Xn" обозначает соответствующий остаток и положение эталонного полипептида (как описано выше), и "Y" представляет собой однобуквенный идентификатор аминокислоты, встречающейся в сконструированном полипептиде (например, другой остаток, чем в эталонном полипептиде). В некоторых случаях (например, в таблицах в примерах) настоящее изобретение также относится к конкретным различиям аминокислот, обозначаемым общепринятым условным обозначением "AnB", где A представляет собой однобуквенный идентификатор остатка в эталонной последовательности, "n" представляет собой номер положения остатка в эталонной последовательности, и B представляет собой однобуквенный идентификатор замены остатка в последовательности сконструированного полипептида. В некоторых случаях полипептид по настоящему изобретению может содержать одно или более различий аминокислотного остатка относительно эталонной последовательности, которое указано в списке конкретных положений, в которых присутствуют различия остатка относительно эталонной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, где более одной аминокислоты можно использовать в конкретном положении остатка полипептида, различные аминокислотные остатки, которые можно использовать, разделяют "/" (например, X307G/X307Q или X307G/Q). Настоящее изобретение включает сконструированные полипептидные последовательности, содержащие одно или более различия аминокислот, которые включают любые/или как консервативные, так и неконсервативные аминокислотные замены.

Термины "серия замен аминокислот" и "серия замен" относится к группе замен аминокислот в полипептидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления серии замен содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более замен аминокислот. В некоторых вариантах осуществления серия замен относится к серии замен аминокислот, которая содержится в любом из вариантов полипептидов AvPAL, перечисленных в любой из таблиц в примерах. Например, серия замен, содержащаяся в варианте 36, представляет собой A39V/A91V/N290G/H307G/L407V/T524S, где положения аминокислот указаны относительно SEQ ID NO: 4.

"Консервативная аминокислотная замена" относится к замене остатка другим остатком, содержащим аналогичную боковую цепь, и, таким образом, как правило, включает замену аминокислоты в полипептиде аминокислотами в том же или аналогичном определенном классе аминокислот. В качестве примера, а не ограничения аминокислоту с алифатической боковой цепью можно заменять другой алифатической аминокислотой (например, аланином, валином, лейцином и изолейцином); аминокислоту с гидроксильной боковой цепью заменяют другой аминокислотой с гидроксильной боковой цепью (например, серином и треонином); аминокислоту, содержащую ароматические боковые цепи, заменяют другой аминокислотой, содержащей ароматическую боковую цепь (например, фенилаланин, тирозин, триптофан и гистидин); аминокислоту с основной боковой цепью заменяют другой аминокислотой с основной боковой цепью (например, лизином и аргинином); аминокислоту с кислой боковой цепью заменяют другой аминокислотой с кислой боковой цепью (например, аспарагиновой кислотой или глутаминовой кислотой) и гидрофобную или гидрофильную аминокислоту заменяют другой гидрофобной или гидрофильной аминокислотой соответственно.

"Неконсервативная замена" относится к замене аминокислоты в полипептиде аминокислотой со свойствами боковой цепи, значительно отличающимися. В неконсервативных заменах могут быть использованы аминокислоты между различных групп, а не внутри одной группы, и они влияют на (a) структуру пептидного остова в области замены (например, пролина на глицин); (b) заряд или гидрофобность и/или (c) объем боковой цепи. В качестве примера, а не ограничения иллюстративные неконсервативные замены включают кислую аминокислоту, заменяемую основной или алифатической аминокислотой; ароматическую аминокислоту, заменяемую небольшой аминокислотой, и гидрофильную аминокислоту, заменяемую гидрофобной аминокислотой.

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

"Вставка" относится к модификации полипептида путем добавления одной или более аминокислот к эталонному полипептиду. Вставку могут делать во внутренние участки полипептида или к карбокси- или аминоконцам. Как используют в настоящем описании, вставки включают слитые белки, как известно в данной области. Вставка может представлять собой смежный сегмент аминокислот или являться разделенной одной или более аминокислотами в природном полипептиде.

Термины "функциональный фрагмент" и "биологически активный фрагмент" в настоящем описании используют взаимозаменяемо для обозначения полипептида, который имеет аминоконцевую и/или карбоксиконцевую делецию(и) и/или внутренние делеции, но где остальная часть аминокислотной последовательности является идентичной соответствующим положениям в последовательности, с которой ее сравнивают (например, полноразмерной сконструированной PAL по настоящему изобретению), и ко-

торая сохраняет, по существу, полную активность полноразмерного полипептида.

"Выделенный полипептид" относится к полипептиду, который, по существу, отделяют от других загрязняющих веществ, которые содержатся с ним в природе (например, белок, липиды и полинуклеотиды). Термин включает полипептиды, которые удаляли или выделяли из их природного окружения, или экспрессирующую систему (например, клетку-хозяин или синтез *in vitro*). Рекombинантные полипептиды PAL могут содержаться в клетке, содержаться в клеточной среде, или их можно получать в различных формах, таких как лизаты или выделенные препараты. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления рекombинантные полипептиды PAL, предоставленные в настоящем описании, представляют собой выделенные полипептиды.

"По существу, чистый полипептид" относится к композиции, в которой тип полипептида представляет собой преобладающий содержащийся вид (например, в пересчете на моль или массу он является более многочисленным, чем другие отдельные виды макромолекул в композиции) и, как правило, представляет собой в значительной степени очищенную композицию, когда целевой вид включает по меньшей мере приблизительно 50% содержащихся видов макромолекул в пересчете на моль или мас.%. Как правило, по существу, чистая композиция PAL содержит приблизительно 60% или более, приблизительно 70% или более, приблизительно 80% или более, приблизительно 90% или более, приблизительно 95% или более и приблизительно 98% или более всех типов макромолекул в пересчете на моль или мас.%, содержащихся в композиции. В некоторых вариантах осуществления целевой вид очищают, по существу, до однородного состояния (например, в композиции невозможно детектировать загрязняющие молекулы общепринятыми способами детекции), где композиция состоит, по существу, из одного вида макромолекул. Молекулы растворителя, низкомолекулярные соединения (<500 Да) и виды ионов элементов не читают видами макромолекул. В некоторых вариантах осуществления выделенные рекombинантные полипептиды PAL представляют собой, по существу, чистые полипептидные композиции.

"Улучшенное ферментативное свойство" относится к сконструированному полипептиду PAL, который характеризуется улучшением любого ферментативного свойства по сравнению с эталонным полипептидом PAL, такой как полипептид PAL дикого типа (например, AvPAL дикого типа, содержащий SEQ ID NO: 4) или другой сконструированный полипептид PAL. Улучшенные свойства включают, но не ограничиваются ими, такие свойства, как повышенная экспрессия белка, повышенная термоактивность, повышенная термостабильность, повышенная активность pH, повышенная стабильность, повышенная ферментативная активность, повышенная субстратная специфичность и/или аффинность, повышенная специфическая активность, повышенная устойчивость к ингибированию субстратом и/или конечным продуктом, повышенная химическая стабильность, улучшенная хемоселективность, улучшенная стабильность в отношении растворителя, повышенная устойчивость к кислому pH, повышенная устойчивость к протеолитическому действию (т.е. сниженной чувствительности к протеолизу), сниженная агрегация, повышенная растворимость, сниженная иммуногенность и измененный температурный профиль.

"Повышенная ферментативная активность" и "повышенная каталитическая активность" относится к улучшенному свойству сконструированных полипептидов PAL, которое может быть представлено увеличением специфической активности (например, продуцируемого продукта/времени/массы белка) и/или увеличением процента преобразования субстрата в продукт (например, процент преобразования исходного количества субстрата в продукт за предопределенный момент времени с использованием предопределенного количества PAL) по сравнению с эталонным ферментом PAL (например, AvPAL дикого типа и/или другой сконструированной AvPAL). Иллюстративные способы определения ферментативной активности приведены в примерах. На любое свойство, относящееся к ферментативной активности, можно оказывать влияние, включая классические ферментативные свойства K_m , V_{max} или k_{cat} , изменения которых могут приводить к повышенной ферментативной активности. Улучшения ферментативной активности могут составлять приблизительно от 1,1 раза ферментативной активности соответствующего фермента дикого типа до менее 2 раз, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 25 раз, 50 раз, 75 раз, 100 раз, 150 раз, 200 раз или более ферментативной активности по сравнению с природной PAL или другой сконструированной PAL, из которых получали полипептиды PAL.

В некоторых вариантах осуществления k_{cat} сконструированных полипептидов PAL составляет по меньшей мере 0,1/с, по меньшей мере 0,2/с, по меньшей мере 0,3/с, по меньшей мере 0,5/с, по меньшей мере 1,0/с и в некоторых предпочтительных вариантах осуществления более 1,0/с. В некоторых вариантах осуществления K_m находится в диапазоне приблизительно от 1 мкМ приблизительно до 5 мМ; в диапазоне приблизительно от 5 мМ приблизительно до 2 мМ; в диапазоне приблизительно от 10 мкМ приблизительно до 2 мМ или в диапазоне приблизительно от 10 мкМ приблизительно до 1 мМ. В некоторых конкретных вариантах осуществления сконструированный фермент PAL обладает улучшенной ферментативной активностью в диапазоне от 1,5 до 10 раз, от 1,5 до 25 раз, от 1,5 до 50 раз, от 1,5 до 100 раз или более раз большей, чем, ферментативная активность эталонного фермента PAL. Активность PAL можно измерять любым стандартным анализом, известным в данной области (например, мониторингом изменений спектрофотометрических свойств взаимодействующих веществ или продуктов). В некоторых вариантах осуществления измеряют количество продуцируемых продуктов посредством разделением высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ), объединенной с детекцией оптической плотно-

стью в УФ-области или флуоресцентной детекцией непосредственно или после дериватизации орто-фталевым альдегидом (OPA). В некоторых вариантах осуществления сравнения ферментативных активностей проводят с использованием определенного препарата фермента, определенного анализа при установленном условии и одного или более определенных субстратов, как дополнительно подробно описано в настоящем описании. Как правило, когда сравнивают лизаты, определяют количества клеток и количества оцениваемого белка, а также используют идентичные экспрессирующие системы и идентичные клетки-хозяева для минимизации изменений количеств фермента, продуцируемого клетками-хозяевами и содержащегося в лизатах.

Термин "улучшенная устойчивость к кислому pH" означает, что рекомбинантная PAL по изобретению обладает повышенной стабильностью (т.е. более высокой остаточной активностью приблизительно при pH 7,0 после воздействия кислым pH в течение предопределенного периода времени [1 ч, до 24 ч]) по сравнению с эталонной PAL.

Как используют в настоящем описании, "физиологический pH" означает диапазон pH, как правило, встречающийся в тонком кишечнике у индивидуума (например, человека). Как правило, существует градиент pH от пилорического клапана до толстой кишки в диапазоне приблизительно от 6,0 до 7,5.

Термин "кислый pH", используемый со ссылкой на улучшенную стабильность в отношении условий кислого pH или повышенной устойчивости к кислому pH, означает диапазон pH приблизительно от 1,5 до 6,8.

Термины "протеолитическая активность" и "протеолиз", используемые в настоящем описании взаимозаменяемо, относятся к расщеплению белков на полипептиды меньшего размера или аминокислоты. Расщепление белков, как правило, является результатом гидролиза пептидной связи ферментами протеазы (протеиназой). Ферменты протеазы включают, но не ограничиваются ими, пепсин, трипсин, химотрипсин, эластаза; карбоксипептидазу А и В и пептидазы (например, аминопептидазу, дипептидазу и энтеропептидазу).

Фразы "снижение чувствительности к протеолизу" и "снижение протеолитической чувствительности" используют в настоящем описании взаимозаменяемо, они означают, что сконструированный полипептид PAL по изобретению обладает более высокой ферментативной активностью по сравнению с эталонной PAL в стандартном анализе (например, как описано в примерах) после обработки одной или несколькими протеазами.

"Агрегация" означает слипание или осаждение полипептида PAL. Агрегация может приводить к инактивации фермента. Термин "сниженная агрегация" означает, что сконструированный полипептид PAL является в меньшей степени склонным к агрегации по сравнению с эталонной PAL. Способы оценки агрегации известны в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, использование флуоресцентной микроскопии с подходящими красителями (например, тиюфлавин Т или нильский красный), динамики светорассеяния, проточной цитометрии с подходящими красителями (например, Bodipy), фильтрация и анализа посредством SDS-PAGE и/или Вестерн-блоттинга, флуоресцентной корреляционной спектроскопии и электронной микроскопии. Существуют коммерчески доступные наборы для оценки агрегации (например, набор для анализа агрегации белка ProteoStat® [Enzo]).

"Преобразование" относится к ферментативной конверсии (или биотрансформации) субстрата(ов) до соответствующего продукта(ов). "Процент преобразования" относится к проценту субстрата, который подвергается преобразованию до продукта в течение периода времени при конкретных условиях. Таким образом, "ферментативную активность" или активность" полипептида PAL можно выражать в виде "процента преобразования" субстрата до продукта в течение определенного периода времени.

"Условие жесткости гибридизации" относится к условиям гибридизации, таким как условия промывания при гибридизации нуклеиновых кислот. Как правило, реакции гибридизации проводят в условиях пониженной жесткости после промываний различной, но более высокой жесткости. Термин "гибридизация в умеренно жестких условиях" относится к условиям, которые обеспечивают возможность ДНК-мишени связываться с комплементарной нуклеиновой кислотой, которая обладает приблизительно 60% идентичностью, предпочтительно приблизительно 75% идентичностью, приблизительно 85% идентичностью с ДНК-мишенью, с большей чем приблизительно 90% идентичностью с полинуклеотидом-мишенью. Иллюстративные умеренно жесткие условия представляют собой условия, эквивалентные гибридизации в 50% формамиде, 5× растворе Денхардта, 5×SSPE, 0,2% SDS при 42°C с последующим промыванием в 0,2×SSPE, 0,2% SDS при 42°C. "Гибридизация в условиях высокой жесткости" в основном относится к условиям, которые составляют приблизительно 10°C или менее от температуры теплового плавления T_m , как определяют в условиях раствора для определенной полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления условия высокой жесткости относятся к условиям, которые обеспечивают гибридизацию только этих последовательностей нуклеиновой кислоты, которые образуют стабильные гибриды в 0,018M NaCl при 65°C (например, если гибрид не является стабильным в 0,018M NaCl при 65°C, он не будет являться стабильным в условиях с высокой жесткостью, как предусмотрено в настоящем описании). Условия с высокой жесткостью можно обеспечивать, например, гибридизацией в условиях, эквивалентных 50% формамиде, 5× раствору Денхардта, 5×SSPE, 0,2% SDS при 42°C с после-

дующим промыванием в $0,1 \times \text{SSPE}$ и $0,1\%$ SDS при 65°C . Другое условие высокой жесткости представляет собой гибридизацию в условиях, эквивалентных гибридизации в $5 \times \text{SSC}$, содержащем $0,1\%$ (мас.:об.) SDS при 65°C , и промыванию в $0,1 \times \text{SSC}$, содержащем $0,1\%$ SDS при 65°C . Другие условия гибридизации с высокой жесткостью, а также умеренно жесткие условия описаны в ссылках, цитируемых выше.

"Кодон-оптимизированный" относится к изменениям кодонов полинуклеотида, кодирующего белок, до кодонов, предпочтительно используемых в конкретном организме таким образом, что кодируемый белок более эффективно экспрессируется в этом организме. Хотя генетический код является вырожденным, что заключается в том, что многие аминокислоты представлены несколькими кодонами, называемыми "синонимами" или "синонимичными" кодонами, хорошо известно, что частота использования кодона конкретными организмами является не случайной и смещенной в сторону конкретных триплетов кодонов. Это смещение частоты использования кодона может являться более высоким по отношению к данному гену, генам общей функции или происхождения предков, экспрессируемым на высоком уровне белкам в сравнении с низкокопийными белками и совокупных кодирующих белок области генома организма. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, кодирующие ферменты PAL, являются кодон-оптимизированными для оптимальной продукции в организме-хозяине, выбранной для экспрессии.

"Контролирующая последовательность" в настоящем описании предназначена включать все компоненты, которые являются необходимыми или предпочтительными для экспрессии полинуклеотида и/или полипептида по настоящему изобретению. Каждая контролирующая последовательность может являться нативной или чужеродной по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. Такие контролирующие последовательности включают, но не ограничиваются ими, лидерные последовательности, последовательности полиаденилирования, пропептидные последовательности, промоторные последовательности, сигнальные пептидные последовательности, иницирующие последовательности и терминаторы транскрипции. Как минимум, контролирующие последовательности включают промотор и стоп-сигналы транскрипции и трансляции. В некоторых вариантах осуществления контролирующие последовательности предоставляют с линкерами с целью введения конкретных участков рестрикции, облегчающих лигирование контролирующих последовательностей с кодирующей областью последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид.

"Функционально связанный" определяют в настоящем описании как конфигурацию, в которой контролирующая последовательность соответствующим образом располагается (например, в функциональной зависимости) в положении относительно представляющего интерес полинуклеотида таким образом, что контролирующая последовательность направляет или регулирует экспрессию полинуклеотида, кодирующего представляющий интерес полипептид.

"Промоторная последовательность" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которую распознает клетка-хозяин для экспрессии представляющего интерес полинуклеотида, такого как кодирующего последовательность. Промоторная последовательность содержит последовательности регуляции транскрипции, которые опосредуют экспрессию представляющего интерес полинуклеотида. Промотор может представлять собой любую последовательность нуклеиновой кислоты, которая обладает транскрипционной активностью в выбранной клетке-хозяине, включая мутантные, усеченные и гибридные промоторы, и ее можно получать из генов, кодирующих внеклеточные или внутриклеточные полипептиды, гомологичные или гетерологичные по отношению к клетке-хозяину.

"Подходящие условия реакции" относятся к таким условиям в реакционном растворе ферментативной конверсии (например, диапазонам нагрузки фермента, нагрузки субстрата, температур, pH, к буферам, вспомогательным растворителям и т.д.), при которых полипептид PAL по настоящему изобретению способен преобразовывать субстрат до желаемого соединения-продукта. Иллюстративные "подходящие условия реакции" предоставлены в настоящем описании (см., раздел "Примеры").

"Нагрузка", такая как в "нагрузке соединением" или "нагрузке ферментом", относится к концентрации или количеству компонента в реакционной смеси в начале реакции. "Субстрат" в отношении способа реакции ферментативной конверсии относится к соединению или молекуле, на которое действует полипептид PAL. "Продукт" в отношении способа ферментативной конверсии относится к соединению или молекуле, получаемой в результате действия полипептида PAL на субстрат.

Как используют в настоящем описании, термин "культивирование" относится к выращиванию популяции клеток микроорганизмов в подходящих условиях с использованием любой подходящей среды (например, жидкости, геля или твердого вещества).

Рекомбинантные полипептиды (например, варианты фермента PAL) можно получать любыми подходящими способами, известными в данной области. Например, существует широкий спектр различных техник мутагенеза, хорошо известных специалистам в данной области. Кроме того, наборы для мутагенеза также являются доступными от многих коммерческих поставщиков в области молекулярной биологии. Доступными являются способы проведения конкретных замен в определенных аминокислотах (сайт-направленных), конкретных или случайных мутаций в локализованной области гена (область-специфических) или случайный мутагенез на всем протяжении гена (например, насыщающий мутагенез).

Многие подходящие способы получения вариантов фермента известны специалистам в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, сайт-специфический мутагенез одноцепочечной ДНК или двухцепочечной ДНК с использованием ПЦР, касетный мутагенез, синтез генов, ПЦР со сниженной точностью, перестановка и химический насыщающий мутагенез или любой другой известный в данной области подходящий способ. Неограничивающие примеры способов, используемых для конструирования ДНК и белка, предоставлены в следующих патентах США №№: 6117679; 6420175; 6376246; 6586182; 7747391; 7747393; 7783428 и 8383346. После получения вариантов можно проводить их скрининг на любое желаемое свойство (например, высокую или повышенную активность или низкую или пониженную активность, повышенную термическую активность, повышенную термостабильность и/или стабильность к кислому pH и т.д.). В некоторых вариантах осуществления находят применения "рекомбинантные полипептиды PAL" (также обозначаемые в настоящем описании как "сконструированные полипептиды PAL", "варианты ферментов PAL" и "варианты PAL").

Как используют в настоящем описании, "вектор" представляет собой конструкцию ДНК для введения последовательности ДНК в клетку. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой экспрессирующий вектор, который является функционально связанным с подходящей контролирующей последовательностью, способной обеспечивать экспрессию у подходящего хозяина полипептида, кодируемого в последовательности ДНК. В некоторых вариантах осуществления "экспрессирующий вектор" содержит промоторную последовательность, функционально связанную с последовательностью ДНК (например, трансген) для направления экспрессии в клетке-хозяине, а в некоторых вариантах осуществления также содержит последовательность терминации транскрипции.

Как используют в настоящем описании, термин "экспрессия" включает любой этап, включающий продукцию полипептида, включая, но не ограничиваясь ими, транскрипцию, посттранскрипционную модификацию, трансляцию и посттрансляционную модификацию. В некоторых вариантах осуществления термин также включает секрецию полипептида клеткой.

Как используют в настоящем описании, термин "способы" относится к продукции белков и/или других соединений клетками. Следует понимать, что термин включает любой этап, вовлеченный в продукцию полипептидов, включая, но не ограничиваясь ими, транскрипцию, посттранскрипционную модификацию, трансляцию и посттрансляционную модификацию. В некоторых вариантах осуществления термин также включает секрецию полипептида клеткой.

Как используют в настоящем описании, аминокислота или нуклеотидная последовательность (например, промоторная последовательность, сигнальный пептид, терминирующая последовательность и т.д.) является "гетерологичной" другой последовательности, с которой она является функционально связанной, если две последовательности не являются связанными в природе.

Как используют в настоящем описании, термины "клетка-хозяин" и "штамм-хозяин" относятся к подходящим хозяевам для экспрессирующих векторов, содержащих ДНК, предоставленную в настоящем описании (например, полинуклеотидные последовательности, кодирующие по меньшей мере один вариант AvPAL). В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева представляют собой прокариотические или эукариотические клетки, которые трансформировали или трансфицировали векторами, сконструированными с использованием технологий рекомбинантной ДНК, как известно в данной области.

Термин "аналог" означает полипептид, обладающий более 70% идентичностью последовательности, но менее чем 100% идентичностью последовательности (например, более 75, 78, 80, 83, 85, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентичностью последовательности) с эталонным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления аналоги включают неприродные аминокислотные остатки, включая, но не ограничиваясь ими, гомоаргинин, орнитин и норвалин, а также природные аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления аналоги также включают один или более D-аминокислотных остатка и непептидные связи между двумя или более аминокислотными остатками.

Термин "терапевтический" относится к соединению, вводимому индивидууму, который проявляет признаки или симптомы патологии, обладающему благоприятными или желаемыми медицинскими эффектами.

Термин "фармацевтическая композиция" относится к композиции, подходящей для фармацевтического использования у являющегося млекопитающим индивидуума (например, человека), содержащей фармацевтически эффективное количество сконструированного полипептида PAL, предусматриваемое изобретением, и приемлемый носитель.

Термин "эффективное количество" означает количество, достаточное для оказания желаемого результата. Специалист в данной области может определять эффективное количество с использованием общепринятого экспериментирования.

Термины "выделенный" и "очищенный" используют для обозначения молекулы (например, выделенной нуклеиновой кислоты, полипептида и т.д.) или другого компонента, который удаляют по меньшей мере из одного другого компонента, с которым он является связанным в природе. Термин "очищенный" не требует абсолютной чистоты, наоборот он предназначен для относительного определения.

Термин "индивидуум" включает млекопитающих, таких как люди, не являющиеся человеком приматы, домашний скот, животные-компаньоны и лабораторные животные (например, грызуны и зайцеоб-

разные). Следует понимать, что термин включает как особей женского пола, так и мужского пола.

Как используют в настоящем описании, термин "пациент" означает любого индивидуума, у которого проводят оценку, лечение заболевания, или который страдает заболеванием.

Термин "грудной ребенок" относится к ребенку в возрасте от первого месяца после рождения приблизительно до одного года. Как используют в настоящем описании, термин "новорожденный" относится к ребенку в период от рождения до 28 суток жизни. Термин "недоношенный ребенок" относится к грудному ребенку, рожденному после двадцатой недели беременности, еще до полного срока, как правило, массой от ~500 до ~2499 г при рождении. "Грудной ребенок с очень низкой массой тела при рождении" представляет собой грудного ребенка с массой тела менее 1500 г при рождении.

Как используют в настоящем описании, термин "ребенок" относится к индивидууму, который не достиг совершеннолетия для согласия на лечение или исследовательские процедуры. В некоторых вариантах осуществления термин относится к индивидууму в возрасте от рождения до пубертатного периода.

Как используют в настоящем описании, термин "совершеннолетний человек" относится к индивидууму, который достиг совершеннолетия для соответствующей юрисдикции (например, возраста 18 лет в Соединенных Штатах Америки). В некоторых вариантах осуществления термин относится к любому выросшему зрелому организму. В некоторых вариантах осуществления термин "молодой совершеннолетний человек" относится к индивидууму в возрасте менее 18 лет, но который достиг половой зрелости.

Как используют в настоящем описании, "композиция" и "состав" содержат продукты, содержащие по меньшей мере одну сконструированную PAL по настоящему изобретению, предназначенную для любого подходящего использования (например, фармацевтические композиции, пищевые/питательные добавки, корма и т.д.).

Термины "введение" и "введение композиции" означает предоставление композиции по настоящему изобретению индивидууму (например, индивидууму, страдающему последствиями PKU).

Термин "носитель" при использовании в отношении фармацевтической композиции означает любой стандартный фармацевтический носитель, буферы и эксципиенты, такие как стабилизаторы, консерванты и адъюванты.

Термин "фармацевтически приемлемый" означает вещество, которое можно вводить индивидууму, не вызывая какого-либо нежелательного биологического действия или вредного взаимодействия с любым из компонентов, в котором оно содержится, и которое обладает желаемой биологической активностью.

Как используют в настоящем описании, термин "эксципиент" относится к любой фармацевтически приемлемой добавке, носителю, разбавителю, адъюванту или другому ингредиенту, отличному от активного фармацевтического ингредиента (API, например, сконструированных полипептидов PAL по настоящему изобретению). Эксципиенты, как правило, вводят для целей формулирования и/или введения.

Термин "терапевтически эффективное количество" при использовании по отношению к симптомам заболевания/состояния относится к количеству и/или концентрации соединения (например, сконструированным полипептидам PAL), которая улучшает, замедляет или устраняет один или более симптомов заболевания/состояния или предотвращает или отсрочивает начало симптома(ов) (например, PKU). В некоторых вариантах осуществления термин используют по отношению к количеству композиции, которое вызывает биологический (например, медицинский) ответ ткани, системы или являющегося животным индивидуума, который выявляет исследователь, врач, ветеринар или другой практикующий врач.

Термин "терапевтически эффективное количество" при использовании по отношению к заболеванию/состоянию относится к количеству и/или концентрации композиции, которая улучшает, ослабляет или устраняет заболевание/состояние.

Следует понимать, что термины "лечащий", "лечить" и "лечение" включают превентивное (например, профилактическое), а также паллиативное лечение.

Сконструированные полипептиды PAL.

Исходные полипептиды PAL, из которых выделяют сконструированные полипептиды PAL по изобретению, включают бактериальные штаммы, такие как *Anabaena* (например, *A. variabilis*), *Nostoc* (например, *N. punctiforme*), *Rhodospiridium* (например, *R. toruloides*), *Streptomyces* (например, *S. maritimus* или *S. verticillatus*), *Oscillatoria* sp., *Gloeocapsa* sp. и *Rivularia* sp. Ферменты PAL из этих штаммов идентифицированы и хорошо известны. Гомологичные последовательности фермента из *Anabaena* (*A. variabilis*) ATCC 29413 и NCBI YP_324488.1; *Nostoc* (*N. punctiforme*) ATCC 29133 и NCBI YP_00186563.1; *Oscillatoria* sp. PCC 6506 и NCBI ZP_07108482.1 и *Gloeocapsa* sp. PCC7428 и NCBI YP_007127054.1 приведены на фиг. 1. Фенилаланин/гистидин-аммиак-лиаза *Nostoc punctiforme* "NpPHAL" (NCBI YP_00186563.1 (SEQ ID NO: 30); гистидин-аммиак-лиаза *Rivularia* sp. "RspHAL" (NCBI YP_007056096.1 (SEQ ID NO: 31); гистидин-аммиак-лиаза *Oscillatoria* sp. "Osp HAL" (NCBI YP_07108482.1 (SEQ ID NO: 32) и гистидин-аммиак-лиаза *Gloeocapsa* sp. "GspHAL" (NCBI YP_007127054.1) (SEQ ID NO: 33) обладают более чем 70% гомологией с AvPAL (SEQ ID NO: 4).

Кроме того, когда конкретный вариант PAL (т.е. сконструированный полипептид PAL) указывают посредством ссылки на модификацию конкретных аминокислотных остатков в последовательности PAL дикого типа или эталонной PAL, следует понимать, что в настоящее описание включены варианты дру-

гой PAL, модифицированной в эквивалентном положении(ях) (как определяют на основании оптимального выравнивания аминокислотных последовательностей между соответствующими аминокислотными последовательностями). В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид PAL получают из любого из перечисленных полипептидов из указанных выше бактериальных штаммов (т.е. *Nostoc* [*N. punctiforme*], *Rhodospiridium* [*R. toruloides*], *Streptomyces* [*S. maritimus* или *S. verticillatus*], *Oscillatoria* sp., *Gloeocapsa* sp и *Rivularia* sp.). В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полипептид PAL по настоящему изобретению содержит консервативный активный центр Ala167-Ser168-Gly169 и обладает по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL обладают не только активностью PAL, а также активностью в отношении субстратов тирозина и/или гистидина.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL получают культивированием микроорганизма, содержащего по меньшей мере одну полинуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один сконструированный полипептид PAL в условиях, которые являются благоприятными для продукции сконструированного полипептида PAL. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид PAL в дальнейшем выделяют из получаемой среды для культивирования и/или клеток.

Настоящее изобретение относится к иллюстративным сконструированным полипептидам PAL, обладающим активностью PAL. В примерах приведены таблицы, в которых представлена информация о структуре последовательностей, корреляции конкретных признаков аминокислотной последовательности с функциональной активностью сконструированных полипептидов PAL. Эта информация о структурно-функциональной корреляции приведена в форме конкретных различий аминокислотных остатков относительно эталонного сконструированного полипептида SEQ ID NO: 4, а также связанных данных экспериментально определяемой активности для иллюстративных сконструированных полипептидов PAL.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL по настоящему изобретению, обладающие активностью PAL, содержат:

- a) аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 4;
- b) различие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 4 в одном или более положений аминокислот, и
- c) которые обладают улучшенным свойством, выбранным из i) повышенной каталитической активности, ii) сниженной протеолитической чувствительности, iii) повышенной устойчивости к кислому pH, iv) сниженной агрегации или сочетания любых из i), ii), iii) или iv), по сравнению с эталонной последовательностью.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, обладающие по меньшей мере одним улучшенным свойством, обладают по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или большей идентичностью аминокислотных последовательностей с SEQ ID NO: 4, и различием аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 4 в одном или более положений аминокислот (таких как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 20 или более положения аминокислот по сравнению с SEQ ID NO: 4 или последовательность, обладающей по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или большей идентичностью аминокислотных последовательностей с SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления различие остатка по сравнению с SEQ ID NO: 4 в одном или более положений включают по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более консервативных аминокислотных замены. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид PAL представляет собой полипептид, указанный в таблицах, приведенных в примерах.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, обладающие по меньшей мере одним улучшенным свойством, обладают по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или большей идентичностью аминокислотных последовательностей с SEQ ID NO: 4 и различием аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 4 в одном или более положений аминокислот, выбранных из X39, X54, X59, X73, X91, X158, X112, X134, X180, X195, X240, X243, X245, X256, X257, X270, X290, X304, X305, X307, X308, X326, X349, X353, X364, X394, X399, X400, X404, X407, X443, X453, X459, X460, X463, X474, X509, X521, X522, X524, X528, X546, X564 или любой их комбинации, при оптимальном выравнивании с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления различие аминокислот существует в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или

20 или более положений аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, обладающие по меньшей мере одним улучшенным свойством, обладают по меньшей мере 85% (по меньшей мере 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4 и обладают различием аминокислотного остатка в положении H307 и необязательно различием аминокислотного остатка в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более положений аминокислот. В некоторых вариантах осуществления различие аминокислотного остатка в положении 307 представляет собой H307/G/Q/M.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, обладающие по меньшей мере одним улучшенным свойством, обладают по меньшей мере 85% (по меньшей мере 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4 и обладают по меньшей мере одним различием аминокислотного остатка, выбранного из комбинации одного или более A39, T54, G59, S73, A91, Y158, S180, K195, A112, R134, Q240, T243, I245, A256, L257, N270, N290, Y304, R305, H307, E308, I326, L349, D353, L364, A394, S399, N400, P404, L407, F443, N453, Y459, T460, T463, N474, E509, Q521, K522, T524, P528, S546 и/или P564. В некоторых дополнительных вариантах осуществления существуют различия аминокислотного остатка в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более положений аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, обладающие улучшенным свойством, обладают по меньшей мере 85% (по меньшей мере 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4 и обладают различием аминокислотного остатка, выбранного из комбинации одного или более A39V, T54K, G59R, S73K, A112C, R134Q, A91V, Y158H, S180A, K195E, Q240R/W, T243I/L, I245L, A256G, L257W/A, N270K, N290G, Y304H, R305M, H307G/Q/M, E308Q, I326F, L349M, D353A/N, L364Q, A394V, S399N, N400K, P404A, L407V, F443H, N453G, Y459F, T460G, T463N, N474Q, E509L, Q521K/S, K522Y/F/N, T524S, P528L, S546R и P564G/L/M, при оптимальном выравнивании с SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления различие аминокислотного остатка выбрано из комбинации одного или более A39V, A91V, A256G, N290G, A394V, S399N, P404A, L407V, K522Y/F/N и/или T524S, при оптимальном выравнивании с SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к функциональным фрагментам сконструированных полипептидов PAL. В некоторых вариантах осуществления функциональные фрагменты содержат по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% активностью сконструированного полипептида PAL, из которого их получают (т.е. исходного сконструированной PAL). В некоторых вариантах осуществления функциональные фрагменты обладают по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% исходной последовательности сконструированной PAL. В некоторых вариантах осуществления проводят усечение функционального фрагмента менее чем на 5, менее чем на 10, менее чем на 15, менее чем на 10, менее чем на 25, менее чем на 30, менее чем на 35, менее чем на 40, менее чем на 45 и менее чем на 50 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к функциональным фрагментам сконструированных полипептидов PAL. В некоторых вариантах осуществления функциональные фрагменты обладают по меньшей мере приблизительно 95, 96, 97, 98 или 99% активностью сконструированного полипептида PAL, из которого их получают (т.е. исходного сконструированной PAL). В некоторых вариантах осуществления функциональные фрагменты содержат по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% исходной последовательности сконструированной PAL. В некоторых вариантах осуществления проводят усечение функционального фрагмента менее чем на 5, менее чем на 10, менее чем на 15, менее чем на 10, менее чем на 25, менее чем на 30, менее чем на 35, менее чем на 40, менее чем на 45, менее чем на 50, менее чем на 55, менее чем на 60, менее чем на 65 или менее чем на 70 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, обладающие по меньшей мере одним улучшенным свойством, обладают по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или большей идентичностью аминокислотных последовательностей с SEQ ID NO: 6 и различием аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 6 в одном или более положений аминокислот (таких как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15 или более положений аминокислот) по сравнению с SEQ ID NO: 6 или последовательностью, обладающей по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или большей идентичностью аминокислотных последовательностей с

или более положений аминокислот) по сравнению с SEQ ID NO: 24 или последовательностью, обладающей по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или большей идентичностью аминокислотных последовательностей с SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления сконструированные PAL обладают по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 24 и обладают различием аминокислот по сравнению с SEQ ID NO: 24 по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более положений аминокислот. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид PAL состоит из последовательности SEQ ID NO: 24.

