



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **325568**

(13) **B1**

**NORGE**

(51) Int Cl.

*C12N 9/54 (2006.01)*

*C11D 3/386 (2006.01)*

*C12N 15/57 (2006.01)*

*C12N 1/21 (2006.01)*

*C12R 1/125 (2006.01)*

**Patentstyret**

---

(21)	Søknadsnr	19961468	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1994.10.13 PCT/US94/11562
(22)	Inng.dag	1996.04.12	(85)	Videreføringdag	1996.04.12
(24)	Løpedag	1994.10.13	(30)	Prioritet	1993.10.14, US, 137240
(41)	Alm.tilgj	1996.04.12			
(45)	Meddelt	2008.06.23			
(73)	Innehaver	Genencor International Inc, 4 Cambridge Place, 1870 Winton Road South, Rochester, NY 14618, US			
(72)	Oppfinner	Thomas Paul Graycar, Pacifica, CA, US Richard R. Bott, Burlingame, CA, US Lori J. Wilson, Millbrae, CA, US			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO			

---

(54)	Benevnelse	<b>Subtilisinvarianter, DNA, ekspresjonsvektor samt vertscelle.</b>
(56)	Anførte publikasjoner	Pantoliano M. et al., 1989. Biochemistry vol. 28, s.7205-7213 Narhi L. et al., 1991. Biological abstracts vol.91, no.9 Graycar T. et al., Annals of the New York academy of sciences, vol.672, s.71-79 Bott R. et al., Annals of the New York academy of sciences, vol.672, s. 10-19 Siesen R. et al., 1991. Protein Engineering, vol.4, no.7, s.719-737 Wells J. et al., 1987. Proceedings of the national academy of sciences, vol.84 EP 251446, EP 398539, EP 405901, EP 405902, WO 8808028, WO 8909819, WO 9106637 WO 9208778

(57) **Sammendrag**

Nye karbonylhydrolase varianter avledet fra DNA sekvensene til naturlig-forekommende eller rekombinante ikke-humane karbonylhydrolaser er beskrevet. Variant karbonylhydrolaser blir oppnådd ved in vitro modifikasjon av en forløper DNA sekvens kodende for naturlig-forekommende eller rekombinant karbonylhydrolase for å danne substitusjon av en mengde aminosyreresidier i aminosyresekvensen til en forløper karbonylhydrolase. Slike variant karbonylhydrolaser har egenskaper som er forskjellige fra forløperhydrolase, så som endret proteolytisk aktivitet, endret stabilitet osv. Substituerte aminosyreresidier korresponderer med posisjonene +76 i kombinasjon med en eller flere av følgende residier +99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265 og/eller +274 i *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin.

- Foreliggende oppfinnelse vedrører subtilisinvarianter som har en aminosyresekvens, som ikke finnes i naturen, og som er avledet fra et forløpersubtilisin, omfattende substitusjoner som svarer til: N76D/S103A; N76D/V104I; N76D/I107V eller N76D/S99D/S101R fra *B. amyloliquefaciens*-subtilisin, hvor subtilisinvarianten har forbedret vaske ytelse sammenliknet med forløpersubtilisin. Foreliggende oppfinnelse vedrører også DNA sekvenser som koder for nevnte subtilisinvarianter, ekspresjonsvektor som koder for nevnte DNA samt en vertcelle som er transformert med nevnte ekspresjonsvektor.
- 10 Serin proteaser er en subgruppe av karbonylhydrolase. De omfatter en klasse med forskjellige enzymer som har forskjellige spesifisiteter og biologiske funksjoner. Stroud, R., Sci. Amer., 131:74-88. Til tross for deres funksjonelle forskjeller er det katalytiske maskineriet til serinproteaser blitt vurdert av minst to genetiske forskjellige familier av enzymer: subtilisiner og kjemotrypsin fra pattedyr og homologe bakterielle
- 15 serinproteaser (for eksempel trypsin og *S. gresius* trypsin). Disse to familiene av serinproteaser viser betydelige like katalyseringsmekanismer. Kraut, J. (1977), Ann. Rev. Biochem., 46:331-358. Til tross for at den primære strukturen er urelatert danner den tertiære strukturen til disse to enzymfamiliene en konserverte katalytisk triade av aminosyrer bestående av serin, histidin og aspartat.
- 20 Subtilisin er en serin endoprotease (MW 27,500) som blir utskilt i store mengder fra forskjellige *Bacillus* arter og andre mikroorganismer. Proteinsekvensen til subtilisin er blitt bestemt ut fra minst fire forskjellige arter av *Bacillus*. Markland, F.S., et al. (1983), Honne-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364:1537-1540. Den tre-dimensjonale
- 25 krystallografiske strukturen til *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin med 2.5Å oppløsning er også blitt rapportert. Wright, C.S., et al. (1969), Nature, 221:235-242; Drenth, J., et al. (1972), Eur. J. Biochem., 26:177-181. Disse studiene indikerer at til tross for at subtilisin er genetisk ubeslektet med serinproteaser fra pattedyr så har den en lignende aktiv setestruktur. Røntgen krystallstrukturer til subtilisin inneholdende
- 30 kovalentlig bundede peptid inhibitorer (Robertus, J.D., et al. (1972), Biochemistry, 11:2439-2449) eller produktkomplekser (Robertus, J.D., et al. (1976), J. Biol. Chem., 251:1097-1103) har også gitt informasjon med hensyn på det aktive setet og antatt substratbindende kløft til subtilisin. I tillegg er et stort antall kinetikk og kjemiske modifikasjonsstudier blitt rapportert for subtilisin. (Philipp, M., et al. (1983), Mol. Cell.
- 35 Biochem., 51:5-32; Svendsen, B. (1976), Carlsberg Res. Comm., 41:237-291; Markland, F.S. Id.) samt minst en rapport hvor sidekjeden til methionin ved residiet 222 til subtilisin blir omdannet av hydrogenperoksid til methionin-sulfoksid (Stauffer,

D.C., et al. (1965), *J. Biol. Chem.*, 244:5333-5338) og sidekjeden til serin i residiet 221 omdannet til cystein ved kjemisk modifikasjon (Polgar, et al. (1981), *Biochemica et Biophysica Acta*, 667:351-354).

- 5 US-PS 4.760.025 (RE 34.606) beskriver modifikasjon av subtilisinaminosyreresidene som tilsvarer posisjonene i *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin tyrosin -1, aspartat +