Варианты со сниженной чувствительностью к протеолизу.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL по настоящему изобретению обладают активностью PAL, обладают сниженной чувствительностью к протеолизу и а) содержат аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 4; б) обладают различием аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 4 в одном или более положений аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, которые обладают сниженной чувствительностью к протеолизу, обладают по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или большей идентичностью аминокислотных последовательностей с SEQ ID NO: 4 и различием аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 4 в одном или более положений аминокислот (таких как в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 20 или более положений аминокислот по сравнению с SEQ ID NO: 4 или последовательностью, обладающей по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или большей идентичностью аминокислотных последовательностей с SEQ ID NO: 4).

В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, которые обладают сниженной чувствительностью к протеолизу обладают по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или большей идентичностью аминокислотных последовательностей с SEQ ID NO: 4 и различием аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 4 в одном или более положений аминокислот выбраны из X39, X54, X59, X73, X91, X158, X112, X134, X180, X195, X240, X243, X245, X256, X257, X270, X290, X304, X305, X307, X308, X326, X349, X353, X364, X394, X399, X400, X404, X407, X443, X453, X459, X460, X463, X474, X509, X521, X522, X524, X528, X546, X564 или любого их сочетания, при оптимальном выравнивании с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления различие аминокислот существует в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 или более положений аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, которые обладают сниженной чувствительностью к протеолизу, обладают по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4 и обладают различием аминокислотного остатка в положении X307, X326, X460, X307 и/или X528 и необязательно различием аминокислотного остатка в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более положений аминокислот. В некоторых вариантах осуществления различие аминокислотного остатка выбрано из Y304H/W, R305L/M, H307G/M/Q, I326F, Q240W, T460G, P528L и любого сочетания этих замен при выравнивании с SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, которые обладают сниженной чувствительностью к протеолизу, обладают по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или большей идентичностью аминокислотных последовательностей с любой из SEQ ID NO: 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 и/или 24 или ее функциональным фрагментом и различием аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 и/или 24 в одном или более положений аминокислот (таких как в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15 или более положений аминокислот) по сравнению с SEQ ID NO: 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 и/или 24, или последовательностью, обладающей по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или большей идентичностью аминокислотных последовательностей с SEQ ID NO: 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 и/или 24. В некоторых вариантах осуществления сконструированная PAL обладает по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 и/или 24 и обладает различием аминокислот по

сравнению с SEQ ID NO: 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 и/или 24 по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более положений аминокислот. В некоторых вариантах осуществления PAL содержит или состоит из последовательности из SEQ ID NO: 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 и/или 24.

В некоторых вариантах осуществления протеолитическая чувствительность сконструированных полипептидов PAL является сниженной по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% от протеолитической чувствительности PAL дикого типа (например, AvPAL, содержащей SEQ ID NO: 4) или по сравнению с эталонным полипептидом PAL, по существу, в одних и тех же условиях. Протеолитическую активность можно измерять любыми подходящими известными в данной области способами, включая, но не ограничиваясь ими, способы, описанные в примерах.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, обладающие сниженной чувствительностью к протеолизу, обладают сниженной чувствительностью к композиции, содержащей одну или более протеаз, включая, но не ограничиваясь ими, пепсин, трипсин, химотрипсин, карбоксипептидазу A и B, пептидазы (например, аминопептидазу, дипептидазу и энтеропептидазу), когда эталонную PAL и сконструированную PAL, обладающую сниженной чувствительностью сравнивают и подвергают действию, по существу, одному и тому же количеству и типу протеазы, по существу, в одних и тех же условиях.

В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид PAL, обладающий сниженной чувствительностью к протеолизу, обладает уровнями ферментативной активности, которые являются приблизительно в 1,0, 2, 5, 10, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200 раз или более больше ферментативной активности эталонной PAL (например, AvPAL). В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды обладают большей ферментативной активностью по сравнению с эталонной PAL, когда активность измеряют при диапазоне pH от 4,5 до 7,5; когда активность измеряют при диапазоне pH от 4,5 до 6,5; когда активность измеряют при диапазоне pH от 5,0 до 7,5; когда активность измеряют при диапазоне pH от 5,0 до 6,5; когда активность измеряют при диапазоне pH от 5,5 до 7,5 и/или также когда активность измеряют при диапазоне pH от 5,5 до 6,5. В некоторых других вариантах осуществления значения K_m сконструированных полипептидов PAL находятся в диапазоне от 1 мкМ до 5 мМ.

Варианты с повышенной устойчивостью к кислому pH.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL по изобретению обладают активностью PAL, являются устойчивыми к кислым уровням pH и а) содержат аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 4 или ее фрагментом; и б) обладают различием аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 4 в одном или более положений аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, которые обладают повышенной устойчивостью к кислому pH по сравнению с AvPAL дикого типа и/или другого эталонного полипептида, обладают по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или большей идентичностью аминокислотных последовательностей с SEQ ID NO: 4 и различием аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 4 в одном или более положений аминокислот (таких как в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 20 или более положений аминокислот по сравнению с SEQ ID NO: 4 или последовательностью, обладающей по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или большей идентичностью аминокислотных последовательностей с SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, которые обладают повышенной устойчивостью к кислому pH по сравнению с AvPAL дикого типа и/или другим эталонным полипептидом, обладают по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или большей идентичностью аминокислотных последовательностей с SEQ ID NO: 4 и различием аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 4 в одном или более положений аминокислот выбраны из X39, X54, X59, X73, X91, X158, X112, X134, X180, X195, X240, X243, X245, X256, X257, X270, X290, X304, X305, X307, X308, X326, X349, X353, X364, X394, X399, X400, X404, X407, X443, X453, X459, X460, X463, X474, X509, X521, X522, X524, X528, X546, X564 или любого их сочетания при оптимальном выравнивании с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления различие аминокислот существует в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 или более положений аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, которые обладают повышенной устойчивостью к кислому pH по сравнению с AvPAL дикого типа и/или другого эталонного

полипептида, обладают по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4 и обладают различием аминокислотного остатка в положении X39, X54, X59, X73, X91, X158, X112, X134, X180, X195, X240, X243, X245, X256, X257, X270, X290, X304, X305, X307, X308, X326, X349, X353, X364, X394, X399, X400, X404, X407, X443, X453, X459, X460, X463, X474, X509, X521, X522, X524, X528, X546, X564 или любого их сочетания и необязательно различием аминокислотного остатка в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более положений аминокислот. В некоторых вариантах осуществления различие аминокислотного остатка существует в A39, T54, G59, S73, A91, Y158, S180, K195, A112, R134, Q240, T243, I245, A256, L257, N270, N290, Y304, R305, H307, E308, I326, L349, D353, L364, A394, S399, N400, P404, L407, F443, N453, Y459, T460, T463, N474, E509, Q521, K522, T524, P528, S546 и/или P564 при выравнивании с SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, которые обладают повышенной устойчивостью к кислому pH, обладают по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4 и обладают различием аминокислотного остатка в одном или более положений A39V, T54K, G59R, S73K, A112C, R134Q, A91V, Y158H, S180A, K195E, Q240R/W, T243I/L, I245L, A256G, L257W/A, N270K, N290G, Y304H, R305M, H307G/Q/M, E308Q, I326F, L349M, D353A/N, L364Q, A394V, S399N, N400K, P404A, L407V, F443H, N453G, Y459F, T460G, T463N, N474Q, E509L, Q521K/S, K522Y/F/N, T524S, P528L, S546R и/или P564G/L/M при выравнивании с SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления, когда все условия другого анализа являются, по существу, одинаковыми, сконструированные полипептиды PAL, обладающие повышенной устойчивостью к кислому pH по сравнению с эталонным полипептидом PAL, обладают повышенной устойчивостью к pH в диапазоне от 1,5 до 6,5; от 1,5 до 5,0; от 2,0 до 5,5; от 3,0 до 6,8; от 3,0 до 5,5; от 4,0 до 6,5; от 4,0 и 4,5; от 4,5 до 5,0; от 4,5 до 5,5; от 4,5 до 6,0; от 4,5 до 6,5; от 5,0 до 6,5; от 5,0 до 6,0; от 5,0 до 5,5; от 5,5 до 6,0; от 6,0 до 6,5 и/или от 6,5 до 7,0. В некоторых вариантах осуществления повышенная устойчивость к кислому pH проявляется при pH от приблизительно 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 и/или 6,5.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, которые обладают повышенной устойчивостью к кислому pH, также обладают большей активностью PAL по сравнению с эталонной PAL при измерении стандартным анализом. Любой подходящий анализ находит применение в настоящем изобретении, включая, но не ограничиваясь ими, анализа, предоставленные в настоящем описании.

Дополнительно предусмотрено, что любой из иллюстративных сконструированных полипептидов (т.е. вариант № 1 - вариант № 1010) находит применение в качестве начальной аминокислотной последовательности для синтеза других сконструированных полипептидов PAL, например, последующими циклами эволюции путем добавления новых комбинаций отличных различий аминокислот от других полипептидов и других положений остатка, описываемых в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления получают дополнительные улучшения путем введения различий аминокислот в положения остатков, которые поддерживают как незаряженные на всем протяжении ранних циклов эволюции. Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено каким-либо конкретным способом получения сконструированных полипептидов PAL, т.к. любой подходящий способ находит применение, включая, но не ограничиваясь ими, способы, предоставленные в настоящем описании.

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

Настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим сконструированные полипептиды PAL, описываемые в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды функционально связывают с одной или более гетерологичных регуляторных последовательностей, которые регулируют экспрессию гена, для получения рекомбинантного полинуклеотида, способного экспрессировать полипептид. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующие конструкции, содержащие по меньшей мере один гетерологичный полинуклеотид, кодирующий сконструированный полипептид(ы) PAL, вводят в подходящие клетки-хозяева для экспрессии соответствующего полипептид(ов) PAL.

Как будет понятно специалисту в данной области, доступность последовательности белка и знание кодонов, соответствующих различным аминокислотам, обеспечивают описание всех полинуклеотидов, способных кодировать целевые полипептиды. Врожденность генетического кода, когда одни и те же аминокислоты кодируются альтернативными или синонимичными кодонами, обеспечивает возможность получения очень большого числа нуклеиновых кислот, которые все кодируют сконструированный полипептид PAL. Таким образом, настоящее изобретение относится к способам и композициям для получения каждого и всех возможных изменений полинуклеотидов PAL, которые можно получать, которые кодируют полипептиды PAL, описываемые в настоящем описании, отбором комбинаций на основании выбора возможных кодонов, и считают, что все такие изменения конкретно описаны для любого полипептида, описываемого в настоящем описании, включая аминокислотные последовательности, приведенные в примерах (например, в различных таблицах).

В некоторых вариантах осуществления кодоны предпочтительно оптимизируют для использования

выбранной клеткой-хозяином для продукции белка. Например, предпочтительные кодоны, используемые в бактериях, как правило, используют для экспрессии в бактериях. Таким образом, кодон-оптимизированные полинуклеотиды, кодирующие сконструированные полипептиды PAL, содержат предпочтительные кодоны приблизительно в 40, 50, 60, 70, 80, 90 или более 90% положений кодонов полноразмерной кодирующей области.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид PAL кодирует сконструированный полипептид, обладающий активностью PAL, со свойствами, описываемыми в настоящем описании, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичностью с эталонной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 и/или 23, или аминокислотную последовательность любого варианта (например, вариантов, предоставленных в примерах) и обладает одним или более различий остатков по сравнению с эталонным полинуклеотидом SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 и/или 23 или аминокислотной последовательностью любого варианта, как описано в примерах (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более положений аминокислотного остатка). В некоторых вариантах осуществления эталонная последовательность выбрана из SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 и/или 23.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид PAL кодирует сконструированный полипептид, обладающий активностью PAL, со свойствами, описываемыми в настоящем описании, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичностью последовательности с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 4 и одним или более различий остатков по сравнению с SEQ ID NO: 4 в положениях остатков из X39, X54, X59, X73, X91, X158, X112, X134, X180, X195, X240, X243, X245, X256, X257, X270, X290, X304, X305, X307, X308, X326, X349, X353, X364, X394, X399, X400, X404, X407, X443, X453, X459, X460, X463, X474, X509, X521, X522, X524, X528, X546 и/или X564 при оптимальном выравнивании с полипептидом SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий сконструированные полипептиды PAL, содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из полинуклеотидной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 и/или 23. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий сконструированный полипептид PAL, обладает по меньшей мере 80, 85, 90, 93, 95, 96, 97, 98, 99% идентичностью нуклеотидных остатков с SEQ ID NO: 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 и/или 23.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды способны гибридизироваться в условиях с высокой жесткостью с эталонной полинуклеотидной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 и/или 23, или ее комплемента или полинуклеотидной последовательностью, кодирующей любой из вариантов полипептидов PAL, предоставленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, способный гибридизироваться в условиях с высокой жесткостью, кодирует полипептид PAL, содержащий аминокислотную последовательность, которая обладает одним или более различиями остатков по сравнению с SEQ ID NO: 4 в положениях остатков, выбранных из X39, X54, X59, X73, X91, X158, X112, X134, X180, X195, X240, X243, X245, X256, X257, X270, X290, X304, X305, X307, X308, X326, X349, X353, X364, X394, X399, X400, X404, X407, X443, X453, X459, X460, X463, X474, X509, X521, X522, X524, X528, X546 и/или X564.

В некоторых вариантах осуществления выделенный полинуклеотид, кодирующий любой из сконструированных полипептидов PAL в настоящем описании, обрабатывают различными способами для облегчения экспрессии полипептида PAL. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, кодирующие полипептиды PAL, содержат экспрессирующие векторы, где содержится одна или более контролируемых последовательностей для регуляции экспрессии полинуклеотидов PAL и/или полипептидов. Обработка выделенного полинуклеотида перед его встраиванием в вектор может являться желательной или необходимой в зависимости от используемого экспрессирующего вектора. Техники модификации полинуклеотидов и последовательностей нуклеиновых кислот способами рекомбинантных ДНК хорошо известны в данной области. В некоторых вариантах осуществления контролирующие последовательности содержат наряду с другими промоторы, лидерные последовательности, последовательности полиаденилирования, пропептидные последовательности, сигнальные пептидные последовательности и терминаторы транскрипции. В некоторых вариантах осуществления подходящие промоторы выбраны в зависимости от выбора клеток-хозяев. Для бактериальных клеток-хозяев подходящие промоторы для направления транскрипции конструкций нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению включают, но не ограничиваются ими, промоторы, получаемые из *lac*-оперона *E. coli*, гена *ara* генома *Streptomyces coelicolor* (*dagA*), гена левансахаразы *Bacillus subtilis* (*sacB*), гена α -амилазы *Bacillus licheniformis* (*amyL*), гена мальтогенной амилазы *Bacillus stearothermophilus* (*amyM*), гена α -амилазы *Bacillus amyloliquefaciens* (*amyQ*), гена пенициллиназы *Bacillus licheniformis* (*penP*), генов *xylA* и *xylB* *Bacillus subtilis* и прокариотического гена β -лактамазы (см., например, Villa-Kamaroff et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 75:3727-3731 [1978]), а также промотора *tac* (см., например, DeBoer et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 80: 21-25 [1983]).

Иллюстративные промоторы для клеток-хозяев нитевидных грибов, включают, но не ограничиваются ими, промоторы, получаемые из генов ТАКА-амилазы *Aspergillus oryzae*, аспарагиновой протеиназы *Rhizomucor miehei*, нейтральной α -амилазы *Aspergillus niger*, кислотостойкой α -амилазы *Aspergillus niger*, глюкоамилазы *Aspergillus niger* или *Aspergillus awamori* (glaA), липазы *Rhizomucor miehei*, щелочной протеазы *Aspergillus oryzae*, триозофосфатизомеразы *Aspergillus oryzae*, ацетамидазы *Aspergillus nidulans* и трипсиноподобной протеазы *Fusarium oxysporum* (см., например, WO 96/00787), а также промотора NA2-tpi (гибрида промоторов из генов нейтральной α -амилазы *Aspergillus niger* и триозофосфатизомеразы *Aspergillus oryzae*) и их мутантные, усеченные и гибридные промоторы. Иллюстративные промоторы дрожжевой клетки можно получать из генов енолазы *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), галактокиназы *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), алкогольдегидрогеназы/глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2) и 3-фосфоглицераткиназы *Saccharomyces cerevisiae*. Другие пригодные промоторы для дрожжевых клеток-хозяев известны в данной области (см., например, Romanos et al., Yeast, 8:423-488 [1992]).

В некоторых вариантах осуществления контролирующая последовательность также представляет собой подходящую последовательность терминатора транскрипции (т.е. последовательность, распознаваемую клеткой-хозяином для терминации транскрипции). В некоторых вариантах осуществления терминирующая последовательность является функционально связанной с 3'-концом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид PAL. Любой подходящий терминатор, который является функциональным в выбираемой клетке-хозяине, находит применение в настоящем изобретении. Иллюстративные терминаторы транскрипции для клеток-хозяев нитевидных грибов можно получать из генов ТАКА-амилазы *Aspergillus oryzae*, глюкоамилазы *Aspergillus niger*, антранилатсинтазы *Aspergillus nidulans*, α -глюкозидазы *Aspergillus niger* и трипсиноподобной протеазы *Fusarium oxysporum*. Иллюстративные терминаторы для дрожжевых клеток-хозяев можно получать из генов енолазы *Saccharomyces cerevisiae*, цитохрома C *Saccharomyces cerevisiae* (CYC1) и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *Saccharomyces cerevisiae*. Другие пригодные терминаторы для дрожжевых клеток-хозяев являются известными в данной области (см., например, Romanos et al., выше).

В некоторых вариантах осуществления контролирующая последовательность также является подходящей лидерной последовательностью (т.е. нетранслируемой областью мРНК, которая является важной для трансляции клеткой-хозяином). В некоторых вариантах осуществления лидерная последовательность является функционально связанной с 5'-концом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид PAL. Любая подходящая лидерная последовательность, которая является функциональной в выбираемой клетке-хозяине, находит применение в настоящем изобретении. Иллюстративные лидерные последовательности для клеток-хозяев нитевидных грибов получают из генов ТАКА-амилазы *Aspergillus oryzae* и триозофосфатизомеразы *Aspergillus nidulans*. Подходящие лидерные последовательности для дрожжевых клеток-хозяев получают из генов енолазы *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), 3-фосфоглицераткиназы *Saccharomyces cerevisiae*, α -фактора *Saccharomyces cerevisiae* и алкогольдегидрогеназы/глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).

В некоторых вариантах осуществления контролирующая последовательность также является последовательностью полиаденилирования (т.е. последовательностью функционально связанной с 3'-концом последовательности нуклеиновой кислоты, и которая при транскрипции распознается клеткой-хозяином как сигнал добавления остатков полиаденозина к транскрибируемой мРНК). Любая подходящая последовательность полиаденилирования, которая является функциональной в выбираемой клетке-хозяине, находит применение в настоящем изобретении. Иллюстративные последовательности полиаденилирования для клеток-хозяев нитевидных грибов включают, но не ограничиваются ими, гены ТАКА-амилазы *Aspergillus oryzae*, глюкоамилазы *Aspergillus niger*, антранилатсинтазы *Aspergillus nidulans*, трипсиноподобной протеазы *Fusarium oxysporum* и α -глюкозидазы *Aspergillus niger*. Последовательности полиаденилирования, пригодные для дрожжевых клеток-хозяев, являются известными (см., например, Guo and Sherman, Mol. Cell. Bio., 15:5983-5990 [1995]).

В некоторых вариантах осуществления контролирующая последовательность также является сигнальным пептидом (т.е. кодирующей областью, которая кодирует аминокислотную последовательность, связанную с аминоконцом полипептида, и направляет кодируемый полипептид в секреторном пути клетки). В некоторых вариантах осуществления 5'-конец кодирующей последовательности нуклеиновой кислоты естественным образом содержит кодирующую область сигнального пептида, естественно связанного в рамке считывания трансляции с сегментом кодирующей области, кодирующей секретируемый полипептид. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления 5'-конец кодирующей последовательности содержит кодирующую область сигнального пептида, которая является чужеродной кодирующей последовательности. Любой подходящий сигнальный пептид, кодирующий область, которая направляет экспрессируемый полипептид в секреторном пути выбираемой клетки-хозяина, находит применение для экспрессии сконструированного полипептида(ов). Эффективные кодирующие области сигнального пептида для бактериальных клеток-хозяев представляют собой кодирующие области сигнальных пептидов, включают, но не ограничиваются ими, кодирующие области сигнальных пептидов, полу-

чаемые из генов мальтогенной амилазы *Bacillus* NCIB 11837, α -амилазы *Bacillus stearothermophilus*, субтилизина *Bacillus licheniformis*, β -лактамазы *Bacillus licheniformis*, нейтральных протеаз *Bacillus stearothermophilus* (nprT, nprS, nprM) и prsA *Bacillus subtilis*. Дополнительные сигнальные пептиды являются известными в данной области (см., например, Simonen and Palva, Microbiol. Rev., 57:109-137 [1993]). В некоторых вариантах осуществления эффективные кодирующие области сигнальных пептидов для клеток-хозяев нитевидных грибов включают, но не ограничиваются ими, кодирующие области сигнальных пептидов, получаемые из генов ТАКА-амилазы *Aspergillus oryzae*, нейтральной амилазы *Aspergillus niger*, глюкоамилазы *Aspergillus niger*, аспарагиновой протеиназы *Rhizomucor miehei*, целлюлазы *Humicola insolens* и липазы *Humicola lanuginosa*. Пригодные сигнальные пептиды для дрожжевых клеток-хозяев включают, но не ограничиваются ими, сигнальные пептиды из генов α -фактора *Saccharomyces cerevisiae* и инвертазы *Saccharomyces cerevisiae*.

В некоторых вариантах осуществления контролирующая последовательность также является кодирующей областью пропептида, которая кодирует аминокислотную последовательность, расположенную на аминоконце полипептида. Получаемый полипептид обозначают как "профермент", "прополипептид" или "зимоген". Пропептид можно преобразовывать до зрелого активного полипептида путем каталитического или аутокаталитического отщепления пропептида от прополипептида. Кодирующую область для пропептида можно получать из любого подходящего источника, включая, но не ограничиваясь ими, гены щелочной протеазы *Bacillus subtilis* (aprE), нейтральной протеазы *Bacillus subtilis* (nprT), α -фактора *Saccharomyces cerevisiae*, аспарагиновой протеиназы *Rhizomucor miehei* и лактазы *Myceliophthora thermophila* (см., например, WO 95/33836). В случае, когда содержатся области сигнального пептида и пропептида в аминоконце полипептида, область пропептида располагается после аминоконца полипептида, и область сигнального пептида располагается после аминоконца области пропептида.

В некоторых вариантах осуществления также используют регуляторные последовательности. Эти последовательности облегчают регуляцию экспрессии полипептида относительно роста клетки-хозяина. Примеры регуляторных систем представляют собой системы, приводят к тому, что экспрессия гена активируется или подавляется в ответ на химический или физический стимул, включая наличие регуляторного соединения. В прокариотических клетках-хозяевах, подходящие регуляторные последовательности включают, но не ограничиваются ими, системы-операторы lac, tac и trp. В дрожжевых клетках-хозяевах подходящие регуляторные системы включают, но не ограничиваются ими, систему ADH2 или систему GAL1. В нитевидных грибах подходящие регуляторные последовательности включают, но не ограничиваются ими, промотор ТАКА- α -амилазы, промотор глюкоамилазы *Aspergillus niger* и промотор глюкоамилазы *Aspergillus oryzae*.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному экспрессирующему вектору, содержащему полинуклеотид, кодирующий сконструированный полипептид PAL, и одну или более регулирующих экспрессию областей, таких как промотор и терминатор, точка начала репликации и т.д., в зависимости от типа хозяев, в которые их вводят. В некоторых вариантах осуществления различные последовательности нуклеиновых кислот и контролирующие последовательности, описываемые в настоящем описании, связывают друг с другом с получением рекомбинантных экспрессирующих векторов, которые содержат один или более подходящих участков рестрикции для обеспечения вставки или замены последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид PAL, в таких участках. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению экспрессируется встраиваемой последовательностью нуклеиновой кислоты или конструкцией нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность в подходящем векторе для экспрессии. В некоторых вариантах осуществления, включающих создание экспрессирующего вектора, кодирующая последовательность располагается в векторе таким образом, чтобы кодирующая последовательность являлась функционально связанной с подходящими контролирующими последовательностями для экспрессии.

Рекомбинантный экспрессирующий вектор может представлять собой любой подходящий вектор (например, плазмиду или вирус), который можно подходящим способом подвергать способам рекомбинантной ДНК, и который приводит к экспрессии полинуклеотидной последовательности PAL. Выбор вектора, как правило, зависит от совместимости вектора с клеткой-хозяином, в которую вектор необходимо вводить. Векторы могут представлять собой линейные плазмиды или замкнутые кольцевые плазмиды.

В некоторых вариантах осуществления экспрессирующий вектор представляет собой автономно реплицирующийся вектор (т.е. вектор, который существует как внехромосомная структурная единица, репликация которой не зависит от хромосомной репликации, такой как плазида, внехромосомный элемент, мини-хромосома или искусственная хромосома). Вектор может содержать любое средство для обеспечения саморепликации. В некоторых альтернативных вариантах осуществления вектор представляет собой вектор, который при введении в клетку-хозяин интегрируется в геном и реплицируется совместно с хромосомой(ами), в которую он был интегрирован. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления используют один вектор или плазмиду или два или более векторов или плазмид, которые со-

вместно содержат общую ДНК, которую необходимо вводить в геном клетки-хозяина и/или транспозон.

В некоторых вариантах осуществления экспрессирующий вектор содержит один или более селективируемых маркеров, которые обеспечивают простой отбор трансформированных клеток.

"Селективируемый маркер" представляет собой ген, продукт которого обеспечивает устойчивость к биоцидам или вирусам, устойчивость к тяжелым металлам, прототрофность ауксотрофам и т.п. Примеры бактериальных селективируемых маркеров включают, но не ограничиваются ими, гены *dal* из *Bacillus subtilis* или *Bacillus licheniformis* или маркеры, которые придают устойчивость к антибиотикам, такую как устойчивость к ампициллину, канамицину, хлорамфениколу или тетрациклину. Подходящие маркеры для дрожжевых клеток-хозяев включают, но не ограничиваются ими, *ADE2*, *HIS3*, *LEU2*, *LYS2*, *MET3*, *TRP1* и *URA3*. Селективируемые маркеры для применения в клетках-хозяевах нитевидных грибов включают, но не ограничиваются ими, *amdS* (ацетиламиноксидаза, например, из *A. nidulans* или *A. oryzae*), *argB* (орнитинкарбамоилтрансфераза), *bag* (фосфинотрицинацетилтрансфераза, например, из *S. hygroscopicus*), *hph* (гигромицинфосфотрансфераза), *niaD* (нитратредуктаза), *purG* (оротидин-5'-фосфатдекарбоксилаза, например, из *A. nidulans* или *A. oryzae*), *sC* (сульфатаденилтрансфераза) и *trpC* (антранилатсинтаза), а также их эквиваленты. В другом аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один сконструированный полипептид PAL по настоящему изобретению, где полинуклеотид(ы) является функционально связанным с одной или более контролирующими последовательностями для экспрессии сконструированного фермента(ов) PAL в клетке-хозяине. Клетки-хозяева, пригодные для использования для экспрессии полипептидов, кодируемых экспрессирующими векторами по настоящему изобретению, хорошо известны в данной области и включают, но не ограничиваются ими, бактериальные клетки, такие как клетки *E. coli*, *Vibrio fluvialis*, *Streptomyces* и *Salmonella typhimurium*; клетки грибов, такие как дрожжевые клетки (например, *Saccharomyces cerevisiae* или *Pichia pastoris* (№ доступа ATCC 201178)); клетки насекомых, такие как клетки *Drosophila S2* и *Spodoptera Sf9*; животные клетки, такие как клетки CHO, COS, BHK, 293 и клетки меланомы Боуэса, и растительные клетки. Иллюстративные клетки-хозяева также включают различные штаммы *Escherichia coli* (например, W3110 (Δ fluA) и BL21).

Таким образом, в другом аспекте настоящее изобретение относится к способам получения сконструированных полипептидов PAL, где способы включают культивирование клетки-хозяина, способного экспрессировать полинуклеотид, кодирующий сконструированный полипептид PAL в условиях, подходящих для экспрессии полипептида. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают этапы выделения и/или очистки полипептидов PAL, как описано в настоящем описании.

Подходящие среды для культивирования и условия роста для клеток-хозяев хорошо известны в данной области. Предусматривают, что в настоящем изобретении находит применение любой подходящий способ введения полинуклеотидов для экспрессии полипептидов PAL в клетках. Подходящие техники включают, но не ограничиваются ими, электропорацию, бомбардировку библистическими частицами, опосредованную липосомами трансфекцию, трансфекцию хлоридом кальция и слияние протопластов.

Сконструированные полипептиды PAL со свойствами, описываемыми в настоящем описании, можно получать подверганием полинуклеотида, кодирующего природный или сконструированный полипептид PAL любому подходящему мутагенезу и/или направленной эволюции известными в данной области способами, и/или как описано в настоящем описании. Иллюстративная техника направленной эволюции представляет собой мутагенез и/или перестановку ДНК (см., например, Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:10747-10751 [1994]; WO 95/22625, WO 97/0078, WO 97/35966, WO 98/27230, WO 00/42651, WO 01/75767 и патент США 6537746). Другие способы направленной эволюции, которые можно использовать, наряду с другими включают способ ступенчатой достройки (StEP), рекомбинацию *in vitro* (см., например, Zhao et al., Nat. Biotechnol., 16:258-261 [1998]), мутагенную ПЦР (см., например, Caldwell et al., PCR Methods Appl., 3:S136-S140 [1994]) и кассетный мутагенез (см., например, Black et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3525-3529 [1996]).

Способы мутагенеза и направленной эволюции можно легко применять к кодирующим PAL полинуклеотидам для получения библиотек вариантов, которые можно экспрессировать, проводить скрининг и анализировать. Любые подходящие способы мутагенеза и направленной эволюции находят применение в настоящем изобретении и хорошо известны в данной области (см., например, патенты США №№ 5605793, 5830721, 6132970, 6420175, 6277638, 6365408, 6602986, 7288375, 6287861, 6297053, 6576467, 6444468, 5,811238, 6117679, 6165793, 6180406, 6291242, 6995017, 6395547, 6506602, 6519065, 6506603, 6413774, 6573098, 6323030, 6344356, 6372497, 7868138, 5834252, 5928905, 6489146, 6096548, 6387702, 6391552, 6358742, 6482647, 6335160, 6653072, 6355484, 6,03,344, 6319713, 6613514, 6455253, 6579678, 6586182, 6406855, 6946296, 7534564, 7776598, 5837458, 6391640, 6309883, 7105297, 7795030, 6326204, 6251674, 6716631, 6528311, 6287862, 6335198, 6352859, 6379964, 7148054, 7629170, 7620500, 6365377, 6358740, 6406910, 6413745, 6436675, 6961664, 7430477, 7873499, 7702464, 7783428, 7747391, 7747393, 7751986, 6376246, 6426224, 6423542, 6479652, 6319714, 6521453, 6368861, 7421347, 7058515, 7024312, 7620502, 7853410, 7957912, 7904249 и все родственные не принадлежащие США эквивалентные документы; Ling et al., Anal. Biochem., 254 (2):157-78 [1997]; Dale et al., Meth. Mol. Biol., 57:369-74 [1996];

Smith, *Ann. Rev. Genet.*, 19:423-462 [1985]; Botstein et al., *Science*, 229:1193-1201 [1985]; Carter, *Biochem. J.*, 237:1-7 [1986]; Kramer et al., *Cell*, 38:879-887 [1984]; Wells et al., *Gene*, 34:315-323 [1985]; Minshull et al., *Curr. Op. Chem. Biol.*, 3:284-290 [1999]; Christians et al., *Nat. Biotechnol.*, 17:259-264 [1999]; Crameri et al., *Nature*, 391:288-291 [1998]; Crameri, et al., *Nat. Biotechnol.*, 15:436-438 [1997]; Zhang et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 94:4504-4509 [1997]; Crameri et al., *Nat. Biotechnol.*, 14:315-319 [1996]; Sterner, *Nature*, 370:389-391 [1994]; Stemmer, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91:10747-10751 [1994], WO 95/22625, WO 97/0078, WO 97/35966, WO 98/27230, WO 00/42651, WO 01/75767, WO 2009/152336 и патент США № 6537746, которые все включены в настоящее описание посредством ссылки).

В некоторых вариантах осуществления проводят скрининг клонов фермента, получаемых после обработки с применением мутагенеза, подвергая препараты фермента определенной температуре (или другим условиям анализа) и измеряя величину ферментативной активности, оставшейся после термических обработок или других подходящих условий анализа. Затем клоны, содержащие полинуклеотид, кодирующий полипептид PAL, выделяют из гена, секвенируют для идентификации изменений нуклеотидной последовательности (в случае их наличия) и используют для экспрессии фермента в клетке-хозяине. Измерение ферментативной активности в экспрессионных библиотеках можно проводить любым подходящим известным в данной области способом (например, стандартными биохимическими способами, такими как анализ ВЭЖХ).

Для сконструированных полипептидов с известной последовательностью можно получать полинуклеотиды, кодирующие фермент, стандартными твердофазными способами в соответствии с известными способами синтеза. В некоторых вариантах осуществления можно индивидуально синтезировать фрагменты приблизительно до 100 оснований, затем соединять их (например, способами ферментативного или химического лизирования или опосредованными полимеразой способами) с получением любой желаемой непрерывной последовательности. Например, полинуклеотиды и олигонуклеотиды, описываемые в настоящем описании, можно получать химическим синтезом классическим фосфорамидитным способом (см., например, Beaucage et al., *Tet. Lett.*, 22:1859-69 [1981] и Matthes et al., *EMBO J.*, 3:801-05 [1984]), как это реализуют, как правило, в автоматизированных способах синтеза. В соответствии с фосфорамидитным способом синтезируют олигонуклеотиды (например, в автоматическом синтезаторе ДНК, очищают, выравнивают, лигируют и клонируют в подходящие векторы).

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

Экспрессируемый сконструированный полипептид PAL можно оценивать на любое желаемое улучшенное свойство или сочетание свойств (например, активность, избирательность, стабильность, устойчивость к кислоте, чувствительность к протеазе и т.д.) любым подходящим анализом, известным в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, анализы и условия, описываемые в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления любой из сконструированных полипептидов PAL, экспрессируемых в клетке-хозяине, выделяют из клеток и/или среды для культивирования любым одним или более хорошо известным способом очистки белка, включая наряду с другими обработку лизоцимом, обработку ультразвуком, фильтрование, высаливание, ультрацентрифугирование и хроматографию.

Хроматографические способы выделения полипептидов PAL включают наряду с другими хроматографию с обращенной фазой, высокоэффективную жидкостную хроматографию, ионообменную хроматографию, хроматографию с гидрофобным взаимодействием, эксклюзионную хроматографию, электрофорез в геле и аффинную хроматографию. Условия очистки конкретного фермента частично зависят от таких факторов, как суммарный заряд, гидрофобность, гидрофильность, молекулярная масса, форма молекулы и т.д., и они будут понятны специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления для выделения улучшенных ферментов PAL можно использовать аффинные способы. Для очистки аффинной хроматографией можно использовать любое антитело, которое специфически связывается с представляющим интерес полипептидом PAL. Для получения антител различных животных-хозяев, включая, но, не ограничиваясь ими, кроликов, мышей, крыс и т.д., иммунизируют посредством инъекции

полипептида PAL или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления полипептид PAL или фрагмент присоединяют к подходящему носителю, такому как BSA, посредством функциональной группы боковой цепи или линкеров, присоединяемых к функциональной группе боковой цепи.

В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид PAL продуцируют в клетке-хозяине способом, включающим культивирование клетки-хозяина (например, штамма *E. coli*), содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую сконструированный полипептид PAL, как описано в настоящем описании, в условиях, благоприятных для спродукции сконструированного полипептида PAL, и выделение сконструированного полипептида PAL из клеток и/или среды для культивирования. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин продуцирует более одного сконструированного полипептида PAL.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу получения сконструированного полипептида PAL, включающему культивирование рекомбинантной бактериальной клетки, содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую сконструированный полипептид PAL, обладающий по меньшей мере 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью последовательности с эталонными последовательностями SEQ ID NO: 4, и один или более различиями аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 4, выбранными из X39, X91, X158, X180, X195, X243, X245, X256, X257, X270, X290, X307, X308, X326, X349, X364, X394, X399, X400, X404, X407, X443, X453, X459, X460, X463, X474, X522, X524 и X528 или их сочетаний, при оптимальном выравнивании с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, в подходящих условиях культивирования для обеспечения продукции сконструированного полипептида PAL и необязательно выделение сконструированного полипептида PAL из культуры и/или культивируемых бактериальных клеток. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин продуцирует более одного сконструированного полипептида PAL.

В некоторых вариантах осуществления после того, как сконструированные полипептиды PAL выделяют из рекомбинантных клеток-хозяев и/или среды для культивирования, их дополнительно очищают любым подходящим способом(ами), известными в данной области. В некоторых дополнительных вариантах осуществления очищенные полипептиды PAL объединяют с другими ингредиентами и соединениями с получением композиций и составов, содержащих сконструированный полипептид PAL, в зависимости от конкретного случая для различных применений и использований (например, фармацевтические композиции).

Композиции.

Настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам PAL, пригодным для использования во многих композициях. Эти композиции находят применение во многих областях, включая, но не ограничиваясь ими, фармацевтические средства, пищевые/питательные добавки, пищевой продукт, корм и получение химических веществ тонкого органического синтеза. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к пищевым продуктам и/или кормам, содержащим по меньшей мере один вариант сконструированной PAL и/или по меньшей мере одной полинуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере один вариант PAL. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к напитками, содержащим по меньшей мере один сконструированный вариант PAL.

В некоторых вариантах осуществления вариант сконструированной PAL в пищевом продукте, корме и/или питательной/пищевой добавке является гликозилированным. Кроме того, варианты сконструированных PAL находят применение в любой подходящей пищевой матрице для доставки фермента. В некоторых вариантах осуществления варианты сконструированных PAL содержатся в пищевой матрице для доставки фермента, сконструированной для быстрого всасывания варианта PAL в желудочно-кишечном тракте животного после проглатывания варианта.

Настоящее изобретение также относится к сконструированным полипептидам PAL, пригодным для использования для получения химических веществ тонкого органического синтеза и других промышленно ценных соединений (см., например, патентные заявки США №№ 2013/0340119, 2013/0005012 и 2005/0260724 и WO 2012/122333).

Фармацевтические и другие композиции.

Настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам PAL, пригодным для использования в фармацевтических и других композициях, таких как пищевые/питательные добавки.

В зависимости от способа введения эти композиции, содержащие терапевтически эффективное количество сконструированной PAL по изобретению, находятся в твердой, полутвердой или жидкой форме. В некоторых вариантах осуществления композиции содержат другие фармацевтически приемлемые компоненты, такие как разбавители, буферы, эксципиенты, соли, эмульгаторы, консерванты, стабилизаторы, наполнители и другие ингредиенты. Подробное описание способов формулирования и введения хорошо известны в данной области и описаны в литературе.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL формулируют для применения в пероральных фармацевтических композициях. Любой подходящий формат для применения для доставки сконструированных полипептидов PAL находит применение в настоящем изобретении, включая, но не ограничиваясь ими, пилюли, таблетки, гелевые таблетки, капсулы, таблетки-леденцы,

драже, порошки, мягкие гели, золь-гели, гели, эмульсии, имплантаты, пластыри, спреи, мази, линименты, кремы, пасты, виды желе, краски, аэрозоли, жевательные резинки, смягчительные средства, карандаши, суспензии (включая, но не ограничиваясь ими, суспензии на основе масла, эмульсии "масло в воде" и т.д.), взвеси, сиропы, составы с контролируемым высвобождением, суппозитории и т.д. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL предоставляют в формате, подходящем для инъекции (т.е. в инъекируемом составе). В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL предоставляют в биологически совместимых матриксах, таких как мягкие гели, включая золь-гели на основе диоксида кремния (например, оксисилан). В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL инкапсулируют. В некоторых альтернативных вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL инкапсулируют в наноструктуры (например, нанотрубки, нанотрубулы, нанокапсулы или микрокапсулы, микросферы, липосомы и т.д.). Следует понимать, что фактически настоящее изобретение не ограничено каким-либо конкретным составом для доставки и/или средствами доставки. Следует понимать, что сконструированные полипептиды PAL можно вводить любыми подходящими средствами, известными в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, парентеральные, пероральные, местные, чрескожные, интраназальные, внутриглазные, интратекальные, посредством имплантатов и т.д.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL химически модифицируют гликозилированием, пегилированием (т.е. модифицируют с использованием полиэтиленгликоля [PEG] или активированного PEG и т.д.) или другими соединениями (например, с Ikeda, Amino Acids 29:283-287 [2005]; патенты США № 7531341, 7534595, 7560263 и 753653; публикации патентных заявок США № 2013/0039898, 2012/0177722 и т.д.). Следует понимать, что фактически настоящее изобретение не ограничено каким-либо конкретным способом и/или механизмом доставки.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL предоставляют в составах, содержащих стабилизированные матрицей кристаллы ферменты. В некоторых вариантах осуществления состав содержит поперечно-сшитый кристаллический сконструированный фермент PAL и полимер с реакционноспособной группой, которая присоединяется к кристаллам фермента. Настоящее изобретение также относится к сконструированным полипептидам PAL в полимерах.

В некоторых вариантах осуществления композиции, содержащие сконструированные полипептиды PAL по настоящему изобретению, содержат один или более широко используемых соединений-носителей, включая, но не ограничиваясь ими, сахара (например, лактозу, сахарозу, маннит и/или сорбит), крахмалы (например, кукурузный, пшеничный, рисовый, картофельный или крахмал из других растений), целлюлозу (например, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу натрия), камеди (например, акации, трагакант, гуар и т.д.) и/или белки (например, желатин, коллаген и т.д.). Дополнительные компоненты в пероральных составах могут включать красители и или подсластители (например, глюкозу, сахарозу и маннит) и смазки (например, стеарат магния), а также растворяющиеся в кишечнике покрытия (например, метакрилатные полимеры, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы и/или любое другое подходящее растворяющееся в кишечнике покрытие, известное в данной области). Некоторые варианты осуществления содержат диспергирующие средства или солибулизаторы (например, поперечно-сшитый поливинилпирролидон, агар, альгиновую кислоту или ее соли, такие как альгинат натрия). В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид PAL объединяют с различными дополнительными компонентами, включая, но не ограничиваясь ими, консерванты, суспендирующие средства, загустители, средства для смачивания, спирты, жирные кислоты и/или эмульгаторы, в частности в жидких составах.

В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид PAL следует объединять с различными дополнительными компонентами, включая, но не ограничиваясь ими, консерванты, суспендирующие средства, загустители, средства для смачивания, спирты, жирные кислоты и/или эмульгаторы, в частности в жидких составах. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL вводят индивидуумам в комбинации с другими соединениями, используемыми для лечения PKU, включая, но не ограничиваясь ими, тетрагидробиоптерин KUVAN® (BioMarin Pharmaceutical, Inc., Novato, CA), антациды (например, омепразол, эзомепразол и другие празолы), а также любые другие подходящие соединения.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам PAL, пригодным для использования для снижения концентрации фенилаланина в жидкостях, таких как кровь, цереброспинальная жидкость и т.д. Доза сконструированного полипептида(ов) PAL, вводимых животному, зависит от состояния или заболевания, общего состояния животного и других факторов, известных специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления композиции предназначены для однократного или многократного введения животному. В некоторых вариантах осуществления предусмотрено, что концентрация сконструированного полипептида(ов) PAL в композиции(ях), вводимых животному (например, человеку с PKU), является достаточной для эффективного лечения, улучшения состояния и/или профилактики заболевания (например, PKU и/или связанных с PKU состояний, заболеваний и/или симптомов). В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL вводят в комбинации с другими фармацевтическими и/или пищевыми композициями.

Промышленные композиции.

Предусматривают, что сконструированные полипептиды PAL по настоящему изобретению находят применение в промышленных композициях. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL формулируют для применения в пищевой и/или кормовой промышленности. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL формулируют в гранулированных или пеллетированных продуктах, которые смешивают с компонентами корма для животных, таких как дополнительные ферменты (например, целлюлазы, лакказы и амилазы). В некоторых альтернативных вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL используют в жидких композициях корма для животных (например, взвешях на водной или масляной основе). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления варианты сконструированных PAL по настоящему изобретению являются достаточно термоустойчивыми и термостабильными для того, чтобы подвергаться обработке, используемой для получения пиллет и других обработанных кормов/пищевых продуктов.

Варианты сконструированных PAL по настоящему изобретению также находят применение при получении фенилаланина и/или производных фенилаланина.

Указанные выше и другие аспекты изобретения можно лучше понять в связи со следующими ниже неограничивающими примерами. Примеры предоставлены исключительно с иллюстративными целями и не предназначены ограничивать каким-либо образом объем настоящего изобретения.

Экспериментальная часть

Следующие ниже примеры, включая эксперименты и получаемые результаты, предоставлены исключительно с иллюстративными целями, и не следует их интерпретировать как ограничивающие настоящее изобретение.

В описании экспериментальной части ниже применяют следующие ниже сокращенные обозначения: м.д. - миллионные доли; М - малярный; mM - миллимолярный, мкМ и μ M - микромолярный; nM - наномолярный; моль - моль; г - грамм; мг - миллиграммы; мкг и μ g - микрограммы; л - литр; мл - миллилитр; см - сантиметры; мм - миллиметры; мкм и μ m - микрометры; с - секунды; мин - минута(ы); ч - час(ы); Ед. - единицы; M_w - молекулярная масса; об/мин - оборотов в минуту; фунт/дюйм² - фунтов на квадратный дюйм; °C - градусы Цельсия; КТ - комнатная температура; CDS - кодирующая последовательность; ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота; РНК - рибонуклеиновая кислота) *E. coli* W3110 - широкоиспользуемый лабораторный штамм *E. coli*, доступный от Coli Genetic Stock Center [CGSC], New Haven, CT; НТР - высокопроизводительный; ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография; CFSE - сложный эфир карбоксифлуоресцеинсукцинимидила; IPTG - изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид; PES - полиэфирсульфон; PHE и phe - фенилаланин; BSA - бычий сывороточный альбумин; PBMC - моноклеонарные клетки периферической крови; PKU - фенилкетонурия; МНС - главный комплекс гистосовместимости; HLA - лейкоцитарный антиген человека; HLA-DR - рецептор клеточной поверхности МНС II класса, кодируемый комплексом HLA на хромосоме № 6; FIOPC - величина улучшения по отношению к положительному контролю; LB - бульон Лурия; Athens Research - Athens Research Technology, Athens, GA; ProSpec - ProSpec Tany Technogene, East Brunswick, NJ; Sigma-Aldrich - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; Ram Scientific - Ram Scientific, Inc., Yonkers, NY; Pall Corp. - Pall, Corp., Pt. Washington, NY; Millipore - Millipore, Corp., Billerica MA; Difco - Difco Laboratories, BD Diagnostic Systems, Detroit, MI; Molecular Devices - Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA; Kuhner - Adolf Kuhner, AG, Basel, Switzerland; Cambridge Isotope Laboratories - Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Tewksbury, MA; Applied Biosystems - Applied Biosystems, часть Life Technologies, Corp., Grand Island, NY, Agilent - Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA; Thermo Scientific - часть Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA; Corning - Corning, Inc., Palo Alto, CA; Constant Systems - Constant Systems Ltd., Daventry, United Kingdom; Megazyme - Megazyme International, Wicklow, Ireland; Enzo - Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY; GE Healthcare - GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ; Harlan - Harlan Laboratories, Indianapolis, IN; AB Sciex - AB Sciex, Framingham, MA и Bio-Rad - Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA.

В настоящем изобретении находят применение следующие ниже полинуклеотидные и полипептидные последовательности. В некоторых случаях (как продемонстрировано ниже) за полинуклеотидной последовательностью следует кодируемый полипептид.

Полинуклеотидная последовательность экспрессирующего вектора pET16b-AvPAL (SEQ ID NO:)

TCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTTAATGCGGTAGTTTATCACAGTTAAA
 TT GCTAACGCAGTCAGGCACCGTGTATGAAATCTAACAATGCGCTCATCGTCATCCTCGGCA
 CCGTCACCCCTGGATGCTGTAGGCATAGGCTTGGTTATGCCGGTACTGCCGGGCCTCTTGC
 GGGATATCCGGATATAGTTTCCTCCTTCAGCAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTAGAGGC
 CCCAAGGGGTATGCTAGTTATTGCTCAGCGGTGGCAGCAGCCAACCTCAGCTTCCTTTTCG
 GGCTTTGTAGCAGCCGGATCCTTAATGCAGACACGGCAGAATGTCCTGAACGGCCTGA
 ACAATAACACCACCGGCTGCAATATCTGCACTAATACGTGCAATATGTTTCATCCAGACCC
 TGTTTCATTATCATTCCAAATATACGGACGATCTGAGGTCGGTTTCTGACCAACAACATGA
 CGAAGTGCCTATACAGACGTTTCGGTTGCCGGTGACAGACAGGCACGTGCATCATAATG
 ACCGGTTTTTTTGTAGGTACGCAGATCAACTGCCTGAACACCAACATCAGGGCAATGGC
 AACATAATTCTGAAAAATATCAACGCTACGACGTGCCAGGGTTGCGCTGGTATAACCCCTG
 GCTGTTAATATTCTGGTTAACTGTTTCGGCATGGGTTCGGAAAACGATCTGCAATACTATT
 ACCATAAAAGGTCAGCAGCGGCATAATGCTATTACCGCAAATCTGCAGACCTTTCAGAC
 CCATATTAACTTTACGTTACGATTACCCAGCAGACTCGGAGGCAGACCATTGCTAAATT
 CCGGTGATGCCAGCAGTGCAATCTGAACATCCAGATGTTTTGCCAGCAGACCGATATAAT
 AGCGCAGATGATCCATACCCATACCAACATACTGACCCAGAAAATTACCACCATGATAG
 CTTGCCTGATTATCAACATCAATCAGCGGGTTATCGGTAACGCTGTTAATCTCAATTTTCG
 ATTTGTTTGGCAATCTGGCTAATACCATCAACAATCGGACCCAGATACTGCGGCAGACAA
 CGCAGGCTATAACGATCCTGGATCAGTTCATGATCACGATAATCATGTTTACCATCCAGT
 TCATCACGAACCAGCTGGCTATTGGCCAGCAGGCTAATCATCTGATCTGCTGCCCACAGC
 TGACCCGGATGCGGTTTGTCTGTTATGGATAAACGGATGAAAGCTCTGATTTGTACCATT
 AGTGCCTGAATATCCAGTGCATGAACACCCATTGCAATTGCGGTCAGAATCTGGGTATCA

TAAACACAATTTGCTGCAATACCGGTCATAACGCTGGTGCCATTCATCATTGCCAGACCT
TCTTTTCGGCAGCAGGGTCAGCGGACTCAGATTAGCTGACGCAGTGCGGTGCGTGCGTCC
ATTTCTTTGCCATTAAAATCAACTTTAAAGCTCGGGTCCAGGCCAATCAGGCTACCGGTA
ATATAGCTCAGCGGAACCAGATCACCGCTGGCACCAATGCTACCAAATTCATAAACATA
CGGGGTAACACCGGCATTAGAAAAGATTTCCATGCGTTTAATCAGTTCCAGACGAATACC
GCTTGACCCACGCATGTGGCTATTTGCACGCAGCAGCATTGCTGCACGAACATCTGCCAG
CGGCAGTTTATTACCTGCACCGGTTTTTCAGAAACCAAACCAGATTGGTCTGCAGTTTCGCT
TGCCTGTTACGGCTAATTGCAACATTTGCCATACCACCAAAACCGCTGGTAACACCATA
AATCGGTTACCGCTTTCAACTGCATTATTGATATAATCACAGCTGGCCTGAATACCCCTG
CAGAATATCGGTATTATTGGTCAGGCTAACCAGGGTGCCATTACGGGCAACACGTGCAA
CATCATTGATGGTCAGTTTCTGATTACCAATAATCACATTTGCGCTGCTATTGCCGGTAAA
GCTAAACTGCTGGCTGCTGGTTTTGCTCTGTGCCTGGCTCAGGGTTTTTCATATGACGACCT
TCGATATGGCCGCTGCTGTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGGCCCATGGTATAT
CTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAGGGGAATTGTTATCCGCTCACAAATTC
CCTATAGTGAGTCGTATTAAATTTTCGCGGGATCGAGATCTCGATCCTCTACGCCGGACGCA
TCGTGGCCGGCATCACCGGCGCCACAGGTGCGGTTGCTGGCGCCTATATCGCCGACATCA
CCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGCGCTTGTTTTCGGCGTGGGTA
TGGTGGCAGGCCCCGTGGCCGGGGGACTGTTGGGCGCCATCTCCTTGATGCACCATTCC
TTGCGGCGGCGGTGCTCAACGGCCTCAACCTACTACTGGGCTGCTTCCTAATGCAGGAGT
CGCATAAGGGAGAGCGTCGAGATCCCGGACACCATCGAATGGCGCAAAACCTTTTCGCGG
TATGGCATGATAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACCAGTAA
CGTTATACGATGTCGCAGAGTATGCCGGTGTCTCTTATCAGACCGTTTCCCGCGTGGTGA
ACCAGGCCAGCCACGTTTCTGCGAAAACCGGGGAAAAGTGGAAGCGGCGATGGCGGA
GCTGAATTACATTCCCAACCGCTGGCACAACAACCTGGCGGGCAAACAGTCGTTGCTGA
TTGGCGTTGCCACCTCCAGTCTGGCCCTGCACGCGCCGTGCGAAATTGTGCGGCGGATTA
AATCTCGCGCCGATCAACTGGGTGCCAGCGTGGTGGTGTGATGGTAGAACGAAGCGGC
GTCGAAGCCTGTAAAGCGGCGGTGCACAATCTTCTCGCGCAACGCGTCAGTGGGCTGAT
CATTAACTATCCGCTGGATGACCAGGATGCCATTGCTGTGGAAGCTGCCTGCCTAATGT
TCCGGCGTTATTTCTTGATGTCTCTGACCAGACACCCATCAACAGTATTATTTCTCCCAT
GAAGACGGTACGCGACTGGGCGTGGAGCATCTGGTGCATTGGGTACCAGCAAATCGC
GCTGTTAGCGGGCCCATTAAGTTCTGTCTCGGCGCGTCTGCGTCTGGCTGGCTGGCATAA
ATATCTCACTCGCAATCAAATTCAGCCGATAGCGGAACGGGAAGGCGACTGGAGTGCCA
TGTCCGTTTTTCAACAAACCATGCAAATGCTGAATGAGGGCATCGTTCCCACTGCGATGC
TGGTTGCCAACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGAGTCCGGGCTG
CGCGTTGGTGGGATATCTCGGTAGTGGGATACGACGATACCGAAGACAGCTCATGTTAT
ATCCCGCGTTAACCACCATCAAACAGGATTTTCGCCTGCTGGGGCAAACCAGCGTGGAC

CGCTTGCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCA
CTGGTGAAAAGAAAAACCACCCTGGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTT
GGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAG
CGCAACGCAATTAATGTAAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCGGGATCTCGACCGATGCCC
TTGAGAGCCTTCAACCCAGTCAGCTCCTTCCGGTGGGCGCGGGGCATGACTATCGTCGCC
GCACTTATGACTGTCTTCTTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTGG
GTCATTTTCGGCGAGGACCGCTTTCGCTGGAGCGCGACGATGATCGGCCTGTCGCTTGCG
GTATTTCGGAATCTTGACGCCCTCGCTCAAGCCTTCGTCACTGGTCCCGCCACCAAACGT
TTCGGCGAGAAGCAGGCCATTATCGCCGGCATGGCGGCCGACGCGCTGGGCTACGTCTT
GCTGGCGTTTCGCGACGCGAGGCTGGATGGCCTTCCCCATTATGATTCTTCTCGCTTCCGG
CGGCATCGGGATGCCCCGCTTGCCAGGCCATGCTGTCCAGGCAGGTAGATGACGACCATC
AGGGACAGCTTCAAGGATCGCTCGCGGCTCTTACCAGCCTAACTTCGATCACTGGACCGC
TGATCGTCACGGCGATTTATGCCGCCCTCGGCGAGCACATGGAACGGGTGGCATGGATTG
TAGGCGCCGCCCTATACCTTGTCTGCCTCCCCGCGTTGCGTCGCGGTGCATGGAGCCGGG
CCACCTCGACCTGAATGGAAGCCGGCGGCACCTCGCTAACGGATTACCACTCCAAGAA
TTGGAGCCAATCAATTCTTGCGGAGAACTGTGAATGCGCAAACCAACCCTTGGCAGAAC
ATATCCATCGCGTCCGCCATCTCCAGCAGCCGCACGCGGCGCATCTCGGGCAGCGTTGGG
TCCTGGCCACGGGTGCGCATGATCGTGCTCCTGTCTGTTGAGGACCCGGCTAGGCTGGCGG
GGTTGCCTTACTGGTTAGCAGAATGAATCACCGATACGCGAGCGAACGTGAAGCGACTG
CTGCTGCAAAACGTCTGCGACCTGAGCAACAACATGAATGGTCTTCGGTTTCCGTGTTTC
GTAAAGTCTGGAAACGCGGAAGTCAGCGCCCTGCACCATTATGTTCCGGATCTGCATCGC
AGGATGCTGCTGGCTACCCTGTGGAACACCTACATCTGTATTAACGAAGCGCTGGCATTG
ACCCTGAGTGATTTTTCTCTGGTCCCGCCGCATCCATACCGCCAGTTGTTTACCCTCACAA
CGTTCCAGTAACCGGGCATGTTTCATCATCAGTAACCCGTATCGTGAGCATCCTCTCTCGTT
TCATCGGTATCATTACCCCCATGAACAGAAATCCCCCTTACACGGAGGCATCAGTGACCA
AACAGGAAAAAACCGCCCTTAACATGGCCCGCTTTATCAGAAGCCAGACATTAACGCTT
CTGGAGAAACTCAACGAGCTGGACGCGGATGAACAGGCAGACATCTGTGAATCGCTTCA
CGACCACGCTGATGAGCTTTACCGCAGCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAA
CCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGA
GCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCGCAGCCATG
ACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAG
ATTGTACTGAGAGTGCACCATATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGA
AAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTT
GGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCA
GGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTA
AAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAA

ATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTT
 CCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGT
 CCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAG
 TTCGGTGTAGGTTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCCCGA
 CCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATC
 GCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTA
 CAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCT
 GCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAC
 AAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAA
 AAGGATCTCAAGAAGATCCTTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAA
 ACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTT
 TAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACA
 GTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCAT
 AGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCC
 CAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAA
 ACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTTGCAACTTTATCCGCCTCCATC
 CAGTCTATTAATGTGTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTGCCAGTTAATAGTTTGCGC
 AACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCAT
 TCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAG
 CGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCAC
 TCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTC
 TGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTG
 CTCTTGCCCGCGCTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCT
 CATCATTTGAAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATC
 CAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAAGTATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGC
 GTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGA
 CACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGG
 TTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGT
 TCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGAC
 ATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAAT (SEQ ID NO: 1)

Полинуклеотидная последовательность ORF AvPAL (SEQ ID NO: 2)

ATGAAAACCCCTGAGCCAGGCACAGAGCAAAACCAGCAGCCAGCAGTTAGCTTTACCGG
 CAATAGCAGCGCAAATGTGATTATTGGTAATCAGAAACTGACCATCAATGATGTTGCAC
 GTGTTGCCCGTAATGGCACCCCTGGTTAGCCTGACCAATAATACCGATATTCTGCAGGGTA
 TTCAGGCCAGCTGTGATTATATCAATAATGCAGTTGAAAGCGGTGAACCGATTTATGGTG
 TTACCAGCGGTTTTTGGTGGTATGGCAAATGTTGCAATTAGCCGTGAACAGGCAAGCGAA

CTGCAGACCAATCTGGTTTGGTTTCTGAAAACCGGTGCAGGTAATAAACTGCCGCTGGCA
 GATGTTTCGTGCAGCAATGCTGCTGCGTGCAAATAGCCACATGCGTGGTGCAAGCGGTATT
 CGTCTGGAACCTGATTAAACGCATGGAAATCTTTCTGAATGCCGGTGTTACCCCGTATGTT
 TATGAATTTGGTAGCATTGGTGCCAGCGGTGATCTGGTTCCGCTGAGCTATATTACCGGT
 AGCCTGATTGGCCTGGACCCGAGCTTTAAAGTTGATTTTAATGGCAAAGAAATGGACGC
 ACCGACCGCACTGCGTCAGCTGAATCTGAGTCCGCTGACCCTGCTGCCGAAAGAAGGTCT
 GGCAATGATGAATGGCACCAGCGTTATGACCGGTATTGCAGCAAATTGTGTTTATGATAC
 CCAGATTCTGACCGCAATTGCAATGGGTGTTTCATGCACTGGATATTCAGGCACTGAATGG
 TACAAATCAGAGCTTTTCATCCGTTTATCCATAACAGCAAACCGCATCCGGGTGAGCTGTG
 GGCAGCAGATCAGATGATTAGCCTGCTGGCCAATAGCCAGCTGGTTCGTGATGAACTGG
 ATGGTAAACATGATTATCGTGATCATGAACTGATCCAGGATCGTTATAGCCTGCGTTGTC
 TGCCGCAGTATCTGGGTCCGATTGTTGATGGTATTAGCCAGATTGCCAAACAAATCGAAA
 TTGAGATTAAACAGCGTTACCGATAACCCGCTGATTGATGTTGATAATCAGGCAAGCTATC
 ATGGTGGTAATTTTCTGGGTGAGTATGTTGGTATGGGTATGGATCATCTGCGCTATTATAT
 CCGTCTGCTGGCAAAACATCTGGATGTTTCAGATTGCACTGCTGGCATCACCGGAATTTAG
 CAATGGTCTGCCTCCGAGTCTGCTGGGTAATCGTGAACGTAAAGTTAATATGGGTCTGAA
 AGGTCTGCAGATTTGCGGTAATAGCATTATGCCGCTGCTGACCTTTTATGGTAATAGTAT
 TGCAGATCGTTTTCCGACCCATGCCGAACAGTTTAACCAGAATATTAACAGCCAGGGTTA
 TACCAGCGCAACCTGGCAGTCGTAGCGTTGATATTTTCAGAATTATGTTGCCATTGC
 CCTGATGTTTGGTGTTCAGGCAGTTGATCTGCGTACCTACAAAAAACCGGTGCTATTATGA
 TGCACGTGCCTGTCTGTACCCGGCAACCGAACGTCTGTATAGCGCAGTTCGTGATGTTGT
 TGGTCAGAAACCGACCTCAGATCGTCCGTATATTTGGAATGATAATGAACAGGGTCTGG
 ATGAACATATTGCACGTATTAGTGCAGATATTGCAGCCGGTGGTGTATTGTTTCAGGCCG
 TTCAGGACATTCTGCCGTGTCTGCAT (SEQ ID NO: 2)

Полинуклеотидная последовательность AvPAL WT (SEQ ID NO: 3)

ATGAAAACCCCTGAGCCAGGCACAGAGCAAAACAGCAGCCAGCAGTTTAGCTTTACCGG
 CAATAGCAGCGCAAATGTGATTATTGGTAATCAGAACTGACCATCAATGATGTTGCAC
 GTGTTGCCCCGTAATGGCACCCCTGGTTAGCCTGACCAATAATACCGATATTCTGCAGGGTA
 TTCAGGCCAGCTGTGATTATATCAATAATGCAGTTGAAAGCGGTGAACCGATTTATGGTG
 TTACCAGCGGTTTTTGGTGGTATGGCAAATGTTGCAATTAGCCGTGAACAGGCAAGCGAA
 CTGCAGACCAATCTGGTTTGGTTTCTGAAAACCGGTGCAGGTAATAAACTGCCGCTGGCA
 GATGTTTCGTGCAGCAATGCTGCTGCGTGCAAATAGCCACATGCGTGGTGCAAGCGGTATT
 CGTCTGGAACCTGATTAAACGCATGGAAATCTTTCTGAATGCCGGTGTTACCCCGTATGTT
 TATGAATTTGGTAGCATTGGTGCCAGCGGTGATCTGGTTCCGCTGAGCTATATTACCGGT
 AGCCTGATTGGCCTGGACCCGAGCTTTAAAGTTGATTTTAATGGCAAAGAAATGGACGC
 ACCGACCGCACTGCGTCAGCTGAATCTGAGTCCGCTGACCCTGCTGCCGAAAGAAGGTCT

GGCAATGATGAATGGCACCAGCGTTATGACCGGTATTGCAGCAAATTGTGTTTATGATAC
 CCAGATTCTGACCGCAATTGCAATGGGTGTTTCATGCACTGGATATTCAGGCACTGAATGG
 TACAAATCAGAGCTTTCATCCGTTTATCCATAACAGCAAACCGCATCCGGGTCAGCTGTG
 GGCAGCAGATCAGATGATTAGCCTGCTGGCCAATAGCCAGCTGGTTCGTGATGAACTGG
 ATGGTAAACATGATTATCGTGATCATGAACTGATCCAGGATCGTTATAGCCTGCGTTGTC
 TGCCGCAGTATCTGGGTCCGATTGTTGATGGTATTAGCCAGATTGCCAAACAAATCGAAA
 TTGAGATTAACAGCGTTACCGATAACCCGCTGATTGATGTTGATAATCAGGCAAGCTATC
 ATGGTGGTAATTTTCTGGGTGAGTATGTTGGTATGGGTATGGATCATCTGCGCTATTATAT
 CGGTCTGCTGGCAAACATCTGGATGTTTCAGATTGCACTGCTGGCATCACCGGAATTTAG
 CAATGGTCTGCCTCCGAGTCTGCTGGGTAATCGTGAACGTAAAGTTAATATGGGTCTGAA
 AGGTCTGCAGATTTGCGGTAATAGCATTATGCCGCTGCTGACCTTTTATGGTAATAGTAT
 TGCAGATCGTTTTTCCGACCCATGCCGAACAGTTTAAACCAGAATATTAACAGCCAGGGTTA
 TACCAGCGCAACCCCTGGCACGTCGTAGCGTTGATATTTTTCAGAAATATGTTGCCATTGC
 CCTGATGTTTGGTGTTCAGGCAGTTGATCTGCGTACCTACAAAAAACCGGTCATTATGA
 TGCACGTGCCTGTCTGTACCCGGCAACCGAACGTCTGTATAGCGCAGTTCGTTCATGTTGT
 TGGTCAGAAACCGACCTCAGATCGTCCGTATATTTGGAATGATAATGAACAGGGTCTGG
 ATGAACATATTGCACGTATTAGTGCAGATATTGCAGCCGGTGGTGTATTGTTTCAGGCCG
 TTCAGGACATTCTGCCGTGTCTGCAT (SEQ ID NO: 3)

Полипептидная последовательность AvPAL WT (SEQ ID NO: 4)

MKTLSQLQSKTSSQQFSFTGNSSANVIGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQG
 IQAS
 CDYINNAVESGEPIYGVTSFGFGMANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAA
 MLLRANSHMRGASGIRLELIKRMIEIFLNAGVTPYVYEFSGSIGASGDLVPLSYITGSLIGLDPSE
 KVDFNGKEMDAPTALRQLNLSPLTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIAMGV
 HALDIQALNGTNQSFHPFIHNSKPHPGQLWAADQMISLLANSQLVRELDGKHDYRDHELIQ
 DRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLIDVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMHD
 LRYIIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVMGLKGLQICGNSIMPLLTIFYGN
 SIADRFPTHAEQFNQININSQGYTSATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLRITYKKTGHYD
 ARACLSPATERLYSAVRHVVGQKPTSDRPYIWNQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQDIL
 PCLH (SEQ ID NO: 4)

Полинуклеотидная последовательность варианта AvPAL № 30 (SEQ ID NO: 5)

ATGAAAACCCCTGAGTCAGGCACAGAGCAAACCCAGCAGCCAGCAGTTTAGCTTTACCGG
 CAATAGCAGCGCAAATGTGATTATTGGTAATCAGAACTGACCATCAATGATGTTGTACG
 TGTGCCCCGTAATGGCACCCCTGGTTAGCCTGACCAATAATACCGATATTCTGCAGGGTAT
 TCAGGCCAGCTGTGATTATATCAATAATGCAGTTGAAAGCGGTGAACCGATTATGTTGTG

TACCAGCGGTTTTGGTGGTATGGCAAATGTTGTAATTAGCCGTGAACAGGCAAGCGAACT
 GCAGACCAATCTGGTTTGGTTTCTGAAAACCGGTGCAGGTAATAAACTGCCGCTGGCAG
 ATGTTTCGTGCAGCAATGCTGCTGCGTGCAAATAGCCACATGCGTGGTGCAAGCGGTATTC
 GTCTGGAACTGATTAAACGCATGGAAATCTTCTGAATGCCGGTGTTACCCCGTATGTTT
 ATGAATTTGGTAGCATTTGGTGCCAGCGGTGATCTGGTTCGCTGAGCTATATTACCGGTA
 GCCTGATTGGCCTGGACCCGAGCTTTAAAGTTGATTTTAATGGCAAAGAAATGGACGCAC
 CGACCGCACTGCGTCAGCTGAATCTGAGTCCGCTGACCCTGCTGCCGAAAGAAGGTCTG
 GCAATGATGAATGGCACCAGCGTTATGACCGGTATTGCAGCAAATTGTGTTTATGATACC
 CAGATTTCTGACCGCAATTGCAATGGGTGTTTCATGCACTGGATATTCAGGGACTGAATGGT
 ACAAATCAGAGCTTTTCATCCGTTTATCCATAACAGCAAACCGCATCCGGGTCAGCTGTGG
 GCAGCAGATCAGATGATTAGCCTGCTGGCCGGTAGCCAGCTGGTTCGTGATGAACTGGA
 TGGTAAACATGATTATCGTGATCATGAACTGATCCAGGATCGTTATAGCCTGCGTTGTCT
 GCCGCAGTATCTGGGTCCGATTGTTGATGGTATTAGCCAGATTGCCAAACAAATCGAAAT
 TGAGATTAACAGCGTTACCGATAACCCGCTGATTGATGTTGATAATCAGGCAAGCTATCA
 TGGTGGTAATTTTCTGGGTGAGTATGTTGGTATGGGTATGGATCATCTGCGCTATTATATC
 GGTCTGCTGGCAAAACATCTGGATGTTTCAGATTGCACTGCTGGTATCACCGGAATTTAAC
 AATGGTCTGCCTGCGAGTCTGGTGGGTAATCGTGAACGTAAAGTTAATATGGGTCTGAAA
 GGTCTGCAGATTTGCGGTAATAGCATTATGCCGCTGCTGACCTTTTATGGTAATAGTATT
 GCAGATCGTTTTCCGACCCATGCCGAACAGTTTAACCAGAATATTAACAGCCAGGGTTAT
 ACCAGCGCAACCCCTGGCACGTCGTAGCGTTGATATTTTTCAGAATTATGTTGCCATTGCC
 CTGATGTTTGGTGTTCAGGCAGTTGATCTGCGTACCTACAAAAAACCGGTCAATTATGAT
 GCACGTGCCTGTCTGTCAACGGCAACCGAAGTCTGTATAGCGCAGTTTCGTCATGTTGTT
 GGTGAGTATCCGAGCTCAGATCGTCCGTATATTTGGAATGATAATGAACAGGGTCTGGAT
 GAACATATTGCACGTATTAGTGAGATATTGCAGCCGGTGGTGTATTGTTTCAGGCCGTT
 CAGGACATTCTGCCGTGTCTGCAT (SEQ ID NO: 5)

Полипептидная последовательность варианта AvPAL № 30 (SEQ ID NO: 6)

MKTLSQLQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKLTINDVVRVARNGTLVSLTNNTDILQG
 IQAS
 CDYINNAVESGEPIYGVTSFGFGGMANVVISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAA
 MLLRANSHMRGASGIRLELIKMEIFLNAGVTPYVYEFSGSIGASGDLVPLSYITGSLIGLDPSF
 KVDFNGKEMDAPTALRQLNLSPLTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCYVDTQILTAIAMGV
 HALDIQGLNGTNQSFHPFIHNSKPHPGQLWAADQMISLLAGSQLVRDELGDGKHDYRDHELIQ
 DRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLIDVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDH
 LRYIYIGLLAKHLDVQIALLVSPFNNGLPASLVGNRERKVNMGKGLQICGNSIMPLLTIFYG
 NSIADRFPTHAEQFNQININSQGYTSATLARRSVDFQNYVAIALMFGVQAVDLRITYKKTGHY
 DARACLSPATERLYSAVRHVVGQYPSSDRPYIWNQNEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQDI
 LPCLH (SEQ ID NO: 6)

Полинуклеотидная последовательность варианта AvPAL № 22 (SEQ ID NO: 7)

ATGAAAACCCCTGAGCCAGGCACAGAGCAAAACCAGCAGCCAGCAGTTTAGCTTTACCGG
 CAATAGCAGCGCAAATGTGATTATTGGTAATCAGAACTGACCATCAATGATGTTGCAC
 GTGTTGCCCGTAATGGCACCCCTGGTTAGCCTGACCAATAATACCGATATTCTGCAGGGTA
 TTCAGGCCAGCTGTGATTATATCAATAATGCAGTTGAAAGCGGTGAACCGATTTATGGTG
 TTACCAGCGGTTTTTGGTGGTATGGCAAATGTTGCAATTAGCCGTGAACAGGCAAGCGAA
 CTGCAGACCAATCTGGTTTGGTTTCTGAAAACCGGTGCAGGTAATAAACTGCCGCTGGCA
 GATGTTCTGTCAGCAATGCTGCTGCGTGCAAATAGCCACATGCGTGGTGCAAGCGGTATT
 CGTCTGGAACCTGATTAACGCATGGAAATCTTTCTGAATGCCGGTGTTACCCCGTATGTT
 TATGAATTTGGTAGCATTGGTGCCAGCGGTGATCTGGTTCCGCTGAGCTATATTACCGGT
 AGCCTGATTGGCCTGGACCCGAGCTTTAAAGTTGATTTTAATGGCAAAGAAATGGACGC
 ACCGACCGCACTGCGTCAGCTGAATCTGAGTCCGCTGACCCTGCTGCCGAAAGAAGGTCT
 GGCAATGATGAATGGCACCAGCGTTATGACCGGTATTGCAGCAAATTGTGTTTATGATAC
 CCAGATTCTGACCGCAATTGCAATGGGTGTTTCATGCACTGGATATTCAGGCACTGAATGG
 TACAAATCAGAGCTTTTCATCCGTTTATCCATAACAGCAAACCGCATCCGGGTGAGCTGTG
 GGCAGCAGATCAGATGATTAGCCTGCTGGCCAATAGCCAGCTGGTTCGTGATGAACTGG
 ATGGTAAACATGATTATCGTGATGGTGAACCTGATCCAGGATCGTTATAGCCTGCGTTGTC
 TGCCGCAGTATCTGGGTCCGATTGTTGATGGTATTAGCCAGATTGCCAAACAAATCGAAA
 TTGAGATTAAACAGCGTTACCGATAACCCGCTGATTGATGTTGATAATCAGGCAAGCTATC
 ATGGTGGTAATTTTCTGGGTCAGTATGTTGGTATGGGTATGGATCATCTGCGCTATTATAT
 CGGTCTGCTGGCAAAACATCTGGATGTTTCAGATTGCACTGCTGGCATCACCGGAATTTAG
 CAATGGTCTGCCTCCGAGTCTGCTGGGTAATCGTGAACGTAAAGTTAATATGGGTCTGAA
 AGGTCTGCAGATTTGCCGTAATAGCATTATGCCGCTGCTGACCTTTTATGGTAATAGTAT
 TGCAGATCGTTTTCCGACCCATGCCGAACAGTTTAAACCAGAATATTAACAGCCAGGGTTA
 TACCAGCGCAACCCCTGGCACGTCGTAGCGTTGATATTTTTCAGAAATATGTTGCCATTGC
 CCTGATGTTTGGTGTTCAGGCAGTTGATCTGCGTACCTACAAAAAACCGGTCATTATGA
 TGCACGTGCCTGTCTGTACCCGGAACCGAACGTCTGTATAGCGCAGTTCGTCTATGTTGT
 TGGTCAGAAACCGACCTCAGATCGTCCGTATATTTGGAATGATAATGAACAGGGTCTGG
 ATGAACATATTGCACGTATTAGTGCAGATATTGCAGCCGGTGGTGTTATTGTTTCAGGCCG
 TTCAGGACATTCTGCCGTGTCTGCAT (SEQ ID NO:7)

Полипептидная последовательность варианта AvPAL № 22 (SEQ ID NO: 8)

MKTLSQLQSKTSSQQFSFTGNSSANV IIGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQAS
 CDYINNAVESGEPIYGVTSFGGGMANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAA
 MLLRANSHMRGASGIRLELIKRM EIFLNAGVTPYVYEFSGISGDLVPLSYITGSLIGLDPSF
 KVD FNGKEMDAPTALRQLNLSPLTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIAMGV
 HALDIQALNGTNQSFHPIHNSKPHPGQLWAADQMISLLANSQLVRDEL DKGHDYRDGELIQ
 DRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLIDVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDH
 LRYIIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLGNRERKVMGLKGLQICGNSIMPLLTIFYGN
 SIADRFPTHAEQFNQINSQGYTSATLARRSVDFQNYVAIALMFGVQAVDLRKYKKTGHYD
 ARACLSPATERLYSAVRHVVGQKPTSDRPYIWNDEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQDIL
 PCLH (SEQ ID NO:8)

Полинуклеотидная последовательность варианта AvPAL № 36 (SEQ ID NO: 9)

ATGAAAACCTGAGTCAGGCACAGAGCAAAACCAGCAGCCAGCAGTTTAGCTTTACCGG
 CAATAGCAGCGCAAATGTGATTATTGGTAATCAGAACTGACCATCAATGATGTTGTACG
 TGTGCCCCGTAATGGCACCCCTGGTTAGCCTGACCAATAATACCGATATTCTGCAGGGTAT
 TCAGGCCAGCTGTGATTATATCAATAATGCAGTTGAAAGCGGTGAACCGATTTATGGTGT
 TACCAGCGGTTTTGGTGGTATGGCAAATGTTGTAATTAGCCGTGAACAGGCAAGCGAACT
 GCAGACCAATCTGGTTTGGTTTCTGAAAACCGGTGCAGGTAATAAACTGCCGCTGGCAG
 ATGTTTCGTGCAGCAATGCTGCTGCGTGCAAATAGCCACATGCGTGGTGCAAGCGGTATTC
 GTCTGGAACGATTAAACGCATGGAATCTTTCTGAATGCCGGTGTACCCCGTATGTTT
 ATGAATTTGGTAGCATTGGTGCCAGCGGTGATCTGGTTCCGCTGAGCTATATTACCGGTA
 GCCTGATTGGCCTGGACCCGAGCTTTAAAGTTGATTTTAATGGCAAAGAAATGGACGCAC
 CGACCGCACTGCGTCAGCTGAATCTGAGTCCGCTGACCCTGCTGCCGAAAGAAGGTCTG
 GCAATGATGAATGGCACCAGCGTTATGACCGGTATGCAGCAAATTGTGTTTATGATACC
 CAGATTCTGACCGCAATTGCAATGGGTGTTTCATGCACTGGATATTCAGGCACTGAATGGT
 ACAAATCAGAGCTTTTCATCCGTTTATCCATAACAGCAAACCGCATCCGGGTGAGCTGTGG
 GCAGCAGATCAGATGATTAGCCTGCTGGCCGGTAGCCAGCTGGTTCGTGATGAACCTGGA
 TGGTAACATGATTATCGTGATGGTGAACGATCCAGGATCGTTATAGCCTGCGTTGTCT
 GCCGCAGTATCTGGGTCCGATTGTTGATGGTATTAGCCAGATTGCCAAACAAATCGAAAT
 TGAGATTAACAGCGTTACCGATAACCCGCTGATTGATGTTGATAATCAGGCAAGCTATCA
 TGGTGGTAATTTCTGGGTGAGTATGTTGGTATGGGTATGGATCATCTGCGCTATTATATC
 GGTCTGCTGGCAAAACATCTGGATGTTTCAGATTGCACTGCTGGCATCACCGGAATTTAGC
 AATGGTCTGCCCTCCGAGTCTGGTGGGTAATCGTGAACGTAAAGTTAATATGGGTCTGAAA
 GGTCTGCAGATTTGCGGTAATAGCATTATGCCGCTGCTGACCTTTTATGGTAATAGTATT
 GCAGATCGTTTTCCGACCCATGCCGAACAGTTTAACCAGAATATTAACAGCCAGGGTTAT
 ACCAGCGCAACCTGGCACGTCGTAGCGTTGATATTTTTCAGAATTATGTTGCCATTGCC
 CTGATGTTTGGTGTTCAGGCAGTTGATCTGCGTACCTACAAAAAACCGGTCAATTATGAT
 GCACGTGCCTGTCTGTACCGGCAACCGAACGTCTGTATAGCGCAGTTTCGTATGTTGTT
 GGTGAGAAACCGAGCTCAGATCGTCCGTATATTTGGAATGATAATGAACAGGGTCTGGA
 TGAACATATTGCACGTATTAGTGCAGATATTGCAGCCGGTGGTGTATTGTTTCAGGCCGT
 TCAGGACATTCTGCCGTGTCTGCAT (SEQ ID NO:9)

Полипептидная последовательность варианта AvPAL № 36 (SEQ ID NO: 10)

MKTLSQLQSKTSSQQFSFTGNSSANVIGNQKLTINDVVRVARNGTLVSLTNNTDILQGIQAS
 CDYINNAVESGEPIYGVTSFGFGMANVVISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAA
 MLLRANSHMRGASGIRLELIKRMEIFLNAGVTPYVYEFSGSIGASGDLVPLSYITGSLIGLDPSF
 KVDFNGKEMDAPTALRQLNLSPLTLLPKEGLAMNGTSVMTGIAANCYVDTQILTAIAMGV
 HALDIQALNGTNQSFHPFIHNSKPHPGQLWAADQMISLLAGSQLVRDELKGKHDYRDGELIQ
 DRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLIDVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDH
 LRYIIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLVGNRERKVMGLKGLQICGNSIMPLLTIFYGN
 SIADRFPTHAEQFNQINSQGYTSATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLRTYKKTGHYD
 ARACLSPATERLYSAVRHVVGQKPSSDRPYIWNQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQDI
 LPCLH (SEQ ID NO:10)

Полинуклеотидная последовательность варианта AvPAL № 42 (SEQ ID NO: 11)

ATGAAAACCTGAGTCAGGCACAGAGCAAAACCAGCAGCCAGCAGTTTAGCTTTACCGGC
 AATAGCAGCGCAAATGTGATTATTGGTAATCAGAACTGACCATCAATGATGTTGTACGT
 GTTCCCCGTAATGGCACCCCTGGTTAGCCTGACCAATAATAAAGATATTCTGCAGCGTATTACAGG
 CCAGCTGTGATTATATCAATAATGCAGTTGAAAAAGGTGAACCGATTTATGGTGTTACCAGCGG
 TTTTGGTGGTATGGCAAATGTTGTAATTAGCCGTGAACAGGCAAGCGAACTGCAGACCAATCTG
 GTTTGGTTTCTGAAAACCGGTGCAGGTAATAAACTGCCGCTGGCAGATGTTCTGTCAGCAATGC
 TGCTGCGTGCAAATAGCCACATGCGTGGTGCAAGCGGTATTCTGCTGGAAGTATTAAACGCAT
 GGAAATCTTTCTGAATGCCGGTGTACCCCGTATGTTTATGAATTTGGTAGCATTGGTGCCAGC
 GGTGATCTGTTCCGCTGAGCTATATTACCGGTAGCCTGATTGGCCTGGACCCGAGCTTTAAAG
 TTGATTTTAATGGCAAAGAAATGGACGCACCGACCGCACTGCGTCAGCTGAATCTGAGTCCGCT
 GACCCTGCTGCCGAAAGAAGGTCTGGCAATGATGAATGGCACCAGCGTTATGACCGGTATTGCA
 GCAAATTGTGTTTATGATACCCAGATTCTGACCGCAATTGCAATGGGTGTTTCATGCACTGGATA
 TTCAGGCACTGAATGGTACAAATCAGAGCTTTCATCCGTTTATCCATAACAGCAAACCGCATCC
 GGGTCAGCTGTGGGCAGCAGATCAGATGATTAGCCTGCTGGCCGGTAGCCAGCTGGTTCGTGAT
 GAACTGGATGGTAAACATGATTATATGGATGGTGAAGTATCCAGGATCGTTATAGCCTGCGTT
 GTCTGCCGAGTATCTGGGTCCGATTGTTGATGGTATTAGCCAGATTGCCAAACAAATCGAAAT
 TGAGATTAACAGCGTTACCGATAACCCGCTGATTGATGTTGATAATCAGGCAAGCTATCATGGT
 GGTAAATTTCTGGGTGAGTATGTTGGTATGGGTATGGATCATCTGCGCTATTATATCGGTCTGC
 TGGCAAACATCTGGATGTTTCAGATTGCACTGCTGGCATCACCGGAATTTAGCAATGGTCTGCC
 TCCGAGTCTGGTGGTAATCGTGAACGTAAAGTTAATATGGGTCTGAAAGGTCTGCAGATTTGC
 GGTAATAGCATTATGCCGCTGCTGACCTTTTATGGTAATAGTATTGCAGATCGTTTTCCGACCC
 ATGCCGAACAGTTTAAACAGAATATTAACAGCCAGGGTTATACCAGCGCAACCCCTGGCACGTCTG
 TAGCGTTGATATTTTTCAGAATTATGTTGCCATTGCCCTGATGTTTGGTGTTCAGGCAGTTGAT
 CTGCGTACCTACAAAAAACCGGTCAATTATGATGCACGTGCCAGCTGTCAACCGCAACCGAAC
 GTCTGTATAGCGCAGTTTCGTATGTTGTTGGTAAAAAACCGAGCTCAGATCGTCCGTATATTTG
 GAATGATAATGAACAGGGTCTGGATGAACATATTGCACGTATTAGTGCAGATATTGCAGCCGGT
 GGTGTTATTGTTCA GGCCGTTTCAGGACATTCTGCCGCCGCTGCAT (SEQ ID NO:11)

Полипептидная последовательность варианта AvPAL № 42 (SEQ ID NO: 12)

MKTLQAQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKLTINDVVRVARNGTLVSLTNNKDILQRIQASC
 DYINNAVEKGEPIYGVTSFGGGMANVVISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLR
 ANSHMRGASGIRLELIKRMIEIFLNAGVTPYVYEFSGISAGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDF
 NGKEMDAPTALRQLNLSPLTLLPKEGLAMNGTSVMTGIAANCYVDTQILTAIAMGVHALDIQA
 LNGTNQSFHPFIHNSKPHPGQLWAADQMISLLAGSQLVRDELDDGKHDMGELIQDRYSLRCLP
 QYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLIDVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDHLRYYIGLLAK
 HLDVQIALLASPEFSNGLPPLVGNRERKVMGLKGLQICGNSIMPLLTIFYGNSIADRFPTHAE
 QFNQNINSQGYTSATLARRSVDFQNYVAIALMFGVQAVDLRTYKKTGHYDARAQLSPATERLY
 SAVRHVVGKKPSSDRPYIWNDEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQDILPPLH (SEQ ID
 NO:12)

Полинуклеотидная последовательность варианта AvPAL № 43 (SEQ ID NO: 13)

ATGAAAACCCCTGAGTCAGGCACAGAGCAAAACCAGCAGCCAGCAGTTTAGCTTTACCGGCAATA
GCAGCGCAAATGTGATTATTGGTAATCAGAACTGACCATCAATGATGTTGTACGTGTTGCC
CGTAATGGCACCCTGGTTAGCCTGACCAATAATAAGATATTCTGCAGCGTATTAGGCCAGCT
GTGATTATATCAATAATGCAGTTGAAAGCGGTGAACCGATTTATGGTGTACCAGCGGTTTTGG
TGGTATGGCAAATGTTGTAATTAGCCGTGAACAGGCAAGCGAACTGCAGACCAATCTGGTTTTGG
TTTCTGAAAACCGGTGCAGGTAATAAACTGCCGCTGGCAGATGTTCTGTCAGCAATGCTGCTGC
GTGCAAATAGCCACATGCGTGGTGCAAGCGGTATTCGTCTGGAAGTGAATTAACGCATGGAAAT
CTTTCTGAATGCCGGTGTTACCCCGTATGTTTATGAATTTGGTAGCATTGGTGCCAGCGGTGAT
CTGGTTCGCTGAGCTATATTACCGGTAGCCTGATTGGCCTGGACCCGAGCTTTAAAGTTGATT
TTAATGGCAAAGAAATGGACGCACCGACCGCACTGCGTCAGCTGAATCTGAGTCCGCTGACCCCT
GCTGCCGAAAGAAGGTCTGGCAATGATGAATGGCACCAGCGTTATGACCGGTATTGCAGCAAAT
TGTGTTTATGATACCCAGATTCTGACCGCAATTGCAATGGGTGTTTCATGCACTGGATATTACAGG
CACTGAATGGTACAAATCAGAGCTTTCATCCGTTTATCCATAACAGCAAACCGCATCCGGGTCA
GCTGTGGGCAGCAGATCAGATGATTAGCCTGCTGGCCGGTAGCCAGCTGGTTCGTGATGAAGT
GATGGTAAACATGATTATATGGATGGTGAAGTATCCAGGATCGTTATAGCCTGCGTTGTCTGC
CGCAGTATCTGGGTCCGATTGTTGATGGTATTAGCCAGATTGCCAAACAAATCGAAATTGAGAT
TAACAGCGTTACCGATAACCCGCTGATTGATGTTGATAATCAGGCAAGCTATCATGGTGGTAAT
TTTCTGGGTGAGTATGTTGGTATGGGTATGGATCATCTGCGCTATTATATCGGTCTGCTGGCAA
AACATCTGGATGTTGAGATTGCACTGCTGGCATCACCGAATTTAGCAATGGTCTGCCTCCGAG
TCTGGTGGGTAATCGTGAACGTAAAGTTAATATGGGTCTGAAAGGTCTGCAGATTTGCGGTAAT
AGCATTATGCCGCTGCTGACCTTTTATGGTAATAGTATTGCAGATCGTTTTCCGACCCATGCCG
AACAGTTTAACAGAATATTAACAGCCAGGGTTATACCAGCGCAACCCCTGGCACGTCGTAGCGT
TGATATTTTTTCAAGATATGTTGCCATTGCCCTGATGTTTGGTGTTCAGGCAGTTGATCTGCGT
ACCTACAAAAAACCGGTCATTATGATGCACGTGCCAGCTGTCACCGGCAACCGAACGTCGT
ATAGCGCAGTTTCGTATGTTGTTGGTAAAAAACCGAGCTCAGATCGTCCGTATATTTGGAATGA
TAATGAACAGGGTCTGGATGAACATATTGCACGTATTAGTGCAGATATTGCAGCCGGTGGTGT
ATTGTTTCAGGCCGTTTCAGGACATTCTGCCGAACCTGCAT (SEQ ID NO:13)

Полипептидная последовательность варианта AvPAL № 43 (SEQ ID NO: 14)

MKTLSQLQSKTSSQQFSFTGNSSANV I I G N Q K L T I N D V R V A R N G T L V S L T N N K D I L Q R I Q A S C
DYINNAVESGEPIYGVTSGFSGMANVVISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLR
ANSHMRGASGIRLELIKRM E I F L N A G V T P Y V Y E F G S I G A S G D L V P L S Y I T G S L I G L D P S F K V D F
NGKEMDAPTALRQLNLSPLTLLPKEGLAMNGTSVMTGIAANCYVDTQILTAIAMGVHALDIQA
LNGTNQS F H P F I H N S K P H P Q L W A A D Q M I S L L A G S Q L V R D E L D G K H D Y M D G E L I Q D R Y S L R C L P
QYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLIDVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDHLRYIYIGLLAK
HLDVQIALLASPEFSNGLPPLVGNRERKVNMG L K L Q I C G N S I M P L L T F Y G N S I A D R F P T H A E
QFNQNINSQGYTSATLARRSV D I F Q N Y V A I A L M F G V Q A V D L R T Y K K T G H Y D A R A Q L S P A T E R L Y
SAVRHVVGK K P S S D R P Y I W N D N E Q G L D E H I A R I S A D I A A G G V I V Q A V Q D I L P N L H (SEQ ID
NO:14)

Полинуклеотидная последовательность варианта AvPAL № 1002 (SEQ ID NO: 15)

ATGAAAACCCCTGAGTCAGGCACAGAGCAAAACCAGCAGCCAGCAGTTTAGCTTTACCGGCAATA
GCAGCGCAAATGTGATTATTGGTAATCAGAACTGACCATCAATGATGTTGCGCGTGTGGCC
CGTAATGGCACCCTGGTTAGCCTGACCAATAATACCGATATTCTGCAGGGTATTAGGCCAGCT
GTGATTATATCAATAATGCAGTTGAAAGCGGTGAACCGATTTATGGTGTACCAGCGGTTTTGG
TGGTATGGCAAATGTTGTAATTAGCCGTGAACAGGCAAGCGAACTGCAGACCAATCTGGTTTTGG
TTTCTGAAAACCGGTGCAGGTAATAAACTGCCGCTGGCAGATGTTCTGTCAGCAATGCTGCTGC
GTGCAAATAGCCACATGCATGGTGCAAGCGGTATTCGTCTGGAAGTGAATTAACGCAGCGGAAAT
CTTTCTGAATGCCGGTGTTACCCCGTATGTTTATGAATTTGGTAGCATTGGTGCCAGCGGTGAT

CTGGTTCGCTGAGCTATATTACCGGTAGCCTGATTGGCCTGGACCCGAGCTTTAAAGTTGATT
 TTAATGGCAAAGAAATGGACGCACCGACCGCACTGCGTCAGCTGAATCTGAGTCCGCTGACCCCT
 GCTGCCGAAAGAAGGTCTGGCAATGATGAATGGCACCAGCGTTATGACCGGTATTGCAGCAAAT
 TGTGTTTATGATACCCAGATTCTGACCGCAATTGCAATGGGTGTTTCATGCACTGGATATTCAGG
 CACTGAATGGTACAAATCAGAGCTTTCATCCGTTTATCCATAACAGCAAACCGCATCCGGGTCA
 GCTGTGGGCAGCAGATCAGATGATTAGCCTGCTGGCCGGTAGCCAGCTGGTTCGTGATGAACTG
 GATGGTAAACATGATTATCGTGATGGTGAACGATCCAGGATCGTTATAGCCTGCGTTGTCTGC
 CGCAGTATCTGGGTCCGATTGTTGATGGTATTAGCCAGATTGCCAAACAAATCGAAATTGAGAT
 TAACAGCGTTACCGATAACCCGCTGATTGATGTTGATAATCAGGCAAGCTATCATGGTGGTAAAT
 TTTCTGGGTCAGTATGTTGGTATGGGTATGGATCATCTGCGCTATTATATCGGTGGCCTGGCAA
 AACATCTGGATGTTTCAGATTGCACTGCTGGCATCACCGGAATTTAGCAATGGTCTGCCTCCGAG
 TCTGGTGGGTAATCGTGAACGTAAAGTTAATATGGGTCTGAAAGGTCTGCAGATTTGCGGTAAT
 AGCATTATGCCGCTGCTGACCTTTTATGGTAATAGTATTGCAGATCGTTTTCCGACCCATGCCG
 AACAGTTTAACCAGAAATTAACAGCCAGGGTTATACCAGCGCAACCCTGGCACGTCGTAGCGT
 TGATATTGGCCAGAATTATGTTGCCATTGCCCTGATGTTTGGTGTTCAGGCAGTTGATCTGCGT
 ACCTACAAAAAACCGGTCATTATGATGCACGTGCCAGCTGTACCCGGCAACCGAACGTCTGT
 ATAGCGCAGTTCGTTCATGTTGTTGGTCAGAAACCGAGCTCAGATCGTCCGTATATTTGGAATGA
 TAATGAACAGGGTCTGGATGAACATATTGCACGTATTAGTGCAGATATTGCAGCCGGTGGTGT
 ATTGTTTCAGGCCGTTTCAGGACA TTCTGCCGAACCTGCAT (SEQ ID NO:15)

Полипептидная последовательность варианта AvPAL № 1002 (SEQ ID NO: 16)

MKTLSQLQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQAS
 CDYINNAVESGEPIYGVTSFGGMANVVISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAA
 MLLRANSHMHGASGIRLELIKRAEIFLNAGVTPYVYEFSGSIGASGDLVPLSYITGSLIGLDPSF
 KVDFNGKEMDAPTALRQLNLSPLTLLPK EGLAMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIAMGV
 HALDIQALNGTNQSFHPIHNSKPHPGQLWAADQMISLLAGSQLVRDELDGKH DYRDGELIQ
 DRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLIDVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDH
 LRYIIGGLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLVGNRERKVN MGLKGLQICGNSIMPLLTIFYGN
 SIADRFPTHAEQFNQININSQGYTSATLARRSVDIGQNYVAIALMFGVQAVDLR TYKKTGHYD
 ARAQLSPATERLYSAVRHVVGQKPSSDRPYIWN DNEQGLDE
 HIARISADIAAGGVIVQAVQDILPNLH (SEQ ID NO:16)

Полинуклеотидная последовательность варианта AvPAL № 1008 (SEQ ID NO: 17)

ATGAAAACCCCTGAGTCAGGCACAGAGCAAAACCAGCAGCCAGCAGTTTAGCTTTACCGGCAATA
 GCAGCGCAAATGTGATTATTGGTAATCAGAACTGACCATCAATGATGTTGCGCGTGTGCCCCG
 TAATGGCACCCCTGGTTAGCCTGACCAATAATACCGATATTCTGCAGGGTATTCAGGCCAGCTGT

GATTATATCAATAATGCAGTTGAAAGCGGTGAACCGATTTATGGTGTACCAGCGGTTTTGGTG
 GTATGGCAAATGTTGTAATTAGCCGTGAACAGGCAAGCGAACTGCAGACCAATCTGGTTTGGTT
 TCTGAAAACCGGTGCAGGTAATAAACTGCCGCTGGCAGATGTTTCGTGCAGCAATGCTGCTGCGT
 GCAAATAGCCACATGCATGGTGCAAGCGGTATTTCGTCTGGAAGTGAATTAACGCGCGGAAATCT
 TTCTGAATGCCGGTGTTACCCCGTATGTTTATGAATTTGGTAGCATTTGGTGCCAGCGGTGATCT
 GGTTCGCTGAGCTATATTACCGGTAGCCTGATTGGCCTGGACCCGAGCTTTAAAGTTGATTTT
 AATGGCAAAGAAATGGACGCACCGACCGCACTGCGTCAGCTGAATCTGAGTCCGCTGACCCGTC
 TGCCGAAAGAAGGTCTGGCAATGATGAATGGCACCAGCGTTATGACCGGTATTGCAGCAAATTG
 TGTTTATGATACCCAGATTCTGACCGCAATTGCAATGGGTGTTTCATGCACTGGATATTCAGGCA
 CTGAATGGTACAAATCAGAGCTTTCATCCGTTTATCCATAACAGCAAACCGCATCCGGGTCAGC
 TGTGGGCAGCAGATCAGATGATTAGCCTGCTGGCCGGTAGCCAGCTGGTTCGTGATGAACCTGGA
 TGGTAAACATGATTATCGTGATGGTGAAGTATCCAGGATCGTTATAGCCTGCGTTGTCTGCCG
 CAGTATCTGGGTCCGATTGTTGATGGTATTAGCCAGATTGCCAAACAAATCGAAATTGAGATTA
 ACAGCGTTACCGATAACCCGCTGATTGATGTTGATAATCAGGCAAGCTATCATGGTGGTAATTT
 TCTGGGTCAGTATGTTGGTATGGGTATGGATCATCTGCGCTATTATATCGGTGGCCTGGCAAAA
 CATCTGGATACCCAGATTGCACTGCTGGCATCACCGGAATTTAGCAATGGTCTGCCTCCGAGTC
 TGGTGGGTAATCGTGAACGTAAAGTTAATATGGGTCTGAAAGGTCTGCAGATTTGCGGTAATAG
 CATTATGCCGCTGCTGACCTTTTATGGTAATAGTATTGCAGATCGTTTTCCGACCCATGCCGAA
 CAGTTTAACAGAATATTAACAGCCAGGGTTATACCAGCGCAACCTGGCACGTCGTAGCGTTG
 ATATTGGCCAGAATTATGTTGCCATTGCCCTGATGTTTGGTGTTCAGGCAGTTGATCTGCGTAC
 CTACAAAAAACCGGTCATTATGATGCACGTGCCAGCTGTCACCGCAACCGAACGTCTGTAT
 AGCGCAGTTCGTATGTTGTTGGTCAGAAACCGAGCTCAGATCGTCCGTATATTGGAATGATA
 ATGAACAGGGTCTGGATGAACATATTGCACGTATTAGTGCAGATATTGCAGCCGGTGGTGTAT
 TGTTTCAGGCCGTTTCAGGACA TTCTGCCGAACCTGCAT (SEQ ID NO:17)

Полипептидная последовательность варианта AvPAL № 1008 (SEQ ID NO: 18)

MKTLSQLQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGI
 QASCDYINNAVESGEPIYGVTSFGGGMANVVISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVR
 AAMLLRANSHMHGASGIRLELIKRAEIFLNAGVTPYVYEFSGISAGDLVPLSYITGSLIGLDP
 SFKVDNFNGKEMDAPTALRQLNLSPLTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIAM
 GVHALDIQALNGTNQSFHPFIHNSKPHPGQLWAADQMISLLAGSQLVRDELKGKHDYRDGE
 LIQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLIDVDNQASYHGGNFLGQYVGMGM
 DHLRYIYGGLAKHLDLQIALLASPEFSNGLPPLVGNRERKVNMLKGLQICGNSIMPLLTIFY
 GNSIADRFPTHAEQFNQININSQGYTSATLARRSVDIGQNYVAIALMFGVQAVDLRTYKKTGH
 YDARAQLSPATERLYSAVRHVVGQKPSSDRPYIWNQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQD
 ILPNLH (SEQ ID NO:18)

Полинуклеотидная последовательность варианта AvPAL № 1009 (SEQ ID NO: 19)

ATGAAAACCTGAGTCAGGCACAGAGCAAAACCAGCAGCCAGCAGTTTAGCTTTACCGGCAATA
 GCAGCGCAAATGTGATTATTGGTAATCAGAACTGACCATCAATGATGTTGCGCGTGTGCCCCG
 TAATGGCACCTGGTTAGCCTGACCAATAATACCGATATTCTGCAGGGTATTAGGCCAGCTGT
 GATTATATCAATAATGCAGTTGAAAGCGGTGAACCGATTATGGTGTACCAGCGGTTTTGGTG
 GTATGGCAAATGTTGTAATTAGCCGTGAACAGGCAAGCGAACTGCAGACCAATCTGGTTTGGTT
 TCTGAAAACCGGTGCAGGTAATAAACTGCCGTGGCAGATGTTCTGTCAGCAATGCTGCTGCGT
 GCAAATAGCCACATGCATGGTGCAAGCGGTATTCTGCTGGAAGTATTAAACGCGCGGAAATCT
 TTCTGAATGCCGGTGTACCCCGTATGTTTATGAATTTGGTAGCATTGGTGCCAGCGGTGATCT
 GGTTCGCTGAGCTATATTACCGGTAGCCTGATTGGCCTGGACCCGAGCTTTAAAGTTGATTTT
 AATGGCAAAGAAATGGACGCACCGACCGCACTGCGTCAGCTGAATCTGAGTCCGCTGACCCTGC
 TGCCGAAAGAAGGTCTGGCAATGATGAATGGCACCAGCGTTATGACCGGTATTGCAGCAAATTG
 TGTATGATACCCAGATTCTGACCGCAATTGCAATGGGTGTTTATGCACTGGATATTAGGCA
 CTGAATGGTACAAATCAGAGCTTTCATCCGTTTATCCATAACAGCAAACCGCATCCGGGTCAGC
 TGTGGGCAGCAGATCAGATGATTAGCCTGCTGGCCGGTAGCCAGCTGGTTCGTGATGAACTGGA
 TGGTAAACATGATTATCGTGATGGTGAAGTATCCAGGATCGTTATAGCCTGCGTTGTCTGCCG
 CAGTATCTGGGTCCGATTGTTGATGGTATTAGCCAGATTGCCAAACAAATCGAAATTGAGATTA
 ACAGCGTTACCGATAACCCGCTGATTGATGTTGATAATCAGGCAAGCTATCATGGTGGTAATTT
 TCTGGGTCAGTATGTTGGTATGGGTATGGATCATCTGCGCTATGAAATCGGTCTGCTGGCAAAA
 CATCTGGATGTTTCAAGATTGCACTGCTGGCATCACCGGAATTTAGCAATGGTCTGCCTCCGAGTC
 TGGTGGGTAATCGTGAACGTAAAGTTAATATGGGTCTGAAAGGTCTGCAGATTTGCGGTAATAG
 CATTATGCCGCTGCTGACCTTTTATGGTAATAGTATTGCAGATCGTTTCCGACCCATGCCGAA
 CAGTTTAAACAGAAATTAACAGCCAGGGTTATACCAGCGCAACCCCTGGCACGTCGTAGCGTTG
 ATATTGGCCAGAATTATGTTGCCATTGCCCTGATGTTTGGTGTTCAGGCAGTTGATCTGCGTAC
 CTACAAAAAACCGGTCAATTATGATGCACGTGCCAGCTGTACCGGCAACCGAACGTCGTAT
 AGCGCAGTTCGTGATGTTGTTGGTCAGAAACCGAGCTCAGATCGTCCGTATATTTGGAATGATA
 ATGAACAGGGTCTGGATGAACATATTGCACGTATTAGTGCAGATATTGCAGCCGGTGGTGTAT
 TGTTTCAGGCCGTTTCAGGACA TTCTGCCGAACCTGCAT (SEQ ID NO:19)

Полипептидная последовательность варианта AvPAL № 1009 (SEQ ID NO: 20)

MKTLSQLQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGI
 QASCDYINNAVESGEPIYGVTSFGFGMANVVISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADV
 AAMLLRANSHMHGASGIRLELIKRAEIFLNAGVTPYVYEFSGISAGDLVPLSYITGSLIGLDP
 SFKVDFNGKEMDAPTALRQLNLSPLTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCYVDTQILTAIAM
 GVHALDIQALNGTNQSFHPIHNSKPHPGQLWAADQMISLLAGSQLVRDELDTGKHDRDGE
 LIQDRYSLRCLPQYLGPVVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLIDVDNQASYHGGNFLGQYVGMGM
 DHLRYEIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLVGNRERKVMGLKGLQICGNSIMPLLTIFY
 GNSIADRFPHTAEQFNQININSQGYTSATLARRSVDIGQNYVAIALMFGVQAVDLRTYKKTGH
 YDARAQLSPATERLYSAVRHVVGQKPSSDRPYIWNDEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAV
 QDILPNLH (SEQ ID NO:20)

Полинуклеотидная последовательность варианта AvPAL № 1010 (SEQ ID NO: 21)

ATGAAAACCTGAGTCAGGCACAGAGCAAAACCAGCAGCCAGCAGTTTAGCTTTACCGGCAATA
GCAGCGCAAATGTGATTATTGGTAATCAGAACTGACCATCAATGATGTTGCGCGTGTGCCCC
TAATGGCACCTGGTTAGCCTGACCAATAATACCGATATTCTGCAGGGTATTCAGGCCAGCTGT
GATTATATCAATAATGCAGTTGAAAGCGGTGAACCGATTATGGTGTACCAGCGGTTTTGGTG
GTATGGCAAATGTTGTAATTAGCCGTGAACAGGCAAGCGAACTGCAGACCAATCTGGTTTGGTT
TCTGAAAACCGGTGCAGGTAATAAACTGCCGCTGGCAGATGTTCTGTCAGCAATGCTGCTGCGT
GCAAATAGCCACATGCATGGTGCAAGCGGTATTCGTCTGGAAGTATTAAACGCGCGGAAATCT
TTCTGAATGCCGGTGTACCCCGTATGTTTATGAATTTGGTAGCATTTGGTGCCAGCGGTGATCT
GGTTCGCGTGAGCTATATTACCGGTAGCCTGATTGGCCTGGACCCGAGCTTTAAAGTTGATTTT
AATGGCAAAGAAATGGACGCACCGACCGCACTGCGTCAGCTGAATCTGAGTCCGCTGACCCCTGC
TGCCGAAAGAAGGTCTGGCAATGATGAATGGCACCAGCGTTATGACCGGTATTGCAGCAAATTG
TGTTTATGATACCCAGATTCTGACCGCAATTGCAATGGGTGTTTCATGCACTGGATATTCAGGCA
CTGAATGGTACAAATCAGAGCTTTCATCCGTTTATCCATAACAGCAAACCGCATCCGGGTGAGC
TGTGGGCAGCAGATCAGATGATTAGCCTGCTGGCCGGTAGCCAGCTGGTTCGTGATGAACTGGA
TGGTAAACATGATTATCGTGATGGTGAAGTATCCAGGATCGTTATAGCCTGCGTTGTCTGCCG
CAGTATCTGGGTCCGATTGTTGATGGTATTAGCCAGATTGCCAAACAAATCGAAATTGAGATTA
ACAGCGTTACCGATAACCCGCTGATTGATGTTGATAATCAGGCAAGCTATCATGGTGGTAATTT
TCTGGGTCAGTATGTTGGTATGGGTATGGATCATCTGCGCTATGAAATCGGTCTGCTGGCAAAA
CATCTGGATACCCAGATTGCACTGCTGGCATCACCGGAATTTAGCAATGGTCTGCCTCCGAGTC
TGGTGGGTAATCGTGAACGTAAAGTTAATATGGGTCTGAAAGGTCTGCAGATTTGCGGTAATAG
CATTATGCCGCTGCTGACCTTTTATGGTAATAGTATTGCAGATCGTTTTCCGACCCATGCCGAA
CAGTTTAACAGAATATTAACAGCCAGGGTTATACCAGCGCAACCTGGCACGTCGTAGCGTTG
ATATTGGCCAGAATTATGTTGCCATTGCCCTGATGTTTGGTGTTCAGGCAGTTGATCTGCGTAC
CTACAAAAAACCGGTCATTATGATGCACGTGCCAGCTGTCACCGGCAACCGAACGTCTGTAT
AGCGCAGTTCGTCTATGTTGTTGGTCAGAAACCGAGCTCAGATCGTCCGTATATTTGGAATGATA
ATGAACAGGGTCTGGATGAACATATTGCACGTATTAGTGCAGATATTGCAGCCGGTGGTGTAT
TGTTTCAGGCCGTTTCAGGACA TTCTGCCGAACCTGCAT (SEQ ID NO: 21)

Полипептидная последовательность варианта AvPAL № 1010 (SEQ ID NO: 22)

MKTLSQLQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGI
QASCDYINNAVESGEPIYGVTSFGFGGMANVVISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVR
AAMLLRANSHMHGASGIRLELIKRAEIFLNAGVTPYVYEFSGISAGDLVPLSYITGSLIGLDP
SFKVDFNGKEMDAPTALRQLNLSPLTLLPKGLAMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIAM
GVHALDIQALNGTNQSFHPFIHNSKPHPGQLWAADQMISLLAGSQLVRDELGKHBYRDGE
LIQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLIDVDNQASYHGGNFLGQYVGMGM
DHLRYEIGLLAKHLDLQIALLASPEFSNGLPPSLVGNRERKVNMLKGLQICGNSIMPLLTIFY
GNSIADRFPTAEQFNQININSQGYTSATLARRSVDIGQNYVAIALMFGVQAVDLRTYKKTGH
YDARAQLSPATERLYSAVRHVVGQKPSSDRPYIWNDEQGLDE
HIARISADIAAGGVIVQAVQDILPNLH (SEQ ID NO: 22)

Полинуклеотидная последовательность варианта AvPAL № 1084 (SEQ ID NO: 23)

ATGAAAACCCCTGAGTCAGGCACAGAGCAAAACCAGCAGCCAGCAGTTTAGCCATACCGGCAAT
 AGCAGCGCAAATGTGATTATTGGTAATCAGAAACTGACCATCAATGATGTTGTACGTGTTGCC
 GTAATGGCACCGCGGTTAGCCTGACCAATAATAAAGATATTCTGCAGCGTATTGAGCCAGCTG
 TGATTATATCAATAATGCAGTTGAAAAAGGTGAACCGATTTATGGTGTACCAGCGGTTTGGT
 GGTATGGCAAATGTTGTAATTAGCCGTGAACAGGCAAGCGAACTGCAGACCAATCTGGTTTGGT
 TTCTGAAAACCGGTGCAGGTAATAAACTGCCGCTGGCAGATGTTCTGTCAGCAATGCTGCTGCG
 TGCAAATAGCCACATGCGTGGTGCAAGCGGTATTCTGCTGGAAGTGAATTAACGCATGGAAATC
 TTTCTGAATGCCGGTGTTACCCCGTATGTTTATGAATTTGGTAGCATTGGTGCCAGCGGTGATC
 TGGTTCCGCTGAGCTATATTACCCGTAGCCTGATTGGCCTGGACCCGAGCTTTAAAGTTGATTT
 TAATGGCAAAGAAATGGACGCACCGACCGCACTGCGTCAGCTGAATCTGAGTCCGCTGACCCTG
 CAGCCGAAAAGGCTGCGCAATGATGAATGGCACCAGCGTTATGACCGGTATTGCAGCAAATT
 GTGTTTATGATACCCAGATTCTGACCGCAATTGCAATGGGTGTTTCATGCACTGGATATTCAGGC
 ACTGAATGGTACAAATCAGAGCTTTCATCCGTTTATCCATAACAGCAAACCGCATCCGGGTGAG
 CTGTGGGCAGCAGATCAGATGATTAGCCTGCTGGCCGGTAGCCAGCTGGTTCGTGATGAACTGG
 ATGGTAAACATGATTATATGGATGGTGAAGTATCCAGGATCGTTATAGCCTGCGTTGTCTGCC
 GCAGTATCTGGGTCCGATTGTTGATGGTATTAGCCAGATTGCCAAACAAATCGAAATTGAGATT
 AACAGCGTTACCGATAACCCGCTGATTGATGTTGATAATCAGGCAAGCTATCATGGTGGTAATT
 TTCTGGGTGAGTATGTTGGTATGGGTATGGATCATCTGCGCTATTATATCGGTCTGCTGGCAAA
 ACATCTGGATGTTGAGATTGCACTGCTGGCATCACCGGAATTTAGCAATGGTCTGCCTCCGAGT
 CTGGTGGGTAATCGTGAACGTAAAGTTAATATGGGTCTGAAAGGTCTGCAGATTTGCGGTAATA
 GCATTATGCCGCTGCTGACCTTTTATGGTAATAGTATTGCAGATCGTTTTCCGACCCATGCCGA
 ACAGTTTAAACAGAATATTAACAGCCAGGGTTATACCAGCGCAACCTGGCACGTCGTAGCGTT
 GATATTTTTTCAGAATTATGTTGCCATTGCCCTGATGTTTGGTGTTCAGGCAGTTGATCTGCGTA
 CCTACAAAAAACCGGTCATTATGATGCACGTGCCAGCTGTCACCGGCAACCGAACGTCTGTA
 TAGCGCAGTTTCGTATGTTGTTGGTAAAAAACCGAGCTCAGATCGTCCGTATATTGGAATGAT
 AATGAACAGGGTCTGGATGAACATATTGCACGTATTAGTGCAGATATTGCAGCCGGTGGTGTTA
 TTGTTGAGGCCGTTTCTGAGTACATTTCTGCGCCGCTGCAT

Полипептидная последовательность варианта AvPAL № 1084 (SEQ ID NO: 24)

MKTLQAQSKTSSQQFSHTGNSSANV IIGNQKLTINDVVRVARNGTAVSLTNNKDILQRI
 QASCDYINNAVEKGEPIYGVTSFGGMANVVISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADV
 RAAMLLRANSHMRGASGIRLELIKRMELFLNAGVTPYVYEFSGSIGASGDLVPLSYITGSLIGLD
 PSFKVDFNGKEMDAPTALRQLNLSPLTLQPKGLAMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIA
 MGVALDIQALNGTNQSFHPIHNSKPHPGQLWAADQMISLLAGSQLVRDELDGKHDYMD
 GELIQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLIDVDNQASYHGGNFGQYVGM
 GMDHLRYYIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPLVGNRERKVNMGKGLQICGNSIMPLL
 TFYGNSIADRFPTHAEQFNQININSQGYTSATLARRSVDFQNYVAIALMFGVQAVDLRTYKK
 TGHYDARAQLSPATERLYSAVRHVVGKKPSSDRPYIWNQGLDE
 HIARISADIAAGGVIVQAVQDILPPLH (SEQ ID NO: 24)

Полинуклеотидная последовательность варианта AvPAL № 967 (SEQ ID NO: 25)

ATGAAAACCTGAGTCAGGCACAGAGCAAAACCAGCAGCCAGCAGTTTAGCTTTACCGG
 CAATAGCAGCGCAAATGTGATTATTGGTAATCAGAACTGACCATCAATGATGTTGCGC
 GTGTTGCCCGTAATGGCACCTGGTTAGCCTGACCAATAATACCGATATTCTGCAGGGTA
 TTCAGGCCAGCTGTGATTATATCAATAATGCAGTTGAAAGCGGTGAACCGATTATGGTG
 TTACCAGCGGTTTTGGTGGTATGGCAAATGTTGTAATTAGCCGTGAACAGGCAAGCGAAC
 TGCAGACCAATCTGGTTTGGTTTCTGAAAACCGGTGCAGGTAATAAACTGCCGCTGGCAG
 ATGTTTCGTGCAGCAATGCTGCTGCGTGCAAATAGCCACATGCGTGGTGCAAGCGGTATTC
 GTCTGGAAGTATTAAACGCGCGGAAATCTTTCTGAATGCCGGTGTTACCCCGTATGTTT
 ATGAATTTGGTAGCATTGGTGCCAGCGGTGATCTGGTTCGCTGAGCTATATTACCGGTA
 GCCTGATTGGCCTGGACCCGAGCTTTAAAGTTGATTTTAATGGCAAAGAAATGGACGCAC
 CGACCGCACTGCGTCAGCTGAATCTGAGTCCGCTGACCCTGCTGCCGAAAGAAGGTCTG
 GCAATGATGAATGGCACCAGCGTTATGACCGGTATTGCAGCAAATTGTGTTTATGATACC
 CAGATTCTGACCGCAATTGCAATGGGTGTTTCATGCACTGGATATTCAGGCACTGAATGGT
 ACAAATCAGAGCTTTTCATCCGTTTATCCATAACAGCAAACCGCATCCGGGTGAGCTGTGG
 GCAGCAGATCAGATGATTAGCCTGCTGGCCGGTAGCCAGCTGGTTCGTGATGAACTGGA
 TGGTAAACATGATTATCGTGATGGTGAAGTATCCAGGATCGTTATAGCCTGCGTTGTCT
 GCCGAGTATCTGGGTCCGATTGTTGATGGTATTAGCCAGATTGCCAAACAAATCGAAAT
 TGAGATTAACAGCGTTACCGATAACCCGCTGATTGATGTTGATAATCAGGCAAGCTATCA
 TGGTGGTAATTTTCTGGGTGAGTATGTTGGTATGGGTATGGATCATCTGCGCTATTATATC
 GGTGGCTGGCAAAACATCTGGATGTTTCAAGTATGCACTGCTGGCATCACCGGAATTTAGC
 AATGGTCTGCCTCCGAGTCTGGTGGTAAATCGTGAACGTAAAGTTAATATGGGTCTGAAA
 GGTCTGCAGATTTGCGGTAATAGCATTATGCCGCTGCTGACCTTTTATGGTAATAGTATT
 GCAGATCGTTTTCCGACCCATGCCGAACAGTTTAACCAGAATATTAACAGCCAGGGTTAT
 ACCAGCGCAACCTGGCAGCTCGTAGCGTTGATATTGGCCAGAATTATGTTGCCATTGCC
 CTGATGTTTGGTGTTCAGGCAGTTGATCTGCGTACCTACAAAAAACCGGTCAATTATGAT
 GCACGTGCCAGCTGTACCGGCAACCGAACGTCTGTATAGCGCAGTTTCGTCATGTTGTT
 GGTGAGAAACCGAGCTCAGATCGTCCGTATATTTGGAATGATAATGAACAGGGTCTGGA
 TGAACATATTGCACGTATTAGTGCAGATATTGCAGCCGGTGGTGTATTGTTTCAGGCCGT
 TCAGGACATTCTGCCGAACCTGCAT (SEQ ID NO:25)

Полипептидная последовательность варианта № 967 (SEQ ID NO: 26)

MKTLQAQSKTSSQFSTGNSSANVIIGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQAS
 CDYINNAVESGEPIYGVTSFGGMANVVISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAA
 MLLRANSHMRGASGIRLELIKRAEIFLNAGVTPYVYEFSGISGSDLVPLSYITGSLIGLDPSF
 K VDFNGKEMDAPTALRQLNLSPLTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIAMGVH
 ALDIQALNGTNQSFHPIHNSKPHPGQLWAADQMISLLAGSQLVRDELKGKHDYRDGELIQD
 RYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLIDVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDHL
 RYYIGGLAKHLVDQIALLASPEFSNGLPPSLVGNRERKVNMGKGLQICGNSIMPLLTIFYGNS
 IADRFPTHAEQFNQININSQGYTSATLARRSVDIGQNYVAIALMFGVQAVDLRTYKKTGHYDA
 RAQLSPATERLYSAVRHVVGQKPPSSDRPYIWNNDNEQGLDE
 HIARISADIAAGGVIVQAVQDILPNLH (SEQ ID NO:26)

Экспрессирующий вектор pCK100900i

TGGCCACCATCACCATCACCATTAGGGAAGAGCAGATGGGCAAGCTTGACCTGTGAAGT
GAAAAATGGCGCACATTGTGCGACATTTTTTTTTGAATTCTACGTAAAAAGCAGCCGATA
CATCGGCTGCTTTTTTTTTGNNNGAGGTTCCAACCTGTGGTATAATGAAATAAGATCACT
CCGGAGCGTATTTTTTGAGTTATCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAGGAACTAAAATGGA
GAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGAACATTT
TGAGGCATTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTGGATATTAC
GGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAGTTTTATCCGGCCTTTATTACAT
TCTTGCCCGCCTGATGAATGCTCATCCGGAGTTCCGTATGGCAATGAAAGACGGTGAGCT
GGTGATATGGGATAGTGTTACCCCTTGTTACACCGTTTTCCATGAGCAAACCTGAAACGTT
TTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATATTCGCA
AGATGTGGCGTGTTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAGAATAT
GTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTGTATTTAAACGTGGCCAAT
ATGGACAACCTCTTCGCCCCGTTTTTCACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGCGACAAG

GTGCTGATGCCGCTGGCGATTGAGGTTTCATCATGCCGTCTGTGATGGCTTCCATGTCGGC
AGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGCGTAAGTGA
GGAGCTCAAACAGCAGCCTGTATTGAGGCTGCTTTTTTCGTTTTGGTCTGCGCGTAATCTC
TTGCTCTGAAAACGAAAAACCGCCTTGAGGGCGGTTTTTCGAAGGTTCTCTGAGCTAC
CAACTCTTTGAACCGAGGTAAGTGGCTTGGAGGAGCGCAGTCACCAAACTTGTCCTTTC
AGTTTAGCCTTAACCGGCGCATGACTTCAAGACTAACTCCTCTAAATCAATTACCAGTGG
CTGCTGCCAGTGGTGCTTTTGTCATGTCTTTCCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGG
ATAAGGCGCAGCGGTCGGACTGAACGGGGGTTTCGTGCATACAGTCCAGCTTGGAGCGA
ACTGCCTACCCGGAAGTGAAGTGTGAGCGGTGAATGAGACAAACGCGGCCATAACAGCG
GAATGACACCGGTAAACCGAAAGGCAGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCCGCCAGG
GGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTTGCCACCACTGATTTGAGCGTCA
GATTTTCGTGATGCTTGTGAGGGGGCGGAGCCTATGGAACCGGCTTTGCCGCGGCCCT
CTCACTTCCCTGTTAAGTATCTTCCCTGGCATCTTCCAGGAAATCTCCGCCCCGTTTCGTAAG
CCATTTCCGCTCGCCGCGAGTCGAACGACCGAGCGTAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCG
GAATATATCTGTATCACATATTCTGCTGACGCACCGGTGCAGCCTTTTTTCTCCTGCCAC
ATGAAGCACTTCACTGACACCCTCATCAGTGAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTA
GGCCTATGGCCTTTTTTTTTTNTGNNAACCTTTCGCGGTATGGNATNANAGCGCCCGGA
AGAGAGTCAATTAAGAGGGTGGTGAATGTGAAACCAGTAACGTTATACGATGTCGCAGA
GTATGCCGGTGTCTTATCAGACCGTTTCCCGCGTGGTGAACCAGGCCAGCCACGTTTC
TGCGAAAACGCGGGAAAAAGTGAAGCGGCGATGGCGGAGCTGAATTACATTCCCAACC
GCGTGGCACAACAACTGGCGGGCAAACAGTCGTTGCTGATTGGCGTTGCCACCTCCAGTC
TGGCCCTGCACGCGCCGTCGCAAATTGTGCGCGCGATTAAATCTCGCGCCGATCAACTGG
GTGCCAGCGTGGTGGTGTGATGGTAGAACGAAGCGGCGTGAAGCCTGTAAAGCGGCG
GTGCACAATCTTCTCGCGCAACGCGTCAGTGGGCTGATCATTAACATATCCGCTGGATGAC
CAGGATGCCATTGCTGTGGAAGCTGCCTGCACTAATGTTCCGGCGTTATTTCTTGATGTCT
CTGACCAGACACCCATCAACAGTATTATTTCTCCCATGAAGACGGTACGCGACTGGGCG
TGGAGCATCTGGTCGCATTGGGTACCCAGCAAATCGCGCTGTTAGCGGGCCCATTAAGTT
CTGTCTCGGCGCGTCTGCGTCTGGCTGGCTGGCATAAATATCTCACTCGCAATCAAATTC
AGCCGATAGCGGAACGGGAAGGCGACTGGAGTGCCATGTCCGGTTTTCAACAAACCATG
CAAATGCTGAATGAGGGCATCGTTCCCACTGCGATGCTGGTTGCCAACGATCAGATGGC
GCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGAGTCCGGGCTGCGCGTTGGTGCAGACATCTCGGT
AGTGGGATACGACGATACCGAAGACAGCTCATGTTATATCCCGCCGTTAACCACCATCA
AACAGGATTTTCGCTGCTGGGGCAAACAGCGTGGACCGCTTGTGCAACTCTCTCAGG
GCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAAAAGAAAAACCACC
CTGGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTATTAATGCAGCTG
GCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGGTACCCGATAAAAGCGGCTT

CCTGACAGGAGGCCGTTTTGTTTCTCGAGTTAATTAAGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAA
 TGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATG
 TTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC
 GGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAATCTAGAGGCCAGCCTGGCCATAAGGAGATATACAT
 ATGGGCCATCATCATCATCATCATCATCATCACAGCAGCGCCATATCGAAGGTCGT
 CATATGAAAACCTGAGCCAGGCACAGAGCAAAACCAGCAGCCAGCAGTTTAGCTTTAC
 CGGCAATAGCAGCGCAAATGTGATTATTGGTAATCAGAACTGACCATCAATGATGTTG
 CACGTGTTGCCGTAATGGCACCCCTGGTTAGCCTGACCAATAATACCGATATTTCTGCAGG
 GTATTCAAGCCAGCTGTGATTATATCAATAATGCAGTTGAAAGCGGTGAACCGATTTATG
 GTGTTACCAGCGGTTTTGGTGGTATGGCAAATGTTGCAATTAGCCGTGAACAGGCAAGCG
 AACTGCAGACCAATCTGGTTTTGGTTTCTGAAAACCGGTGCAGGTAATAAACTGCCGCTGG
 CAGATGTTCTGTCAGCAATGCTGCTGCGTGCAAATAGCCACATGCGTGGTGCAAGCGGT
 ATTCGTCTGGAACGATTAAACGCATGGAAATCTTTCTGAATGCCGGTGTACCCCGTAT
 GTTTATGAATTTGGTAGCATTGGTGCCAGCGGTGATCTGGTTCCGCTGAGCTATATTACC
 GGTAGCCTGATTGGCCTGGACCCGAGCTTTAAAGTTGATTTTAATGGCAAAGAAATGGAC
 GCACCGACCGCACTGCGTCAGCTGAATCTGAGTCCGCTGACCCCTGCTGCCGAAAGAAGG
 TCTGGCAATGATGAATGGCACCAGCGTTATGACCGGTATTGCAGCAAATTGTGTTTATGA
 TACCCAGATTCTGACCGCAATTGCAATGGGTGTTTCATGCACTGGATATTCAGGCACTGAA
 TGGTACAAATCAGAGCTTTTCATCCGTTTATCCATAACAGCAAACCGCATCCGGGTCAGCT
 GTGGGCAGCAGATCAGATGATTAGCCTGCTGGCCAATAGCCAGCTGGTTCTGATGAAC
 TGGATGGTAAACATGATTATCTGATCATGAACGATCCAGGATCGTTATAGCCTGCGTT
 GTCTGCCGAGTATCTGGGTCCGATTGTTGATGGTATTAGCCAGATTGCCAAACAAATCG
 AAATTGAGATTAACAGCGTTACCGATAACCCGCTGATTGATGTTGATAATCAGGCAAGCT
 ATCATGGTGGTAATTTTCTGGGTGAGTATGTTGGTATGGGTATGGATCATCTGCGCTATTA
 TATCGGTCTGCTGGCAAACATCTGGATGTTTCAGATTGCACTGCTGGCATCACCGGAATT
 TAGCAATGGTCTGCCTCCGAGTCTGCTGGGTAATCGTGAACGTAAAGTTAATATGGGTCT
 GAAAGGTCTGCAGATTTGCGGTAATAGCATTATGCCGCTGCTGACCTTTTATGGTAATAG
 TATTGCAGATCGTTTTTCCGACCCATGCCGAACAGTTTAACCAGAATATTAACAGCCAGGG
 TTATACCAGCGCAACCCTGGCACGTCGTAGCGTTGATATTTTTCAGAATTATGTTGCCATT
 GCCCTGATGTTTGGTGTTCAGGCAGTTGATCTGCGTACCTACAAAAAACCGGTCAATTAT
 GATGCACGTGCCTGTCTGTCCACGGCAACCGAACGTCTGTATAGCGCAGTTCTGTCATGTT
 GTTGGTCAGAAACCGACCTCAGATCGTCCGTATATTTGGAATGATAATGAACAGGGTCTG
 GATGAACATATTGCACGTATTAGTGCAGATATTGCAGCCGGTGGTGTATTGTTTCAGGCC
 GTTCAGGACATTCTGCCGTGTCTGCATTAAGGCCAAAC (SEQ ID NO:27)

Пример 1. Получение гена PAL и конструкция экспрессирующих векторов.

Плазмидную ДНК фенилаланин-аммиак-лиазы *Anabaena variabilis* (AvPAL) получали и синтетический ген, кодирующий AvPAL, подвергали оптимизации кодона для экспрессии в *E. coli* и клонировали в экспрессирующий вектор pET16b *E. coli* с получением pET16b-AvPAL (SEQ ID NO: 1). Открытую рамку считывания AvPAL (SEQ ID NO: 2) амплифицировали посредством ПЦР с использованием олигонуклеотидов PAL-pCK-F и PAL-pCK-R и субклонировали в экспрессирующий вектор pCK100900i (SEQ ID NO: 27).

Праймер	Последовательность 5'-3'	SEQ ID NO:
PAL-pCK-F	CTAGAGGCCAGCCTGGCCATAAGGAGATATACATATG AAAACCCCTGAGCCAGGCAC	SEQ ID NO: 28
PAL-pCK-R	GATGGTGATGGTGGCCAGTTTGGCCTTAATGCAGACA CGGCAGAATG	SEQ ID NO: 29

Эту плазмидную конструкцию трансформировали в штамм *E. coli*, получаемый из W3110. Для по-

лучения библиотек вариантов гена на основании этой плазмидной конструкции использовали способы направленной эволюции, как правило, известные специалистам в данной области (см., например, патент США № 8383346 и WO 2010/144103).

Пример 2. Высокоэффективный рост и высокопроизводительные (НТР) анализы.

Высокоэффективный рост PAL и высокопроизводительные (НТР) варианты PAL.

Отбирали трансформированные клетки *E. coli* путем высевания на планшеты с агаром LB, содержащим 1% глюкозы и 30 мкг/мл хлорамфеникола. После инкубации в течение ночи при 37°C колонии помещали в лунки 96-луночных плоскодонных планшетов NUNC™ (Thermo-Scientific), наполненных 180 мкл/лунку LB, дополненным 1% глюкозой и 30 мкг/мл хлорамфениколом. Культуры оставляли расти в течение ночи в течение 18-20 ч во встряхивателе (200 об/мин, 30°C и при относительной влажности 85%; Kuhner).

Выросшие в течение ночи образцы (20 мкл) переносили в 96-луночные планшеты с глубокими лунками Costar, наполненными 380 мкл бульона Terrific, дополненного 30 мкг/мл хлорамфеникола. Планшеты инкубировали в течение 135 мин в шейкере (250 об/мин, 30°C и относительной влажности 85%; Kuhner). Затем клетки индуцировали 40 мкл 10 мМ IPTG в стерильной воде и инкубировали в течение ночи в течение 20-24 ч во встряхивателе (250 об/мин, 30°C и относительной влажности 85%; Kuhner). Объединяли культуры двух повторений, клетки осаждали (4000 об/мин × 20 мин), удаляли супернатанты и замораживали клетки при -80°C до анализа.

Лизирование НТР осадков.

Сначала к осадкам клеток добавляли 500 мкл лизирующего буфера (20 мМ Tris pH 7,5, 1 мМ MgSO₄, 1 мг/мл лизоцима и 0,5 мг/мл сульфата полимиксина В). Смесь перемешивали в течение 1,5 ч при комнатной температуре и осаждали центрифугированием (4000 об/мин × 5 мин) перед тем, как использовать осветленные лизаты в различных НТР анализах, описываемых в настоящем описании. Анализ таких лизатов посредством SDS-PAGE выявлял наличие сверхэкспрессированного белка кажущейся M_w ~60 кДа, соответствующей ожидаемой M_w PAL.

Анализ осветленных лизатов.

Активность вариантов PAL определяли путем измерения образования коричной кислоты, как определяют по изменению оптической плотности при 290 нм в течение определенного периода времени. Для этого анализа в лунки полиакрилатного 96-луночного планшета (Costar № 3635, Corning) добавляли 100 мкл 200 мМ Tris/50 мМ фенилаланина, pH 7,5 или 200 мМ фосфата натрия/50 мМ фенилаланина pH 7,0, 80 мкл воды и 20 мкл осветленного лизата. Реакционные смеси быстро перемешивали и определяли активность путем наблюдения оптической плотности при 290 нм в течение определенного периода времени (каждые 12-20 с в течение 5-20 мин) с использованием микропланшетного спектрофотометра для определения оптической плотности SpectraMax® Plus384 или SpectraMax® 190 (Molecular Devices).

НТР анализ осветленных лизатов, предварительно обрабатываемых протеазой.

Варианты PAL обрабатывали химотрипсином и трипсином для имитации среды нижнего отдела кишечника. Сначала в лунки 96-луночного круглодонного планшета (Costar № 3798, Corning) добавляли 30 мкл смеси протеазы (0,01-100 мг/мл химотрипсина (C4129 Sigma Aldrich), 0,01-100 мг/мл трипсина (T7409 Sigma Aldrich), 1 мМ CaCl₂ и 1 мМ HCl), 0-30 мкл 20 мМ таурохолата натрия в 500 мМ фосфате натрия pH 7,0 и 90-120 мкл осветленного лизата. Планшеты герметично закрывали и инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 400 об/мин, амплитуда качания 1" до анализа. Для анализа в лунки полиакрилатного 96-луночного планшета (Costar № 3635, Corning) добавляли 100 мкл 200 мМ Tris/50 мМ фенилаланина pH 7,5 или 200 мМ фосфата натрия/50 мМ фенилаланина pH 7,0 и 100 мкл обработанного протеазой лизата. Реакционные смеси быстро перемешивали и определяли активность путем наблюдения оптической плотности при 290 нм в течение определенного периода времени (каждые 12-20 с в течение 5-20 мин) с использованием микропланшетного спектрофотометра для определения оптической плотности SpectraMax® Plus384 или SpectraMax® 190 (Molecular Devices). Результаты приведены в следующих ниже таблицах.

НТР анализ осветленных лизатов, предварительно обработанных кислотой.

В этом анализе варианты PAL подвергали кислым условиям для имитации среды желудка. Сначала в лунки 96-луночного круглодонного планшета (Costar № 3798, Corning) добавляли 20 мкл 1М цитрата натрия (pH 3,7-4,5) и 30 мкл воды или 50 мкл 400 мМ цитрата натрия pH 3,7-4,8 и 50 мкл осветленного лизата. Планшеты герметично закрывали и инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 400 об/мин, амплитуда качания 1" до анализа. Для анализа в лунки полиакрилатного 96-луночного планшета (Costar № 3635, Corning) добавляли 100 мкл 200 мМ Tris, 50 мМ фенилаланина pH 7,5 и 80 мкл 1М Tris pH 7,5 или 200 мМ фосфата натрия/50 мМ фенилаланина pH 7,0 и 80 мкл 1,0М фосфата натрия pH 7,0 и 20 мкл обработанного кислотой лизата. Реакционные смеси быстро перемешивали и определяли активность путем наблюдения оптической плотности при 290 нм в течение определенного периода времени (каждые 12-20 с в течение 5-20 мин) с использованием микропланшетного спектрофотометра для определения оптической плотности SpectraMax® Plus384 или SpectraMax® 190 (Molecular Devices). Результаты приведены в следующих ниже таблицах.

НТР анализ осветленных лизатов, предварительно обработанных пепсином.

В дополнительных анализах варианты PAL подвергали кислым условиям и пепсину для дополнительного тестирования вариантов в условиях, которые имитируют желудочную среду. Сначала в лунки 96-луночного круглодонного планшета (Costar № 3798, Corning) добавляют 50 мкл 0,01-100 мг/мл пепсина в 400 мМ цитрата натрия pH 1,5-4 и 50 мкл осветленного лизата. Планшет герметично закрывают и инкубируют в течение 1-12 ч при 37°C, 400 об/мин, амплитуда качания 1" до анализа. Для анализа в лунки полиакрилатного 96-луночного планшета (Costar № 3635, Corning) добавляют 100 мкл 200 мМ Tris/50 мМ фенилаланина pH 7,5 и 80 мкл 1М Tris pH 7,5 или 200 мМ фосфата натрия/50 мМ фенилаланина pH 7,0 и 20 мкл обработанного кислотой лизата. Реакционные смеси быстро перемешивают и определяют активность путем наблюдения оптической плотности при 290 нм в течение определенного периода времени (каждые 12-20 с в течение 5-20 мин) с использованием микропланшетного спектрофотометра для определения оптической плотности SpectraMax® Plus384 или SpectraMax® 190 (Molecular Devices).

Таблица 2-1

Относительная активность вариантов PAL в случае баз обработки (U-C), обработки протеазой (P-C) и обработки кислотой (A-C)

Вариант №	U-C	P-C	A-C	Различия аминокислот относительно SEQ ID NO: 4
1	+	+	+	A39V/A91V/Y158H/S180A/N290G/A394V/S399N/N474Q/K522Y/T524S
2	+	+	++	A39V/A91V/Y158H/A256G/A394V/P404A/N474Q
3	+	++	++	A39V/A91V/S180A/A394V/K522F/T524S
4	+	+	++	A39V/A91V/Y158H/T243I/A256G/S399N/P404A/L407V/N474Q
5	+	+	++	E308Q
6	+	++	+	N400K
7	+	+	+	L364Q
8	+	+	++	A256G/N290G/P404A/L407V/N474Q/K522F
9	+	+	++	Y158H/S180A/A394V/T463N/N474Q/T524S
Вариант №	U-C	P-C	A-C	Различия аминокислот относительно SEQ ID NO: 4
10	+	+	++	A39V/A91V/Y158H/S180A/K195E/A256G/S399N/L407V/Y459F/T463N/K522N/T524S
11	+	+	++	A39V/A91V/Y158H/S180A/K195E/A256G/N290G/S399N/Y459F/T463N
12	+	++	++	A39V/A91V/Y158H/S180A/K195E/T243I/A394V
13	+	++	++	A39V/A91V/Y158H/K195E/T243I/A256G/A394V/S399N/N474Q/K522Y/T524S
14	+	++	++	A39V/A91V/Y158H/S180A/K195E/I245L/S399N/L407V/Y459F/T463N/N474Q/T524S
15	+	++	+	H307M
16	+	+	++	A39V/A91V/Y158H/S180A/T243L/A394V/S399N/T463N/K522F
17	+	+	++	A91V/N474Q
18	++	+	++	S180A/K195E
19	++	+	++	A91V/Y158H/T243I/A256G/N290G/S399N/L407V/Y459F/T463N/N474Q/K522N/T524S
20	++	++	++	A39V/Y158H/S180A/S399N
21	++	++	++	A91V/N270K
22	++	+++	++	H307G

23	++	++	+	N453G
24	++	++	++	H307Q
25	++	++	+	L257W
26	++	+	+++	A91V/Y158H/I245L/A256G/S399N/Y459F/ T463N/K522Y/T524S
27	++	++	+	F443H
28	++	++	++	A91V/Y158H/S180A
29	++	++	+	A91Y/Y158H/K195E/S399N
30	++	++	+++	A39V/A91V/A256G/N290G/A394V/S399N/ P404A/L407V/K522Y/T524S
31	++	++	+	L257A
32	++	+	+++	Y158H/K195E/T243L/A256G/A394V/S399N/ L407V/N474Q/ K522F/T524S
33	++	++		L349M
34	+++	+++	+	I326F
35	+++	+++	+++	T460G/P528L

1. Относительную активность рассчитывали как активность варианта/активность SEQ ID NO: 4 (кодируемого SEQ ID NO: 3).

2. Вариант № 22 содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7 и полипептидную последовательность SEQ ID NO: 8, и вариант № 30 содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 и полипептидную последовательность SEQ ID NO: 6.

3. + = 0,1-1,0 относительной активности AvPAL дикого типа;
 ++ = > на 1,0-2,0 относительной активности AvPAL дикого типа;
 +++ = > на 2,0 относительной активности AvPAL дикого типа.

Таблица 2-2

Относительная активность вариантов PAL в случае баз обработки (U-C),
 обработки протеазой (P-C) и обработки кислотой (A-C)

Вариант №	U-C	P-C	A-C	Различия аминокислот - относительно AvPAL дикого типа (SEQ ID NO:4)
36	++	+++	++	A39V/A91V/N290G/H307G/L407V/T524S
37	++	+++	++	A39V/A91V/N290G/H307G/L407V
38	+	++	+	A39V/A91V/A256G/N290G/H307G/S399N/ P404A/L407V/K522Y/T524S
39	++	+	++	A39V/A91V/A256G/N290G/S399N/P404A/ L407V/K522Y
40	+	++	+	A39V/A256G/N290G/H307G/P404A/L407V
41	+	++	+	A39V/A91V/A256G/N290G/H307G/P404A/ L407V/T524S

1. Относительную активность рассчитывали как активность варианта/активность варианта № 30.

2. Вариант № 36 содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 9 и полипептидную последовательность SEQ ID NO: 10.

3. + = > на 1,0-3,0 относительной активности варианта 30;
 ++ = > на 3,0-10 относительной активности варианта 30;
 +++ = > на 10-35 относительной активности варианта 30.

Таблица 2-3

Относительная активность вариантов PAL в случае баз обработки (U-C), обработки протеазой (P-C) и обработки кислотой (A-C)

Вариант №	U-C	A-C	P-C	Мутации (относительно варианта №36)
42	+	+	+	T54K/G59R/S73K/R305M/C503Q/Q521K/C565P
43	+	+++	++	T54K/G59R/R305M/C503Q/Q521K/C565N
44	++	+++	++	G59R/C503Q
45	++	+++	++	K32P/G59R/S73K/Q240W/C503Q/C565N
46	+	+	+	K32P/G59R/S73K/Q240W/C565P
47	+	+++	++	K32P/T54K/S73K/R305M/C503Q/Q521K/C565N
48	+++	+++	++	Y304H/D353A
49	++	+++	+++	S73K/D353A
50	+	+	++	A112C/S546R
51	++	+	++	S73K/Q240W/Y304H
52	+	+	++	R134Q/Q240W/Y304H/D353A/E509L

1. Относительную активность рассчитывали как активность варианта/активность варианта № 36.
2. Вариант № 42 содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11 и полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12. Вариант № 43 содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 и полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14.
3. + => на 0,5-1,5 относительной активности варианта 36;
 ++ => на 1,5-3 относительной активности варианта 36;
 +++ => на 3-10 относительной активности варианта 36.

Таблица 2-4

Относительная активность вариантов PAL в случае баз обработки (U-C), обработки протеазой (P-C) и обработки кислотой (A-C)

Вариант №	U-C	P-C	A-C	Мутации (относительно варианта №30)
53	+	+	+	D303R
54	+	+	++	E308A
55	+	+	+	E308D
56	++	++	+	G256A
57	+	++	+	H307A
58	+	+++	+	H307D
59	+	++	+	H307E
60	+	++	+	H307F
61	+	+++	+	H307G
62	+	+	+	H307I
63	+	+	+	H307 л
64	++	+++	++	H307M
65	+	++	+	H307N
66	++	++	++	H307R
67	+	+	+	H307Y
68	+	+++	+	R305 л
69	+	+++	+	R305M
70	+	+++	+	R305Q
71	++	++	+	V91A/G256A
72	+	++	+	Y304H
73	+	+	+	Y304W
74	+	+	+	C503K
75	+	+	+	C503Q
76	+	+	+	C565A
77	+	+	+	C565G

78	+	+	+	C565I
79	+	+	+	C565K
80	+	+	+	C565 л
81	+	++	+	C565N
82	+	+	+	C565P
83	+	+	+	C565T

1. Относительную активность рассчитывали как активность варианта/активность варианта № 30 (варианты 53-73) или SEQ ID NO: 4 (кодируемые SEQ ID NO: 3) (варианты 74-83).

2. + => на 0,5-1,5 относительной активности варианта 30;

++ => на 1,5-3 относительной активности варианта 30;

+++ => на 3-10 относительной активности варианта 30.

Таблица 2-5

Относительная активность вариантов PAL в случае баз обработки (U-C),
обработки протеазой (P-C) и обработки кислотой (A-C)

Вариант №	U-C	P-C	A-C	Мутации относительно варианта 42
42	+	+	+	
1011	+	+	+	R59G/R134Q/Q240R/K521Q/P564L
1012	+	+	++	R59G/P564M
1013	+	+	+	R59G/Q240W/E509L/K521Q/P564M
1014	++	++	+	Q240W/Y304H/D353N/E509L/K521S/P564L
1015	+	++	+	R59G/R134Q/Q240R/K521Q/P565N
1016	+	+++	+	Y304H/D353A/E509L
1017	+	++	+	R59G/R134Q/Y304H/D353N/K521Q
1018	+	+++	+	R59G/R134Q/Q240R/K521S
1019	+	+	+	R134Q/Y304H/D353A/K521S/P565N
1020	+	+	+	R59G/R134Q/Q240R/Y304H/D353A/K521Q/P564M
1021	++	+++	++	Q240W/D353A/E509L/K521Q
1022	+	++	+	R134Q/Q240W/E509L/K521S
1023	++	++	++	R134Q/Q240R/D353A/K521Q/P564G
1024	+	+	+	R134Q/K521Q
1025	+	+++	+	K521Q
1026	+	+++	+	R134Q/D353A/K521S/P564M
1027	+	+++	+	R59G/R134Q/Q240W/D353A
1028	++	++	+	R59G/K521S
1029	+	++	+	R59G/D353A
1030	+	+	+	Q240R/D353A/K521S
1031	+	+	+	R59G/D353A/E509L/P564L
1032	+	+	+	R59G/D353A/K521Q
1033	+	+	+	R59G/R134Q/D353A/E509L/K521Q
1034	+	+	+	Q240R/Y304H/E509L
1035	+	+	+	R59G/Q240R/D353A/E509L
1036	+	+	+	R59G/R134Q/E509L
1037	+	+	+	Q240W/Y304H/E509L/K521S
1038	+	+	+	Q240W/D353A/E509L/K521S/P564L/P565N
1039	+	+	+	R59G/Q240R/D353A/P564M/P565N
1040	+	+	+	R134Q/D353A/K521S
1041	+	+	+	R134Q/Q240W/Y304H/D353A/P564L
1042	+	+	+	Q240R/E509L/P565N

Таблица 2-5

Относительная активность вариантов PAL в случае баз обработки (U-C),
обработки протеазой (P-C) и обработки кислотой (A-C)

Вариант №	U-C	P-C	A-C	Мутации относительно варианта 42
1043	+	+	+	Q240R/K521S/P564M/P565N
1044	+	+	+	R134Q/D353A/P564L
1045	+	+	+	R59G/R134Q
1046	+	+	+	R59G/Q240R
1047	+	+	+	Y304H/E509L
1048	+	+	+	R134Q/Q240R/D353A/E509L/K521Q/P564L
1049	+	+	+	Q240W/E509L/P564L/P565N
1050	+	+	+	R59G/E509L/P564L
1051	+	+	+	R134Q/D353A/E509L/P564L
1052	+	+	+	R59G/D353A/P565N
1053	+	+	+	Q240R/E509L
1054	+	+	+	Q240R
1055	+	+	+	D353A/K521Q
1056	+	+	+	Q240W/D353A/E509L
1057	+	+	+	F18H/L47A/L214Q/E540D
1058	+	+	+	F18H/L47A/L214Q/E308K/F450Y/S546R
1059	+	+	+	F18H/L47A/F450Y/P528L/S546R
1060	+	+	+	L214Q/E308Q/T460G
1061	+	+	+	F18H/F450Y/E540D
1062	+	+	+	P528L/S546R
1063	+	+	+	F18H/L214Q/F450Y
1064	+	+	+	E308Q/F450Y/R467G
1065	+	+	+	F18H/E540D
1066	+	+	+	L47A/L214Q/S546R
1067	+	+	+	F18H/L214Q/E308Q
1068	+	+	+	L47A/L214Q/E308Q
1069	+	+	+	F18H/L47E/L214Q/R467G/E540D/S546R
1070	+	+	+	L47A/F450Y
1071	+	+	+	L47A/L214Q
1072	+	+	+	F18H/L47A/L214Q/S546R
1073	+	+	+	F18H/L214Q
1074	+	+	+	L214Q/F450Y/P528L
1075	+	+	+	F18H/L214Q/E308Q/F450Y/R467G

Таблица 2-5

Относительная активность вариантов PAL в случае баз обработки (U-C),
обработки протеазой (P-C) и обработки кислотой (A-C)

Вариант №	U-C	P-C	A-C	Мутации относительно варианта 42
1076	+	+	+	L47A/L214Q/E540D
1077	+	+	+	L214Q/E540D
1078	+	+	+	F18H/L47A/E308Q/S546R
1079	+	+	+	F18H
1080	+	+	+	F18H/L47A/F450Y/S546R

1081	+	+	+	F18H/L47A/L214Q/F450Y
1082	+	+	+	F18H/L47A
1083	+	+	+	L47A
1084	+	+	+	F18H/L47A/L214Q
1085	+	+	+	L214Q/S546R
1086	+	+	+	F18H/L214Q/R467G/S546R
1087	+	+	+	F18H/L47A/L214Q/E308Q
1088	+	+	+	F18H/L214Q/T460G
1089	+	+	+	F18H/L47A/F450Y
1090	+	+	+	F18H/L214Q/E540D

1. Относительную активность рассчитывали как активность варианта/активность варианта № 42.

2. - < на 0,5 относительной активности варианта № 42;

+ = > на 0,5-1,5 относительной активности варианта № 42;

++ = > на 1,5-3 относительной активности варианта № 42.

Пример 3. Анализы определения агрегации белка вариантов PAL.

Способность вариантов PAL образовывать агрегаты определяют с использованием набора для анализа агрегации белков ProteoStat® (Enzo) по инструкциям производителя. В кратком изложении 0-100 мкМ очищенной PAL смешивают с реагентом для детекции ProteoStat® (1:2000) и анализируют проточной цитометрией. Образцы оценивают на флуоресценцию в сравнении со стандартами агрегации ProteoStat®, как известно в данной области (см., например, Bershtein et al., Mol. Cell, 133-144 [2013]).

Пример 4. Лيوфилизированные лизаты из культур во встряхиваемых колбах (SF).

Отобранные НТР культуры, выращиваемые, как описано выше, высевали на планшеты с LB-агаром с 1% глюкозой и 30 мкг/мл хлорамфениколом и выращивали в течение ночи при 37°C. Одну колонию из каждой культуры переносили в 50 мл LB с 1% глюкозой и 30 мкг/мл хлорамфеникола. Культуры выращивали в течение 18 ч при 30°C, 250 об/мин и субкультивировали при разведении приблизительно 1:10 в 250 мл бульона Terrific с 30 мкг/мл хлорамфеникола до конечной OD600 0,2. Культуры инкубировали в течение 135 мин при 30°C, 250 об/мин до OD600 0,6 и индуцировали 1 mM IPTG. Индуцируемые культуры инкубировали в течение 20 ч при 30°C, 250 об/мин. После этого периода инкубации культуры центрифугировали 4000 об/мин × 10 мин. Удаляли супернатант и ресуспендировали осадки в 30 мл 50 mM фосфата натрия pH 7,5. Клетки осаждали (4000 об/мин × 10 мин), ресуспендировали в 12 мл 50 mM фосфата натрия pH 7,5 и лизировали с использованием системы One Shot Cell Disruption (Constant Systems) при 17000 фунтов/кв.дюйм. Лизаты осаждали (10000 об/мин × 30 мин) и супернатант замораживали и лиофилизировали с получением содержащего фермент порошка.

Выделение PAL из культур во встряхиваемой колбе.

Вариант PAL № 42 выращивали в культурах во встряхиваемой колбе до насыщения, как описано выше. Насыщенные культуры осаждали центрифугированием (4000 об/мин × 20 мин) и хранили клеточные осадки при -80°C до очистки. Клеточные осадки размораживали при комнатной температуре и ресуспендировали в 25 mM Tris, pH 8 с 130 mM NaCl при 5 мл буфера/г клеток. Образец взвесы лизировали с использованием микрофлюидизатора при заданной уровне давлении 110 фунтов/кв.дюйм. Получаемый лизат осветляли центрифугированием при 10000 об/мин в течение 1 ч с последующим фильтрованием через 0,2 мкм фильтр PES (Millipore).

После фильтрования получаемый лизат нагревали при 70-85°C в течение 1,5-2 ч в присутствии или отсутствие 10 mM Phe. Лизат удаляли из условий нагрева и осветляли центрифугированием при 10000 об/мин при 4°C в течение 1 ч. Затем перед внесением в хроматографическую колонку супернатант, содержащий растворимую PAL, фильтровали через 0,2 мкм фильтр PES.

Термически обработанный фильтрованный лизат, содержащий 80-100 мг общего белка, разбавляли в два раза с использованием 25 mM Tris, pH 8 с 1,2M сульфата аммония. Образец загружали в колонку HiPrep 16/10 Phenyl FF (hi sub) (GE Healthcare), предварительно уравниваемую 25 mM Tris, pH 8 с 0,6M сульфатом аммония. После загрузки образца колонку промывали тремя объемами колонки того же буфера с последующим одним объемом колонки с линейным градиентом 0,6-0M сульфата аммония в 25 mM Tris, pH 8. Прочно связанный PAL элюировали из колонки с использованием изократического элюирования 25 mM Tris, pH 8 тремя объемами колонки. Объединяли фракции, содержащие активную и чистую PAL.

Выделяемую PAL из фенильной колонки подвергали замене буфера на 0,5M Tris, pH 8,5 и концентрировали. Концентрированную PAL анализировали посредством SDS-PAGE и выявляли, что она содержится в полосе ~60 кДа. Очищенные образцы PAL фильтровали с использованием 0,45 мкм фильтра PES и хранили при -80°C до момента использования.

Пример 5. Характеризация очищенной PAL и вариантов PAL.

В этом примере описаны анализы, проводимые для характеристики PAL дикого типа и вариантов PAL.

Устойчивость к кислому pH.

Лиофилизированные порошки, содержащие варианты PAL, растворяли при 2 г/л в 20 мМ фосфате натрия pH 7,0. Затем 50 мкл растворов фермента смешивали с 50 мкл 400 мМ лимонной кислоты (pH 4,0-5,2) или 100 мМ фосфата натрия и инкубировали реакционные смеси при 37°C в течение 1 ч при 400 об/мин (амплитуда качания 1"). Затем 20 мкл раствора быстро перемешивали с 80 мкл 1М фосфата натрия pH 7,0 и 100 мкл 200 мМ Tris/50 мМ фенилаланина pH 7,5. Ферментативную активность в кислых условиях определяли путем наблюдения оптической плотности при 290 нм в течение определенного периода времени (каждые 12-20 с в течение 5-20 мин) с использованием микропланшетного спектрофотометра для определения оптической плотности SpectraMax® Plus384 или SpectraMax® 190 (Molecular Devices). Результаты представлены на фиг. 2. Как указано на фиг. 2, варианты № 30 и 36 сохраняли больше активности после того, как их инкубировали при pH приблизительно от 4 до 4,8 по сравнению с PAL дикого типа.

Определение K_M .

Для оценки, изменяли ли мутации в вариантах PAL аффинность вариантов PAL к фенилаланину, определяли константу Михаэлиса для фермента дикого типа и варианта 36. Сначала в лунки полиакрилатного 96-луночного планшета (Costar № 3625, Corning) добавляли 100 мкл 15 мкг/мл PAL в 100 мМ Tris pH 8,0 и 100 мкл 0-32 мМ фенилаланина в 100 мМ Tris, pH 8,0. Реакционную смесь быстро перемешивали и определяли начальные скорости путем наблюдения оптической плотности при 290 нм в течение определенного периода времени (каждые 12-20 с в течение 5-20 мин) с использованием микропланшетного спектрофотометра для определения оптической плотности SpectraMax® Plus384 или SpectraMax® 190 (Molecular Devices). K_M для каждого тестируемого варианта PAL определяли аппроксимацией данных к графику Лайнуивер-Берка, как известно в данной области. Результаты представлены на фиг. 3. Как продемонстрировано, K_M составляла 74 мкМ для фермента дикого типа и 60 мкМ для варианта 36.

Специфичность к аминокислотам.

Некоторые фенилаланин-аммиак-лиазы обладают активностью против тирозина и/или гистидина в дополнение к фенилаланину. Для оценки, изменяли ли мутации, присутствующие в вариантах PAL, специфичность вариантов PAL к фенилаланину, оценивали активности фермента дикого типа и варианта 36 в отношении этих трех аминокислот. Сначала в лунки полиакрилатного 96-луночного планшета (Costar № 3635, Corning) добавляли 100 мкл 5 г/л содержащего PAL лиофилизированного порошка в 10 мМ фосфате натрия pH 7,0 и 100 мкл 50 мМ фенилаланина или гистидина, или 2,5 мМ тирозина в 200 мМ фосфате натрия pH 7,5. Растворы быстро перемешивали и определяли начальные скорости путем наблюдения оптической плотности при 290 нм в течение определенного периода времени (каждые 12-20 с в течение 5-20 мин) с использованием микропланшетного спектрофотометра для определения оптической плотности SpectraMax® Plus384 или SpectraMax® 190 (Molecular Devices). Результаты представлены на фиг. 4. Как указано, не наблюдали детектируемой активности для фермента WT или варианта № 36 с гистидином или тирозином, что указывает на то, что эти ферменты являются специфичными к фенилаланину.

Устойчивость к протеазам свиньи и крупного рогатого скота.

Образцы вариантов PAL, получаемых, как описано в примере 4, растворяли при 2 г/л в 100 мМ фосфата натрия pH 7,0. Свиной трипсин и химо трипсин крупного рогатого скота (100 мг каждый) растворяли в 2 мл 100 мМ фосфата натрия pH 7,0 и проводили 2-кратные серийные разведения одиннадцать раз в 100 мМ фосфате натрия. Затем 80 мкл растворов вариантов фермента PAL смешивали с 20 мкл раствора трипсина и химо трипсина. Реакционные смеси инкубировали при 37°C в течение 1 ч при 400 об/мин (амплитуда качания 1"). Затем 20 мкл реакционной смеси смешивали с 80 мкл воды и 100 мкл 100 мМ фосфата натрия, 50 мМ фенилаланина pH 7,0. Каждый раствор быстро перемешивали и определяли активность путем наблюдения оптической плотности при 290 нм в течение определенного периода времени (каждые 12-20 с в течение 5-20 мин) с использованием микропланшетного спектрофотометра для определения оптической плотности SpectraMax® Plus384 или SpectraMax® 190 (Molecular Devices). Результаты представлены на фиг. 2. Как указано на этой фигуре, все тестируемые варианты обладали улучшенной устойчивостью к протеазе по сравнению с PAL дикого типа, где вариант № 36 является наиболее устойчивым к протеолизу.

Устойчивость к протеазам человека.

Как описано выше, некоторые выделенные варианты PAL подвергали скринингу против свиного трипсина и химо трипсина крупного рогатого скота для оценки их устойчивости к протеолизу ферментами, содержащимися в желудочно-кишечном тракте. Некоторые из выделенных вариантов PAL также тестировали с использованием ферментов человека для подтверждения, что они являются устойчивыми к гомологам человека ферментов свиньи или крупного рогатого скота. В этих анализах лиофилизированные порошки PAL WT и варианта № 36 (2,4 г/л в 100 мМ фосфате натрия, pH 7,0) инкубировали с химо трипсином человека (Athens Research) 0-80 BTEE ед./мл или трипсином человека (ProSpec) (0-10000

BAEE ед./мл) при 37°C в течение 2 ч. Затем в лунки полиакрилатного 96-луночного планшета (Costar № 3635, Corning) добавляли 100 мкл смеси с последующим добавлением 100 мкл 50 мМ фенилаланина, 200 мМ фосфата натрия pH 7,0. Раствор быстро перемешивали и определяли начальные скорости путем наблюдения оптической плотности при 290 нм в течение определенного периода времени (каждые 12-20 с в течение 5-20 мин) с использованием микропланшетного спектрофотометра для определения оптической плотности SpectraMax® Plus384 или SpectraMax® 190 (Molecular Devices). Результаты представлены на фиг. 5. Как продемонстрировано на фиг. 5, вариант № 36 являлся более стабильным, чем фермент PAL дикого типа.

Устойчивость к неочищенному экстракту поджелудочной железы.

Выделенные варианты PAL также тестировали для определения их устойчивости к ферментам поджелудочной железы. Лиофилизированные порошки PAL WT, лиофилизированные порошки варианта № 36, варианта № 42 и варианта № 43 (получаемые, как описано в примере 4; 12 г/л в 50 мМ фосфате калия pH 6,8) смешивали 1:1 с панкреатином свиньи (4× Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) и инкубировали при 37°C при встряхивании (400 об/мин, амплитуда качания 1") до 23 ч. В указанные моменты времени в лунки полиакрилатного 96-луночного планшета (Costar № 3635, Corning) добавляли 10 мкл аликвоту реакционных смесей к 190 мкл 50 мМ фенилаланина, 190 мМ фосфата натрия pH 7,0. Реакционную смесь быстро перемешивали и определяли начальные скорости путем наблюдения оптической плотности при 290 нм в течение определенного периода времени (каждые 12-20 с в течение 5-20 мин) с использованием микропланшетного спектрофотометра для определения оптической плотности SpectraMax® Plus384 или SpectraMax® 190 (Molecular Devices). Результаты представлены на фиг. 6. Как продемонстрировано на фиг. 6, для всех из варианта № 36, варианта № 42 и варианта № 43 демонстрировали существенную стабильность в этих условиях анализа по сравнению с ферментом PAL дикого типа.

Влияние детергентов кишечника.

Выделенные варианты PAL также тестировали на их чувствительность к протеолизу в присутствии или отсутствие желчных кислот и жирных кислот кишечника для оценки, влияют ли эти кислоты на их стабильность. Лиофилизированные порошки, содержащие вариант № 36 (получаемый, как описано в примере 4) растворяли при 50 мкг/мл в 0-16 мМ таурохолате натрия, 100 мМ фосфате натрия, pH 7,0. Свиной трипсин и химотрипсин крупного рогатого скота (80 мг каждого) растворяли в 2 мл 100 мМ фосфата натрия pH 7,0 и проводили 2-кратные серийные разведения одиннадцать раз в 100 мМ фосфате натрия. Для анализа 50 мкл растворов PAL смешивали с 50 мкл раствора протеазы. Смеси инкубировали при 37°C в течение 1 ч при 400 об/мин (амплитуда качания 1"). Затем 50 мкл смесей смешивали со 150 мкл 200 мМ фосфата натрия, 50 мМ фенилаланина pH 7,0. Каждую реакционную смесь быстро перемешивали и определяли активность путем наблюдения оптической плотности при 290 нм в течение определенного периода времени (каждые 12-20 с в течение 5-20 мин) с использованием микропланшетного спектрофотометра для определения оптической плотности SpectraMax® Plus384 или SpectraMax® 190 (Molecular Devices). Результаты представлены на фиг. 7. Как представлено на этой фигуре, дополнительный таурохолат натрия повышает чувствительность варианта № 36 к протеолизу.

Пример 6. Стабильность в кишечнике варианта PAL.

Для оценки стабильности и активности вариантов PAL, как они проходят через кишку животного, мышей подвергали принудительному кормлению очищенными вариантами фермента. Здоровых мышей C57B1/6 в возрасте 10-12 недель и массой 20-26 г содержали в метаболической клетке и содержали без корма в течение 15 ч. Воду предоставляли *ad libitum*. После отсутствия корма в течение ночи животных подвергали принудительному кормлению с использованием иглы для принудительного кормления 21 калибра смесью 0,3 мл 0,5М Tris-HCl pH 8,5 и 8 мг/мл в 0,5М Tris-HCl pH 8,5, PAL WT (получаемой, как описано в примере 4) или 8 мг/мл в 0,5М Tris-HCl pH 8,5 варианта № 42 (получаемого, как описано в примере 4). Через 0,5, 2 или 6 ч после принудительного кормления животных декапитировали, собирали плазму с использованием пробирок для сбора крови с зеленой крышкой (Ram Scientific) и собирали содержимое желудка, двенадцатиперстной кишки (~1-8 см от желудка), тощей кишки (~10-18 см от желудка), подвздошной кишки (~8 см выше слепой кишки) и толстой кишки (~5 см ниже слепой кишки). Регистрировали массу этого содержимого и хранили содержимое при -80°C до анализа.

Содержимое желудка или кишечника разбавляли 4×100 мМ фосфатом натрия pH 7,0, быстро перемешивали и центрифугировали при 14000 об/мин ×2 мин. Супернатанты переносили в 350 мкл, 0,45 мМ 96-луночный планшет для фильтрования AcroPrep™ Advanced (Pall Corp) и удаляли твердые частицы вакуумным фильтрованием. Осветленные фильтраты оценивали на ферментативную активность, как описано в предшествующих примерах и на наличие интактного белка PAL посредством SDS-PAGE. Результаты свидетельствуют о том, что ферментативная активность в двенадцатиперстной кишке и тощей кишке, по-видимому, являлась более высокой для выделенных вариантов PAL по сравнению с ферментом PAL дикого типа и отрицательным контролем.

Пример 7. Уровни фенилаланина в плазме.

Оценивали образцы плазмы, собираемые у мышей, описанные в примере 6, для определения количества фенилаланина, содержащегося в кровотоке тестируемых мышей. Плазму мышей (50 мкл) объеди-

няли с 250 мкл ацетонитрила, содержащего 0,6 mM dl-фенилаланина (кольцо D₅) (т.е. изотопно-меченный вариант фенилаланина, содержащий дейтерий вместо водорода, связанного с атомами углерода ароматического кольца; Cambridge Isotope Laboratories). Образцы перемешивали при комнатной температуре в течение 5 мин, центрифугировали при 3200×g в течение 10 мин при 4°C и переносили супернатанты в планшеты для анализа образцов. Для анализа 10 мкл каждого образца впрыскивали в систему 3200 QTRAP® LC/MS/MS (AB Sciex) через колонку DISCOVERY® C18 (150×2,1 mM, гранулы 5 мкм) (Supelco, в настоящее время Sigma-Aldrich), элюируя 0,1% муравьиной кислотой в воде (A) и ацетонитриле (B). Образцы элюировали в градиенте 5 мин (t=0, 97% A; 3 мин, 50% A; 3,5 мин, 5% A; 4 мин, 97% A; 5 мин, 95% A), наблюдая за переходом от 166 до 120 для эндогенного фенилаланина и от 171 до 125 для изотопно-меченного стандарта. Результаты свидетельствовали о том, что уровни фенилаланина в плазме являлись ниже в момент времени 30 мин в образцах от мышей, которым давали выделенный вариант PAL (т.е. вариант № 42) по сравнению с ферментом PAL дикого типа и отрицательного контроля.

Пример 8. Терапевтическая функция варианта PAL.

Для оценки, снижают ли варианты PAL уровни Phe в сыворотке *in vivo*, использовали модель PKU на мышах. В этих экспериментах пораженных животных подвергали принудительному кормлению белками PAL. Сначала устанавливали соответствующий исходный уровень Phe у мышей путем удаления Phe из их рациона в течение трех суток с последующей инъекцией известного количества содержащего Phe раствора. Гомозиготных мышей PAH epi-2 с фенотипом C57B1/6 в возрасте от трех до шести месяцев (см. McDonald et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1965-1967 [1990]) переводили на не содержащий фенилаланин рацион (TD. 97152, Harlan) с 0,03 г/л Phe, предоставляемого в их питьевой воде в течение 72 ч. Для начала обработки в момент времени = 0 ч мышам инъецировали 0,15 мг/г массы тела Phe (из 10 г/л раствора Phe в воде). Через 55 мин после инъекции собирали приблизительно 20 мкл крови посредством венепункции хвоста и наносили мазки на фильтровальную бумагу. Затем в моменты времени через 1, 3 и 5 ч после инъекции мышей подвергали принудительному кормлению 0,3 мл 50-100 г/л AvPAL WT, AvPAL WT плюс апротинин, BSA или варианта № 42. Через 6, 7 и 9 ч после инъекции наносили дополнительные мазки крови на фильтровальную бумагу. Мазки крови сушили и хранили при -20°C до анализа LC-MS/MS на уровни Phe и Tyг известными в данной области способами (см., Chase et al., Clin. Chem., 39:66-71 [1993]).

Результаты представлены на фиг. 8. Как указано на этой фигуре, принудительное кормление неактивным белком (BSA) приводило к повышению уровней Phe в сыворотке. В противоположность этому обработка протеолитически чувствительным AvPAL WT приводили к постоянным уровням Phe, при этом тот же белок, объединенный с ингибитором протеазы апротинин, приводил к значительному снижению уровней Phe. Результаты также демонстрируют, что введение сконструированного варианта PAL № 42 приводило к сниженным уровням Phe в сыворотке при отсутствии ингибиторов протеаз.

Пример 9. Деиммунизация PAL.

В этом примере описаны эксперименты, проводимые для идентификации разнообразия, которое приводит к удалению Т-клеточных эпитопов из PAL.

Идентификация разнообразия деиммунизации.

Для идентификации аминокислот, которые в случае мутации могут привести к удалению Т-клеточных эпитопов, использовали компьютерные способы для идентификации последовательностей PAL, для которых теоретически рассчитано, что они вызывают Т-клеточный ответ. Параллельно также проводили экспериментальные исследования допустимых, не вредных мутаций, в частности для аминокислот, которые поддерживают активность белка в анализе без подвергания каким-либо воздействиям (например, в анализах, описанных в примере 2). Затем анализировали активные варианты на эффект мутаций на теоретически рассчитанную иммуногенность.

Компьютерная идентификация вероятных Т-клеточных эпитопов в варианте AvPAL.

Вероятные Т-клеточные эпитопы в варианте AvPAL № 36 идентифицировали с использованием средств базы данных иммунологических эпитопов (IEDB; веб-сайт Immune Epitope Database and Analysis Resource), как известно в данной области, и запатентованных средств статистического анализа (см., например, iedb.org и Vita et al., Nucl. Acids Res., 38 (Database issue) D854-62 [2010]. Epub 2009 Nov 11). Вариант AvPAL детально анализировали во всех возможных 15-мерных рамках анализа, где каждая рамка перекрывает последнюю на 14 аминокислот. 15-мерные рамки анализа оценивали на иммуногенный потенциал посредством оценки 9-мерных областей ядра для теоретически рассчитанного связывания с семью общими аллелями HLA-DR II класса (DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*0701, DRB1*0801, DRB1*1101, DRB1*1301 и DRB1*1501), которые в совокупности приходятся почти на 95% популяции людей (см., например, Southwood et al., J. Immunol., 160:3363-3373 [1998]), способами, рекомендованными на веб-сайте IEDB. Идентифицировали потенциальные кластеры Т-клеточных эпитопов, содержащиеся в варианте AvPAL (т.е. подобласти, содержащиеся в варианте AvPAL, который обладает чрезмерно высоким потенциалом иммуногенности) с использованием средств статистического анализа, как известно в данной области. Проводили скрининг идентифицированных кластеров Т-клеточных эпитопов с использованием базы данных IEDB известных эпитопов и базы данных по структуре белка Gen-

Bank. Этими скринингами идентифицировали 10 вероятных Т-клеточных эпитопов в варианте AvPAL № 36. Эти эпитопы ниже обозначают как TCE-I, II, III, VI, V, VI, VII, VIII, IX и X.

Конструирование деиммунизированных библиотек.

Сначала разрабатывали комбинаторную библиотеку, содержащую все нейтральные и полезные мутации, идентифицированные во время циклов направленной эволюции, используемой для создания вариантов AvPAL, в 10 возможных областях Т-клеточных эпитопов, идентифицированных, как описано выше. Анализировали эффекты этих мутаций на теоретически рассчитанное связывание с восемью общими аллелями HLA-DR II класса. Было теоретически рассчитано, что многие мутации удаляют или снижают TCE-I, II, VI, VII. Эти мутации объединяли в комбинаторной библиотеке. Затем конструировали библиотеки с использованием насыщающего мутагенеза для мутации каждой отдельной аминокислоты в оставшихся шести Т-клеточных эпитопах (т.е. TCE-III, IV, V, VIII, IX и X). В заключение получали комбинаторную библиотеку, содержащую благоприятное разнообразие, идентифицированное на основании многих циклов эволюции, которая направленно воздействует на TCE-I, III, IV, VIII и X наряду с C503 и C565, двумя аминокислотами, описанными как влияющие на состояние агрегации вариантов PAL. Лучшие совпадения из такой библиотеки подвергали дополнительному насыщающему мутагенезу, направленному на TCE-III и VIII, и дополнительному направленному мутагенезу в нескольких положениях.

Конструкция и скрининг деиммунизированных библиотек.

Конструировали комбинаторные библиотеки и библиотеки насыщающего мутагенеза, конструируемые, как описано выше, известными в данной области способами и тестировали на активность в анализе без подвергания каким-либо воздействиям, как описано в примере 2. Идентифицировали и секвенировали активные варианты. Их виды активности и мутации в отношении варианта AvPAL № 36 и многих вариантов AvPAL приведены в таблю с 9-1 по 9-7 ниже.

Идентификация разнообразия деиммунизации.

Активные варианты анализировали на их уровне иммуногенности путем оценки их связывания с восемью общими аллелями HLA-DR II класса, описанными выше. Общая оценка иммуногенности и количество иммуногенных совпадений приведены в табл. с 9-1 по 9-7. Общая оценка иммуногенности отражает суммарную теоретически рассчитанную иммуногенность варианта (т.е. более высокая оценка указывает на более высокий уровень теоретически рассчитанной иммуногенности). "Количество иммуногенных совпадений" указывает на число 15-серных рамок анализа с чрезмерно высоким потенциалом иммуногенности (т.е. большее количество совпадений указывает на более высокий потенциал иммуногенности). Считали, что мутации с более низкой общей теоретически рассчитанной оценкой иммуногенности и/или количеством иммуногенных совпадений менее чем в эталонном варианте являлись "деиммунизирующими мутациями".

Деиммунизирующие мутации, которые идентифицировали как самые лучшие, рекомбинировали с получением ряда вариантов, которые являлись активными, и для которых было теоретически рассчитано, что они являются в значительной степени менее иммуногенными, чем начальный эталонный вариант AvPAL. В следующих ниже таблицах приведены результаты FIOP из анализа без подвергания каким-либо воздействиям; для общей оценки иммуногенности (TIS) и количества иммуногенных совпадений (IHC) результаты указаны для полного белка PAL (табл. 9-1, 9-8 и 9-9) или для указанного эпитопа (табл. с 9-2 по 9-7).

Таблица 9-1

FIOP, общая иммуногенность (TIS) и количество иммуногенных совпадений (IHC) для вариантов, направленных на TCE-I, II, VI и VII ("-" = FIOP<0,7; "+" = FIOP 0,7<FIOP<1,4; "++" = FIOP>1,4)

Вариант №	Активные мутации (по сравнению с вариантом №36)	FIOP	TIS	IHC
Вариант 36		+	680	52
100	I27E/L214E	+	634	51
101	V105C/R134Q/Q205T/P266H/L278D	+	645	48
102	I27E/L214E/C503Q/A547D	+	629	51
103	V105C/Q205T/P210C/L214E/C503Q/A547D	+	619	49
104	I27E/A112C/R134Q/Q205T/I285E/C503Q	+	622	45
105	V39A/P266H	+	665	45
106	I27E/V39A/V105C/R134Q/P210C	+	607	41
107	I27E/V39A/V105C/P210C/L214E/P266H/L278D	+	590	42
108	V39A/V105C/L214E/P266H/A547D/C565N	+	613	42
109	I27E/V39A/A112C/L214E	+	616	42

034034

Вариант №	Активные мутации (по сравнению с вариантом №36)	FIOP	TIS	IHC
110	I27E/V39A/R134Q/A153G/L214E/P266H/I285E/C503Q/A551D/C565N	+	572	37
111	I27E/R134Q/L278D/I285E/A551D/C565N	+	626	48
112	I27E/V39A/V105C/A112C/Q205T/P266H/I285E/C503Q/A551D	+	594	39
113	I27E/V105C/L214E/P266H/C503Q	+	614	49
114	I27E/V39A/R134Q	+	637	44
115	C503Q/A547D	+	675	52
116	V105C/C503Q	+	660	50
117	I27E/R134Q/Q205T/P266H/L278D/A547D	+	641	50
118	I27E/V105C/R134Q/P210C/P266H/L278D/I285E/C503Q/A551D/C565N	+	596	45
119	I27E/V39A/V105C/R134Q/Q205T/L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N	+	585	38
120	V105C/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D	+	619	48
121	I27E/V39A/V105C/L214E/L278D/L309P/C503Q/A547D/A551D	+	587	42
122	V105C/L278D/C503Q/A551D	+	655	50
123	I27E/V105C/R134Q/P210C/L214E/P266H/L278D/A551D/C565N	++	591	48
124	I27E/R134Q/L214E/C503Q/A547D	++	620	50
125	R134Q/P210C/L214E/L278D/C503Q/A547D/C565N	+	630	50
126	I27E/V39A/V105C/Q205T/P210C/L214E/L278D/A547D	+	585	42
127	V39A/Q205T/L278D/A547D/A551D	+	654	44
128	V105C/R134Q/L214E/P266H/I285E/C503Q/A551D/C565N	+	598	45
129	I27E/V105C/L214E/A547D/A551D/C565N	+	609	49
130	I27E/V39A/V105C/Q205T/L278D/C503Q/A547D	+	615	42
131	I27E/V39A/V105C/R134Q/L214E/I285E/C503Q/A547D/A551D	+	564	38
132	C503Q/A547D/A551D/C565N	+	675	52
133	V105C/R134Q/L214E/C503Q/A547D	+	619	48
134	I27E/V105C/Q205T/C503Q/A547D/A551D/C565N	+	630	49
135	I27E/V39A	+	646	45
136	I27E/V39A/V105C/L214E/P266H/C503Q/A547D/C565N	+	594	42
137	A112C/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D/C565N	+	636	48
138	I27E/A112C/R134Q/A153R/L214E/P266H/C503Q	+	619	47
139	C503Q/A551D	+	675	52
140	I27E/V39A/V105C/R134Q/L278D/C503Q/C565N	+	617	42
141	R134Q/Q205T/L214E/I285E/C503Q/A551D/C565N	+	613	47
142	V105C/L214E/I285E/A547D/C565N	+	607	46
143	I27E/V39A/R43L/L214E/A547D	+	625	45
144	I27E/V39A/P210C/L214E/I285E/C503Q/A551D	+	584	41
145	I27E/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D	+	620	50
146	V39A/V105C/A153R/P266H/A547D/A551D	+	637	42
147	V39A/C503Q	+	665	45

Вариант №	Активные мутации (по сравнению с вариантом №36)	FIOP	TIS	IHC
148	I27E/V39A/V105C/P210C/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N	+	590	39
149	R134Q/L214E/L278D/C503Q/A551D	+	639	50
150	I27E/V39A/R134Q/C503Q/A547D	+	632	44
151	A153R	+	677	51
152	I27E/V39A/V105C/A112C/R134Q/L214E/L278D/C503Q/A547D/C565N	+	585	41
153	C503Q/A547D/C565N	+	675	52
154	I27E/V39A/L214E/P266H/L278D/C503Q/A547D/A551D/C565N	+	614	44
155	L278D/A547D	+	675	52
156	V39A/G45S/L278D/C503Q/A551D	+	667	45
157	V39A/A153R/C503Q/A547D	+	657	44
158	R134Q/P210C/L214E/C503Q/A547D/A551D	+	630	50
159	I27E/A547D/C565N	+	656	52
160	V39A/R134Q/P210C/L214E/A547D/C565N	+	615	43
161	I27E/V39A/P210C/P266H/I285E/C503Q/A547D	+	610	41
162	I27E/V39A/R134Q/L278D/C503Q/A547D	+	632	44
163	I27E/V105C/R134Q/Q205T/P210C/C503Q	+	622	48
164	I27E/V105C/R134Q/L214E/L278D/C503Q/A547D	+	600	48
165	I27E/V105C/C503Q/A547D/C565N	+	636	50
166	I27E/L214E/C503Q	+	634	51
167	V105C/L214E/L278D/C503Q/A547D/A551D	+	628	49
168	I27E/V105C/Q205T/L214E/P266H	+	609	49
169	V39A/A112C/R134Q/L214E/C503Q/A547D/A551D	+	621	41
170	I27E/R134Q/L214E/C503Q/C565N	+	625	50
171	I27E/V39A/R134Q/A153R/Q205T/L214E/P266H/C503Q	+	602	42
172	I27E/V39A/L214E/C503Q/A551D	+	614	44
173	V39A/V105C/Q205T/A551D	+	634	42
174	I27E/V39A/Q205T/C503Q/A547D/C565N	+	635	44
175	A547D	+	675	52
176	I27E/V39A/V105C/R134Q/P210C/L214E/C503Q/A551D/C565N	+	576	41
177	V39A/P275R/L278D/C503Q/A551D	+	667	45
178	I27E/V39A/V105C/Q205T/P210C/L278D/A547D	+	611	42
179	V105C/A153R/Q205T/L214E/P266H/C503Q/A547D	+	620	48
180	V105C/A112C/R134Q/Q205T/L214E/Y492H/C503Q/A547D	+	614	48
181	I27E/P210C/L278D/C503Q	+	651	51
182	I27E/P210C/C503Q	+	651	51
183	I27E/V39A/R134Q/A153R/L214E/C503Q/A547D	+	602	42
184	I27E/P266H/A547D/A551D	+	656	52
185	V105C/L214E/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N	+	607	46
186	I27E/V105C/P266H/I285E/C503Q/A547D/C565N	+	615	47
187	Q205T/L278D/I285E/A547D/A551D	+	648	48

Вариант №	Активные мутации (по сравнению с вариантом №36)	FIOP	TIS	IHC
188	V39A/V105C/Q205T/C503Q	+	639	42
189	I27E/V39A/Q205T/P266H/I285E/A547D/A551D/C565N	+	614	41
190	V105C/L214E/I285E	+	612	46
191	V105C/R134Q/C503Q/A547D/C565N	+	646	49
192	I27E/V39A/V105C/R134Q/C503Q/A551D	+	612	42
193	I27E/R134Q/Q205T/I285E/C503Q/A551D	+	620	47
194	I27E/V39A/A112C/Q205T/L278D/I285E	+	616	39
195	I27E/V39A/A112C/Q205T/L214E/P266H/C503Q/A551D/C565N	+	606	42
196	I27E/V39A/L278D/A547D	+	641	45
197	I27E/V39A/V105C/R134Q/Q205T/L214E/A551D/C565N	+	580	41
198	I27E/G45D/Q205T/P266H/C565N	+	656	51
199	I27E/V39A/A112C/L214E/L278D/C503Q/A547D/A551D	+	611	42
200	I27E/Q205T	+	655	51
201	I27E/A112C/R134Q/Q205T/L278D/C503Q	+	643	48
202	C565N	+	680	52
203	I27E/V39A/V105C/R134Q/Q205T/P210C/L278D/C503Q/A547D	+	602	41
204	V105C/L214E/P266H/L278D/A547D	+	628	49
205	V105C/R134Q/A153R/Q205T/L214E/C503Q	+	616	47
206	V105C/R134Q/C503Q	+	651	49
207	I27E/V39A/Q205T/L278D/C503Q/C565N	+	640	44
208	I27E/V39A/V105C/S131N/R134Q/Q205T/L214E/C503Q/A547D/C565N	+	579	41
209	Q205T/L214E/I285E/C503Q/A551D	+	622	48
210	I27E/L214E/L278D/C503Q	+	634	51
211	V105C/R134Q/L214E/L278D/C565N	+	624	48
212	I27E/V39A/L214E	+	619	44
213	L214E/C503Q/A547D	+	648	51
214	L214E/P266H	+	653	51
215	I27E/V39A/C503Q	+	646	45
216	P210C/L214E	+	644	51
217	V105C	+	660	50
218	A112C/R134Q/A153R/L214E/L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N	+	612	44
219	I27E/Q205T/L278D/A551D	+	650	51
220	I27E/L214E/A551D	+	629	51
221	R134Q/L214E/I285E/C503Q	++	623	47
222	I27E/V39A/V105C/C503Q/A551D	+	621	43
223	A112C/L278D/C503Q/A547D	+	672	50
224	I27E/R134Q/A153R/I285E/C503Q/A547D	++	623	47
225	I27E/V39A/V105C/A153R/I285E	+	602	39
226	I27E/V39A/R134Q/L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D	++	611	41
Вариант №	Активные мутации (по сравнению с вариантом №36)	FIOP	TIS	IHC
227	R134Q/C503Q	+	671	51
228	V39A/C503Q/A551D/C565N	+	660	45
229	I27E/V39A/P266H	+	646	45
230	V105C/I285E	+	639	47
231	I27E/V39A/V105C/A153R/L214E	+	596	41
232	A112C/L214E/L278D	+	650	49
233	I27E/R134Q/P210C	+	642	50
234	I27E/A153R/L214E/L278D/A551D	+	626	50

235	V105C/I285E/A547D	+	634	47
236	I27E/Q205T/L214E/L278D/I285E/ C503Q/C565N	+	608	48
237	I27E/V39A/P210C/T212S	+	636	44
238	I27E/P266H/L278D/C503Q	+	661	52
239	I27E/V105C/Q205T/L214E/P266H/A551D/ C565N	+	604	49
240	I27E/A112C/P210C/L214E/C503Q/A547D	+	617	49
241	I27E/V39A/R134Q/P210C/C503Q/A551D	+	622	43
242	I27E/V39A/V105C/I285E/A547D	+	600	40
243	I27E/V39A/Q205T/L278D/C503Q/A551D/ C565N	+	635	44
244	I27E/R134Q/I285E/C503Q	+	631	48
245	I27E/V39A/P210C/L214E/L278D/C503Q/ A551D	+	605	44
246	V39A/A112C/R134Q/Q205T/L214E/L278D	+	621	41
247	I27E/V39A/L214E/L278D/C503Q	+	619	44
248	I27E/V105C/L214E	+	614	49
249	I27E/V39A/V105C/R134Q/P266H/C503Q/ A547D/A551D	+	612	42
250	I27E/V39A/P210C/P266H/C503Q/A551D	+	631	44
251	I27E/V39A/V105C/A153R/C503Q/A547D/ C565N	+	618	42
252	V39A/V105C/R134Q/L214E/C503Q/A547D/ A551D	+	604	41
253	I27E/L214E/L278D	+	634	51
254	I27E/V39A/V105C/R134Q/A153R/P210C/ L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D	+	578	37
255	V105C/R134Q/Q205T/L214E/A547D	+	614	48
256	I27E/V105C/R134Q/A153R/C503Q	+	629	48
257	V105C/R134Q/C503Q/A547D	+	646	49
258	I27E/V39A/L278D/I285E/C503Q/A547D	+	620	42
259	I27E/V39A/R134Q/A153R/L278D	+	634	43
260	I27E/V39A/A112C/R134Q/L214E/C503Q/ A547D	+	602	41
261	I27E/V39A/R134Q/A153R/L278D/A547D/ A551D	+	629	43
262	I27E/V39A/L278D/C503Q/C565N	+	646	45
263	Q205T/L214E/C503Q/A547D/C565N	+	643	51
264	R134Q/L214E	+	644	50
265	I27E/V39A/P266H/L278D	+	646	45
266	R134Q/Q205T/C503Q	+	665	50
Вариант №	Активные мутации (по сравнению с вариантом №36)	FIOP	TIS	IHC
267	V39A/V105C/R134Q/P210C/L214E/A551D	+	595	41
268	V105C/A153R/Q205T/P266H/I285E/A547D/ C565N	+	625	45
269	I27E/V39A/R134Q/L214E/P266H/A551D	+	605	43
270	L214E/P266H/C503Q/A547D/A551D/C565N	+	648	51
271	V39A/V105C/P210C/A547D	+	630	42
272	I27E/V105C	+	641	50
273	I27E/V39A/R134Q/Q205T/L214E/P266H/ I285E/C503Q/A551D/C565N	+	579	40
274	I27E/V39A/R134Q/Q205T/P266H/C503Q/ A551D/C565N	+	626	43
275	I27E/V105C/R134Q/P210C/L214E/C503Q/ A551D/C565N	+	591	48
276	I27E/L214E/C503Q/A547D/C565N	+	629	51
277	I27E/V39A/R134Q/A153R/P210C/L214E/ L278D/I285E/A547D/C565N	+	572	39
278	I27E/V39A/A112C/I285E	+	622	40

034034

279	I27E/A112C/R134Q/L278D/I285E/C503Q/A551D/C565N	+	623	46
280	I27E/L214E/P266H/L278D/I285E/A551D	+	608	48
281	I27E/V39A/V105C/A153R/A551D/C565N	+	618	42
282	V39A/V105C/R134Q/A153R/Q205T/A551D	+	622	40
283	I27E/V39A/V105C/R134Q/Q205T/L214E	+	585	41
284	I27E/V105C/Q205T	+	635	49
285	I27E/Q205T/P266H/L278D/I285E/A551D/C565N	+	629	48
286	I27E/R134Q/L214E/C503Q	+	625	50
287	V105C/Q205T/L214E/C503Q/A547D/A551D/C565N	+	623	49
288	V39A/V105C/L214E/I285E/C503Q/A551D/C565N	+	592	39
289	I27E/V39A/V105C/L278D/C503Q/A547D/C565N	+	621	43
290	I27E/V39A/V105C/R134Q/I285E/A547D/A551D	+	591	39
291	I27E/V39A/A112C/R134Q/L214E/P266H/A551D	+	602	41
292	I27E/L278D/C503Q/A551D	+	656	52
293	I27E/V39A/R134Q/A153R/A547D	+	629	43
294	P266H/C565N	+	680	52
295	I27E/V105C/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N	+	615	47
296	I27E/V39A/L278D	+	646	45
297	P210C/L214E/P266H	+	644	51
298	I27E/V39A/R134Q/P210C/L214E/C503Q	+	601	43
299	I27E/V39A/R43L/V105C/A153R/L214E/P266H/L278D/C503Q	+	607	42
300	I27E/V105C/Q205T/L214E/L278D/I285E/C503Q/A547D/A551D/C565N	+	583	46
301	I27E/V39A/V105C/C503Q/A547D/A551D/C565N	+	621	43
302	I27E/V105C/L214E/I285E/A551D/C565N	+	588	46
303	I27E/P210C/A551D	+	646	51
304	I27E/V39A/V105C/Q205T/L214E/L278D/C503Q/A547D	+	589	42

Вариант №	Активные мутации (по сравнению с вариантом №36)	FIOP	TIS	IHC
305	I27E/V105C/L278D/A547D	+	636	50
306	C503Q	+	680	52
307	I27E/V39A/V105C/R134Q/L214E/L278D/ A547D/A551D	+	585	41
308	I27E/R134Q	+	652	51
309	V39A/R134Q	+	656	44
310	I27E/V39A/V105C/A112C/Q205T/P210C/ P266H/C503Q/A547D	+	611	42
311	V39A/A112C/A153R/Q205T/L278D/ C503Q/A547D	+	648	41
312	I27E/V105C/P266H	+	641	50
313	I27E/V39A/V105C/R134Q/P210C/L214E	+	581	41
314	I27E/V39A/V105C/R134Q/L278D/A551D	+	612	42
315	I27E/V39A/V105C/A112C/R134Q/A153R/ Q205T/L214E/P266H/L278D/C503Q/A551D	+	577	40
316	I27E/V105C/R134Q/A153R/I285E/A547D	+	603	45
317	I27E/V39A/A112C/A547D	+	638	43
318	I27E/V39A/R134Q/A153R/L214E/ P266H/L278D/C503Q/A547D/C565N	+	602	42
319	I27E/V105C/Q205T/P266H/C503Q	+	635	49
320	I27E/V39A/V105C/R134Q/L278D/ I285E/C503Q	+	596	39
321	C503Q/A551D/C565N	+	675	52
322	I27E/V39A/A112C/R134Q/Q205T/ P210C/L214E/A551D/C565N	+	593	41
323	R134Q/C503Q/A547D/A551D	+	666	51
324	I27E/A112C/Q205T/P266H/L278D/ I285E/C503Q	+	631	46
325	P266H/L278D/C503Q	+	680	52
326	I27E/V39A/Q205T/P266H/A551D	+	635	44
327	Q205T/L214E/I285E/C503Q/C565N	+	627	48
328	I27E/V105C/R134Q/Q205T/L214E/ P266H/L278D/C503Q/C565N	+	600	48
329	I27E/V39A/V105C/R134Q/P266H/ C503Q	+	617	42
330	I27E/V39A/V105C/R134Q/P210C/ L214E/I285E/A547D	+	555	38
331	I27E/V39A/V105C/Q205T/P210C/ L278D/C503Q	+	616	42
332	I27E/V39A/R134Q/A547D/C565N	+	632	44
333	V105C/A547D/A551D	+	655	50
334	I27E/V105C/R134Q/A153R/P210C/ L214E/C503Q/A547D	+	588	47
335	I27E/P210C/L214E/C503Q/A547D	++	620	51
336	I27E/V105C/C503Q/A547D/A551D/ C565N	+	636	50
337	I27E/V105C/R134Q/L214E/L278D/ C503Q/A547D/A551D/C565N	+	600	48
338	I27E/V39A/V105C/A153R/Q205T/ L278D/C503Q/A547D/A551D	+	612	41
339	I27E/V39A/V105C/A112C/L214E/ I285E/C503Q/A547D	+	573	39
340	L214E/A547D	+	648	51
341	V105C/Q205T/L214E/L278D	+	628	49
342	I27E/V39A/Q205T/L214E/C503Q/ C565N	+	614	44
343	I27E/P210C	+	651	51

Вариант №	Активные мутации (по сравнению с вариантом №36)	FIOP	TIS	IHC
344	V105C/Q205T/C503Q/A551D	+	649	49
345	I27E/V39A/A112C/R134Q/P266H/I285E	+	613	39
346	V39A/P210C/L214E/L278D/I285E/C503Q/A551D	+	603	41
347	I27E/Q205T/L214E/C503Q/A547D/C565N	+	624	51
348	I27E/V39A/L214E/L278D/C503Q/A547D/C565N	+	614	44
349	I27E/P210C/C503Q/C565N	+	651	51
350	I27E/L278D/C503Q/A551D/C565N	+	656	52
351	R134Q/L214E/L278D/C503Q	+	644	50
352	I27E/A153R/L214E/L278D/I285E/A551D/C565N	+	605	47
353	I27E/V105C/L214E/A551D/C565N	+	609	49
354	V39A/R134Q/Q205T/L214E/C503Q/C565N	+	624	43

Таблица 9-2

FIOP, общая иммуногенность (TIS) и количество иммуногенных совпадений (IHC) для вариантов, направленных на TCE-III ("-" = FIOP<0,7; "+" = FIOP 0,7<FIOP<1,4; "++" = FIOP>1,4)

Вариант №	Активные мутации (по сравнению с вариантом №36)	FIOPC	TIS	IHC
Вариант 36		+	71	7
400	V80I/R134C/P564Q	+	60	5
401	V121C	+	44	6
402	R134L	+	78	7
403	A124G	+	58	7
404	R134W	+	63	5
405	L126M	+	56	5
406	N130C/M370I	+	62	6
407	N130Q	+	65	7
408	A123G	+	67	8
409	A129G	+	64	9
410	G135A/A394E	+	76	7
411	A129L	+	82	9
412	M133R	+	52	3
413	G135S	+	78	9
414	L126T	+	62	8
415	L127A	+	46	6
416	R134I	+	82	7
417	R134N/G307C	+	60	5
418	L126I	++	80	12
419	G135C	+	67	6
420	M125L	+	72	8

Таблица 9-3

FIOP, общая иммуногенность (TIS) и количество иммуногенных совпадений (IHC) для вариантов, направленных на TCE-IV ("-" = FIOP<0,7; "+" = FIOP 0,7<FIOP<1,4; "++" = FIOP>1,4)

Вариант №	Активные мутации (по сравнению с вариантом №36)	FIOPC	TIS	IHC
Вариант 36		+	74	11
500	P157H	+	69	8
501	R140M	+	72	11
502	P157F	+	80	12
503	A153C	+	56	7
504	E142V	+	84	14
505	K145G/P157T	+	62	8
506	R140D	+	63	8
507	E142D/G371D	+	79	13
508	M147A	+	48	1
509	T156K/G483C	+	83	12
510	P157D	+	64	8
511	A62S/M147V	+	62	8
512	R146L	+	81	14
513	Y158E	+	72	11
514	G154Y/L174M/Q321K/S456I/G483C	+	75	10
515	S82I/G135C/P157F/W279L	+	77	11
516	I144N	+	61	7
517	T110I/I139R	+	65	8
518	L47M/I144L	+	67	8
519	L47M/M147G/A383E	+	48	4
520	G20S/I144L	+	67	8
521	R146W/D191Y	+	62	5
522	P157Y	+	73	9
523	L47M/P157C	+	68	8
524	E142P	+	68	9
525	F150K	+	59	6
526	L141T	+	55	7
527	V159H	+	67	8
528	I144L	+	67	8
529	A119E/T156H/A289D	+	78	11
530	Q58K/P157D/G369C	+	64	8
531	L47M/R146E	+	58	6
532	E142H	+	79	13
533	R140N/A199E	+	67	8
534	I144V	+	72	13
535	I149L	+	69	9
536	R146H	+	77	12
537	I139M	+	74	11
538	A153S/H250N	+	73	10
539	L319M	+	74	11
540	R140E/A334S/A551D	+	63	8
541	F150L	+	79	12
542	L143M	+	72	11
543	A153G	+	62	8

Вариант №	Активные мутации (по сравнению с вариантом №36)	FIOPC	TIS	IHC
544	I139V	+	74	11
545	Q58H/L143V	+	72	11
546	G154R	+	81	13
547	K145Q	+	72	11
548	L143F	+	74	11
549	R140G	+	67	8
550	V159C	+	72	11
551	Q389K	+	74	11
552	L141P	+	58	5
553	M247I	+	74	11
554	F150M	+	77	12
555	L141Q	+	59	7
556	L151M	+	68	9
557	V159 л	+	74	11
558	R94C/I149E	+	53	6
559	V159M	+	74	11
560	L118M/L141H	+	58	7
561	K145N	+	71	11
562	I149R	+	72	11
563	K145R	+	84	15
564	L141K	+	59	7
565	R43S	+	74	11

Таблица 9-4

FIOP, общая иммуногенность (TIS) и количество иммуногенных совпадений (IHC) для вариантов, направленных на TCE-V ("-" = FIOP<0,7; "+" = FIOP 0,7<FIOP<1,4; "++" = FIOP>1,4)

Вариант №	Активные мутации (по сравнению с вариантом №36)	FIOPC	TIS	IHC
Вариант 36		+	36	2
600	Y176R	+	51	4
601	S180C	+	27	0
602	S180T	+	27	0
603	V172L	+	30	1
604	I177V	+	24	0
605	V172I	+	29	1
606	I177M	+	30	1
607	Y176I	+	54	4
608	Y176M	+	33	2
609	Y176V	+	41	3
610	L174M	+	21	0
611	P117T/Y176Q	+	37	2
Вариант №	Активные мутации (по сравнению с вариантом №36)	FIOPC	TIS	IHC
612	S175G	+	26	0
613	T178L/A477S	+	43	5
614	V172C	+	26	0
615	Y176E	+	20	0

Таблица 9-5

FIOP, общая иммуногенность (TIS) и количество иммуногенных совпадений (IHC) для вариантов, направленных на TCE-VIII ("-" = FIOP<0,7; "+" = FIOP 0,7<FIOP<1,4; "++" = FIOP> 1,4)

Вариант №	Активные мутации (по сравнению с вариантом №36)	FIOPC	TIS	IHC
Variant 36		+	83	10
700	A232S	+	83	10
701	A112S/M370A/A507E	+	71	10
702	Q240K/H374R	+	83	10
703	S461G	+	83	10
704	H374D	+	83	10
705	M372A	+	74	10
706	L349M	+	83	10
707	Y378S	+	74	7
708	G371H	+	91	11
709	Y377N	+	82	10
710	I379N	+	80	8
711	D191Y/H385N	+	81	10
712	I379L	+	83	10
713	R43S/H374R	+	83	10
714	Q355K/H374S	+	83	10
715	P275T/H374R	+	83	10
716	H374Q/P396Q	+	99	14
717	H385N	+	81	10
718	Y378 л	+	78	9
719	I379C	+	70	7
720	M370G	+	64	10
721	M372V	+	76	10
722	K384R	+	87	10
723	A383V	+	88	13
724	M147I/H374S	+	83	10
725	Y378F/P404Q	+	85	10
726	H374S	+	83	10
727	Y378E	+	55	2
728	H374R/G417C	+	83	10
729	L418M	+	83	10
730	S525L	+	83	10
731	Y378D	+	60	4

Вариант №	Активные мутации (по сравнению с вариантом № 36)	FIOPC	TIS	IHC
732	A383S	+	88	10
733	D387S	+	96	11
734	L382H	+	78	10
735	L382C	+	76	8
736	G371Q	+	84	10
737	H374L	+	85	11
738	Y378C	+	58	5
739	H374A	+	83	10
740	L375M	+	77	10
741	H385C	+	74	8
742	A334S/H374V	+	85	11
743	H374R	+	83	10
744	H385M/P403H	+	83	11
745	Y378I	+	83	10
746	Y377I	+	86	10
747	H385G	+	74	7
748	H385S/P403H	+	79	9
749	H374N	+	83	10
750	S187R/L381V	+	78	7
751	L382S	+	77	9
752	Y377C	+	75	7
753	L381V	+	78	7
754	G371S	+	88	10
755	A256S/L381N	+	70	6
756	I379M	+	80	10
757	R43S/H374K	+	83	10
758	I379H	+	76	7
759	M370S	+	64	10
760	P275Q/M370S	+	64	10
761	G425V	+	83	10
762	A447S	+	83	10
763	L382M	+	80	10
764	G371N	+	84	10
765	L381M/Q560K	+	79	10
767	L382I	+	77	8
768	H374G	+	83	10
769	M370I	+	76	10
770	Q332K/Y377M	+	86	10
771	Y378N	+	64	5
772	L375I	+	83	10
773	H374T	+	83	10
774	L381G	+	60	4

Таблица 9-6

FIOP, общая иммуногенность (TIS) и количество иммуногенных совпадений (IHC) для вариантов, направленных на TCE-IX ("-" = FIOP<0,7; "+" = FIOP 0,7<FIOP<1,4; "++" = FIOP>1,4)

Вариант №	Активные мутации (по сравнению с вариантом № 6)	FIOP C	TIS	IHC
Вариант 36		+	45	4
800	I439V	+	49	4
801	I439C	+	39	1
802	S438F	+	50	4
803	T433S	+	44	0
804	T433A	+	35	0
805	Y435Q/H446N	+	43	2
806	L431V	+	28	0
807	N437Q	+	40	0
808	L213M/S438L	+	46	4
809	L432C	+	39	2
810	L432V	+	47	4
811	T433L	+	50	4
812	L431P	+	18	0
813	I439F	+	47	4
814	S286R/Y435T	+	53	4
815	S98I	+	45	4
816	S438R	+	48	4
817	S331I	+	45	4
818	S438M	+	44	4
819	Q240K/T433Y	+	41	0
820	T433I	+	46	3
821	T433N	+	38	0
822	L431S	+	27	0
823	N437G	+	38	0
824	L431E	+	26	0
825	L431C	+	25	0
826	G436T	+	45	0
827	G436D	+	42	1
828	T433V	+	59	7
829	N437T/L538M	+	52	4
830	A289S/L431E	+	26	0
831	T433Q	+	37	0
832	I439L	+	46	4
833	F434C	+	34	0
834	T433P	+	35	0
835	A24S/F434M	+	69	8
836	L431G	+	18	0
837	S438C	+	45	1
838	T433W	+	33	0
839	Y435L	+	57	5
840	A62S/T433N	+	38	0
841	N437E	+	46	3
842	A477S	+	45	4
843	G436M	+	87	11
844	T433R	+	70	10
845	S438T	+	46	4

Таблица 9-7

FIOP, общая иммуногенность (TIS) и количество иммуногенных совпадений (IHC) для вариантов, направленных на TCE-X ("-" = FIOP<0,7; "+" = FIOP 0,7<FIOP<1,4; "++" = FIOP>1,4)

Вариант №	Активные мутации (по сравнению с вариантом №36)	FIOPC	TIS	IHC
Вариант 36		+	47	7
900	I471V	+	45	7
901	F472G	+	16	0
902	G483S	+	60	9
903	G483A/S524I	+	64	10
904	Y475C	+	20	0
905	I478N	+	44	6
906	V476I	+	30	2
907	N474D/R490H	+	29	3
908	P275Q	+	47	7
909	Q473K	+	55	7
910	G483H	+	58	8
911	Q473H/A507S	+	52	7
912	N474H	+	49	7
913	Y475F	+	58	7
914	I478S	+	46	6
915	Q473M	+	69	9
916	V476C	+	23	0
917	L104M/V476L	+	36	3
918	A119E/G365A	+	47	7
919	N474W	+	51	7
920	I471K	+	29	2
921	Q292H/A479G	+	35	2
922	G276V	+	47	7
923	I471N	+	26	1
924	A479S	+	53	7
925	A558S	+	47	7
926	Q473S	+	56	8
927	Q473R	+	62	8
928	Y475Q	+	33	5
929	I471G	+	32	3
930	A479G	+	35	2
931	A70S/N474E	+	32	3
932	I471F	+	48	7
933	Q58R/Y475H	+	32	5
934	F482L	+	56	9
935	V476L	+	36	3
936	A24E	+	47	7
937	N474R	+	55	7
938	G483C	+	49	6
939	Q473H	+	52	7
940	I471M	+	46	7
941	I471R	+	31	2
942	P404T/A477V	+	47	6
943	G483R/G537C	+	78	13
Вариант №	Активные мутации (по сравнению с вариантом №36)	FIOPC	TIS	IHC
944	F482C	+	45	6
945	Q355H/I478C	+	31	1
946	L206M	+	47	7
947	N474A	+	48	7
948	Y475L	+	60	7
949	I471W	+	34	4

Таблица 9-8

FIOP, общая иммуногенность (TIS) и количество иммуногенных совпадений (IHC) для вариантов, направленных на TCE-I, III, VI, VIII и X ("-" = FIOP<0,7; "+" = FIOP 0,7<FIOP<1,4; "++" = FIOP>1,4)

Вариант №	Активные мутации (по сравнению с вариантом №36)	FIOP	TIS	IHC
Вариант 36		+		
950	F472G/C503Q/C565N	+	651	45
951	L381G/F472G/C503Q/C565N	+	628	39
952	M133R/C503Q	+	663	48
953	M133R/L381G/C565N	+	640	42
954	V39A/C503Q/C565N	+	667	45
955	V39A/F472G/C503Q/C565N	+	636	38
956	V39A/G248C/L381G/F472G/C503Q/C565N	+	613	32
957	V39A/K115E/M133R/C565N	++	646	39
958	V39A/L381G	+	644	39
959	V39A/M133R/C503Q	+	648	41
960	V39A/M133R/C503Q/C565N	+	648	41
961	V39A/M133R/F472G/C503Q/C565N	+	617	34
962	V39A/M133R/F472G/C565N	+	617	34
963	V39A/M147A/C565N	+	641	35
964	V39A/M147A/F472G/C503Q/C565N	+	610	28
965	V39A/M147A/F472G/C565N	+	610	28
966	V39A/M147A/L381G/C503Q/C565N	+	618	29
967	V39A/M147A/L381G/F472G/C503Q/C565N	+	587	22
968	V39A/M147A/Y378E/C503Q/C565N	+	613	27
969	V39A/M147A/Y378E/C565N	+	613	27
970	V39A/Y378E/C503Q/C565N	+	639	37
971	V39A/Y378E/C565N	+	639	37
972	Y378D/C503Q	+	659	46
973	Y378E/F472G/C503Q/C565N	+	623	37

Таблица 9-9

FIOP, общая иммуногенность (TIS) и количество иммуногенных совпадений (IHC) для вариантов, направленных на TCE-III и VIII ("-" = FIOP<0,7; "+" = FIOP 0,7<FIOP<1,4; "++" = FIOP>1,4)

Вариант №	Активные мутации (по сравнению с вариантом №967)	FIOP	TIS	IHC
Вариант 967		+		
974	A129I	-	598	26
975	A129V	-	595	24
976	A136K	++	595	22
977	A24E/G381L	+	604	28
978	A289S	+	590	23
979	A383C	+	577	18
980	A383M	++	602	28
981	G381A	++	598	24
982	G381C	-	580	22
983	G381F	+	601	25
984	G381I	++	610	27
985	G381L	++	610	28
986	G381M	+	606	28
987	G381N	+	597	24

988	G381Q	+	590	23
989	G381S	+	601	24
990	G381T	+	590	23
991	H132L	-	603	25
992	H132S	-	592	23
993	H374G	+	587	22
994	H374M	+	589	23
995	H374Q	-	587	22
996	L127V	-	576	22
997	L431M	+	591	22
998	L563M	-	587	22
999	M372L	-	580	22
1000	R134C	-	576	20
1001	R134F	+	588	21
1002	R134H	+	579	21
1003	R134K	-	585	21
1004	S131C	-	579	21
1005	S131T	+	580	21
1006	V388C	+	577	21
Вариант №	Активные мутации (по сравнению с вариантом №967)	FIOP	TIS	INC
1007	V388T	+	578	21
1008	R134H/V388T	+	570	20
1009	R134H/Y378E/G381L	+	574	19
1010	R134H/Y378E/G381L/V388T	+	566	19

Тестирование *in vitro* деиммунизированных вариантов PAL.

Деиммунизированные варианты PAL тестируют в анализе дендритных Т-клеток для эмпирического тестирования их способности вызывать Т-клеточный ответ. Стандартными способами выделяют мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) от донора, являющегося человеком. Эти клетки используют в качестве источника моноцитов, которые культивируют в средах определенного состава для получения незрелых дендритных клеток. Эти незрелые дендритные клетки (DC) нагружают деиммунизированными вариантами PAL, а затем индуцируют в более зрелый фенотип дополнительным культивированием в средах определенного состава с получением праймированных антигеном DC. PBMC от донора с истощенными CD8⁺ Т-клетками, получаемые из образцов того же донора, что и DC, метят CFSE, затем культивируют с праймированными антигеном DC в течение 7 суток, после чего тестируют в восьми повторениях. Каждая культура клеток DC-Т включает набор необрабатываемых контролей (т.е. отрицательных контролей). Анализ также включает контроли эталонным антигеном (т.е. положительные контроли), содержащие два эффективных полных белковых антигена. Анализы, в которых используют клетки, выделяемые у 50 являющихся людьми доноров с различными аллелями главного комплекса гистосовместимости II класса, обеспечивают статистически значимую оценку способности вариантов PAL вызывать Т-клеточный ответ.

Несмотря на то, что изобретение описано со ссылкой на конкретные варианты осуществления, можно проводить различные изменения и можно заменять эквиваленты для адаптации к конкретной ситуации, веществу, композиции, способа, этапа или этапов способа, таким образом получая преимущество по изобретению, не выходя за рамки объема того, что описано в заявке изобретения.

Для всех целей в Соединенных Штатах Америки каждая и любая публикация и патентный документ, цитируемый в этом описании, включен в настоящее описание посредством ссылки, как если бы конкретно и отдельно указывали, что каждая такая публикация или документ включен в настоящее описание посредством ссылки. Цитирование публикаций и патентных документов не предназначено служить в качестве показателя того, что любой такой документ принадлежит к известному уровню техники, и не представляет собой допущение его содержания или даты.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Сконструированный полипептид, обладающий активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), который

а) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 4 и имеет замену в положении H307G/Q/M по сравнению с SEQ ID NO: 4; и

дополнительно содержит по меньшей мере одну или более из следующих аминокислотных замен A39V, T54K, G59R, S73K, A112C, R134Q, A91V, Y158H, S180A, K195E, Q240R/W, T243E/L, I245L, A256G, L257W/A, N270K, N290G, Y304H, R305M, E308Q, I326F, L349M, D353A/N, L364Q, A394V, S399N, N400K, P404A, L407V, F443H, N453G, Y459F, T460G, T463N, N474Q, E509L, Q521K/S, K522Y/F/N, T524S, P528L, S546R и P564G/L/M при оптимальном выравнивании с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 4;

b) обладает улучшенным свойством каталитической активности, сниженной чувствительностью к протеолизу, повышенной устойчивостью к кислому pH, сниженной агрегацией, сниженной иммуногенностью или их сочетанием по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 4.

2. Полипептид по п.1, где улучшенное свойство выбрано из сниженной чувствительности к протеолизу и/или повышенной устойчивости к кислому pH.

3. Полипептид по п.1, где последовательность представляет собой PAL дикого типа, получаемую из *Anabaena variabilis*.

4. Полипептид по п.1, который по меньшей мере приблизительно на 95% идентичен последовательности SEQ ID NO: 4.

5. Полипептид, обладающий активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), по любому из пп.1-4, представляющий собой фермент *Anabaena variabilis*.

6. Полипептид, обладающий активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что является термостабильным.

7. Полипептид, обладающий активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что является устойчивым к протеолизу.

8. Полипептид, обладающий активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), по п.7, отличающийся тем, что является устойчивым к протеолизу по меньшей мере одним ферментом желудочно-кишечного тракта.

9. Полипептид, обладающий активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), по п.8, отличающийся тем, что является устойчивым к протеолизу химотрипсином, трипсином, карбоксипептидазами и/или эластазами.

10. Полипептид, обладающий активностью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), по любому из пп.1-9, отличающийся тем, что является кислотоустойчивым.

11. Полипептид по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что является деиммунизированным.

12. Полипептид по п.11, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 8.

13. Полипептид по любому из пп.1-12, который является очищенным.

14. Полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид по любому из пп.1-13.

15. Полинуклеотидная последовательность по п.14, которая находится под контролем промотора.

16. Полинуклеотидная последовательность по п.14 и/или 15, которая является кодон-оптимизированной.

17. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотидную последовательность по любому из пп.14-16, которая находится под контролем промотора.

18. Вектор экспрессии по п.17, в котором указанная контролирующая последовательность представляет собой промотор.

19. Вектор экспрессии по п.18, в котором указанный промотор представляет собой гетерологичный промотор.

20. Клетка-хозяин, трансформированная полинуклеотидной последовательностью по любому из пп.14-16 и/или вектором по любому из пп.17-19.

21. Клетка-хозяин по п.20, которая является *E.coli*.

22. Способ получения полипептида PAL в клетке-хозяине, включающий культивирование клетки-хозяина по п.20 в условиях культивирования, обеспечивающих экспрессию указанного полипептида.

23. Способ по п.22, дополнительно включающий выделение полипептида, содержащего фенилаланин-аммиак-лиазу (PAL), из культуры и/или клеток-хозяев.

24. Способ по п.23, дополнительно включающий этап очистки указанного полипептида.

25. Композиция для лечения и/или профилактики фенилкетонурии у пациента, содержащая полипептид по любому из пп.1-13.

26. Композиция по п.25, которая является фармацевтической композицией.

27. Композиция по п.26, дополнительно содержащая по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент и/или носитель.

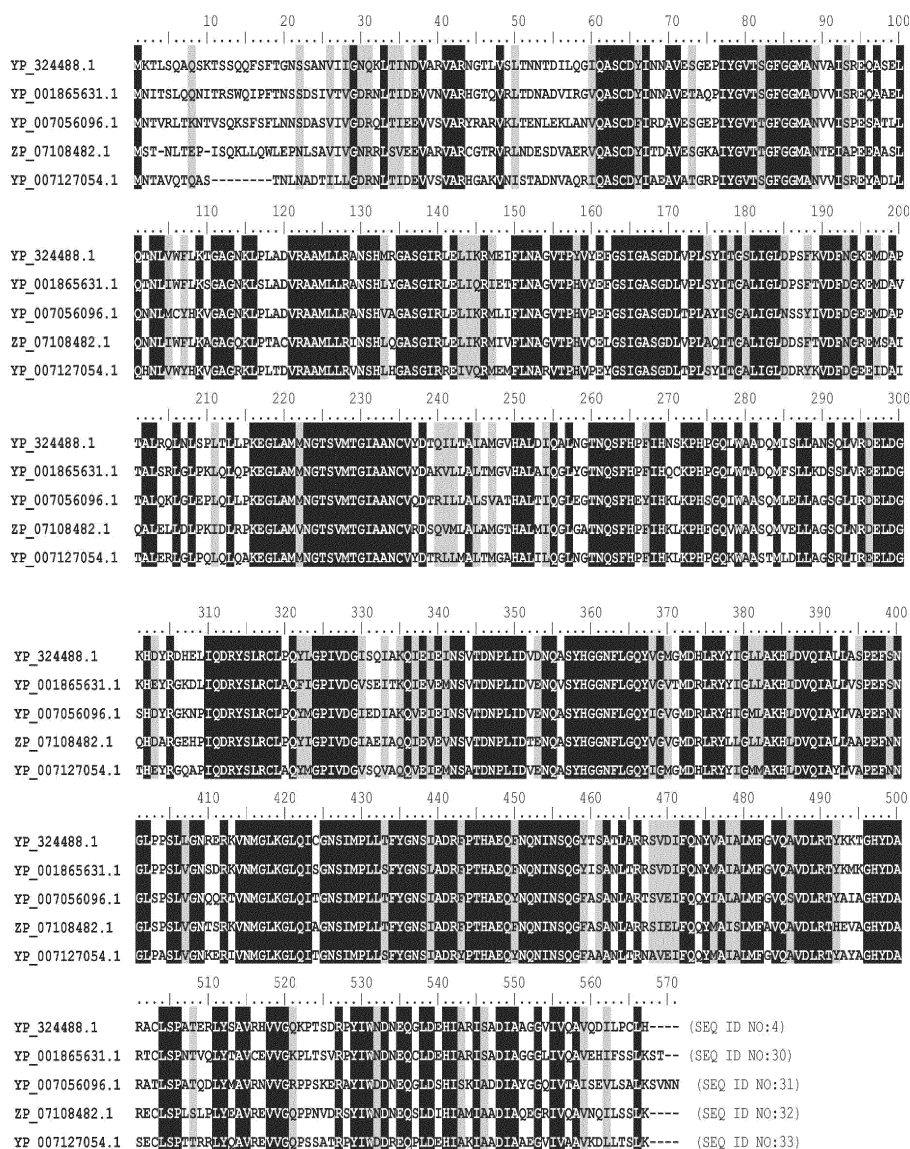
28. Композиция по любому из пп.25-27, которая подходит для лечения фенилкетонурии.

29. Композиция по любому из пп.26-28, которая подходит для перорального введения человеку.

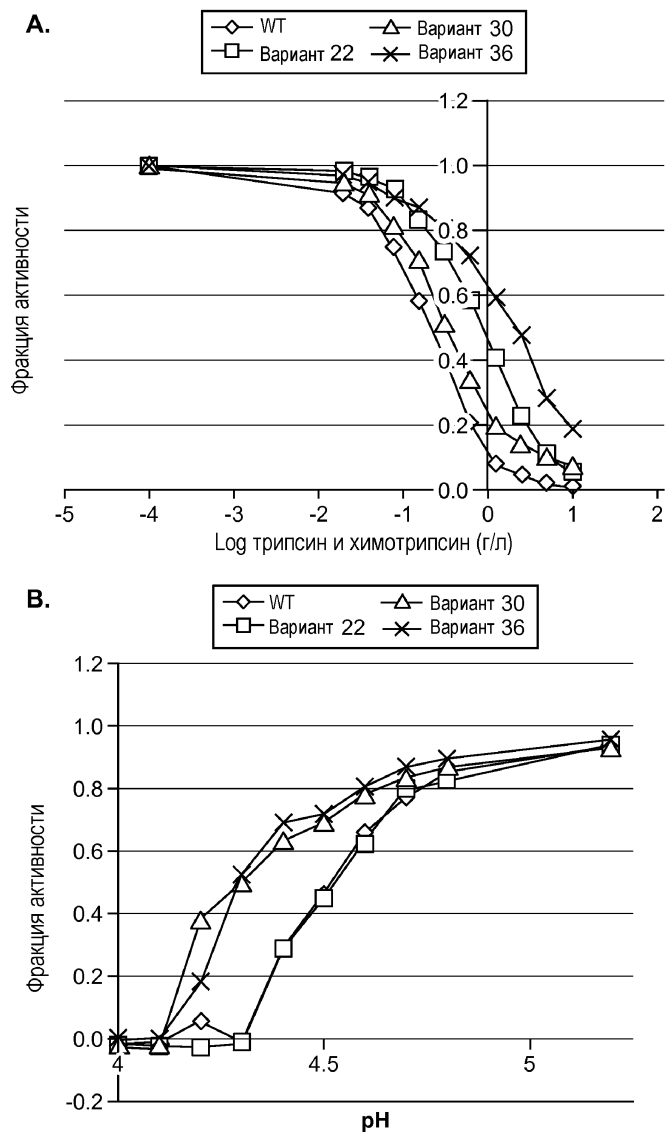
30. Композиция по любому из пп.26-29, которая находится в форме пилюли, таблетки, капсулы, желатиновой капсулы, жидкости или эмульсии.

31. Композиция по п.30, где указанная пилюля, таблетка, капсула или желатиновая капсула дополнительно содержит растворяющееся в кишечнике покрытие.

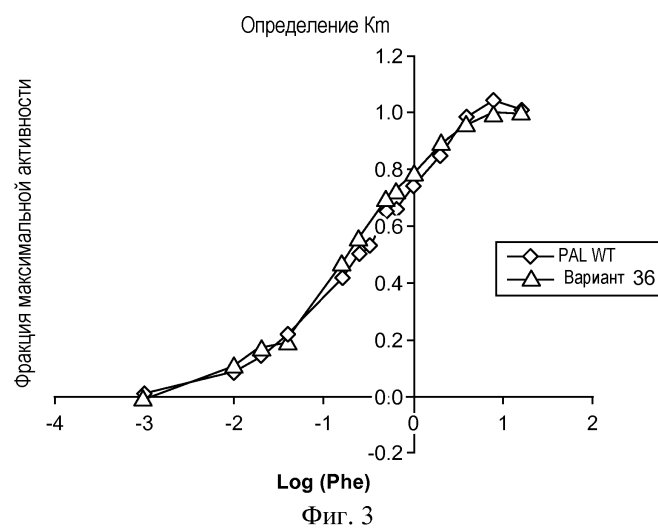
32. Композиция по любому из пп.26-28, которая подходит для парентеральной инъекции человеку.
33. Композиция по любому из пп.26-32, которая содержит по меньшей мере одно дополнительное терапевтически эффективное соединение.
34. Композиция по п.33, которая содержит по меньшей мере одно дополнительное терапевтически эффективное соединение.
35. Способ лечения и/или профилактики фенилкетонурии у индивидуума, включающий введение композиции по любому из пп.26-34.
36. Способ по п.35, при котором течение фенилкетонурии облегчается.
37. Способ по п.35 и/или 36, где индивидуум употребляет в пищу рацион, который ограничен по содержанию метионина, фенилаланина и/или тирозина по сравнению с контролем.
38. Способ по любому из пп.35-37, где индивидуум представляет собой ребенка.
39. Способ по любому из пп.35-38, где индивидуум представляет собой взрослого или молодого человека.
40. Применение композиции по любому из пп.25-34 для лечения и/или профилактики фенилкетонурии у индивидуума.



Фиг. 1

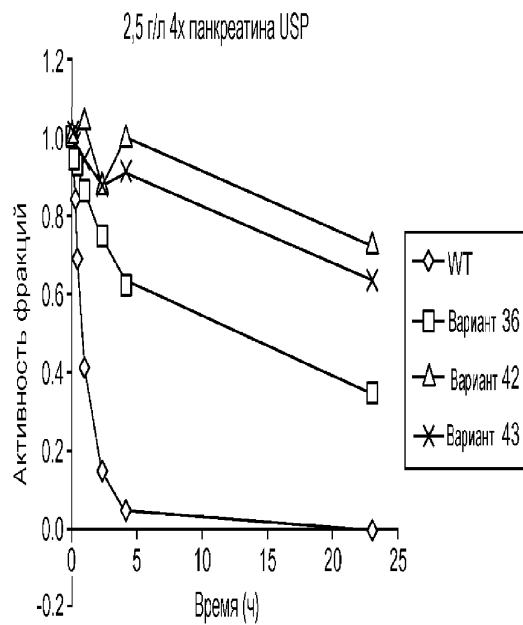
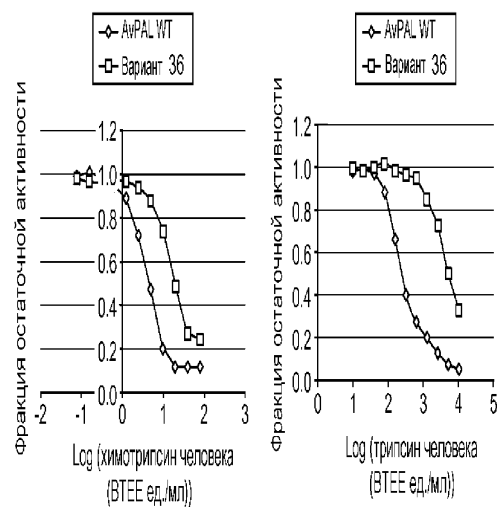


Фиг. 2

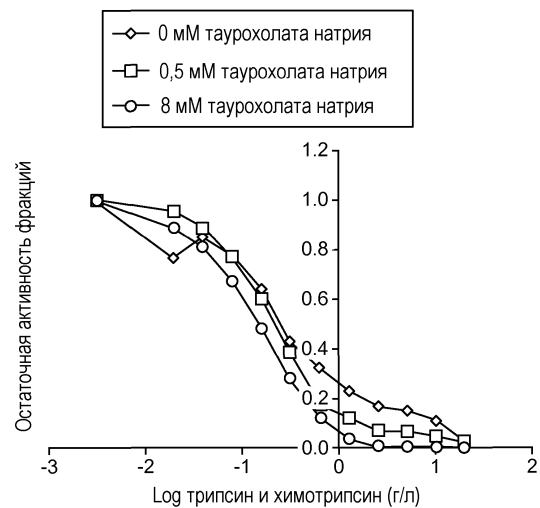




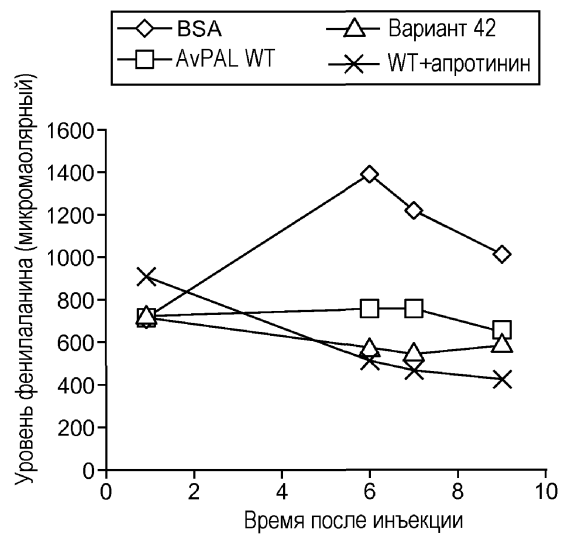
Фиг. 4



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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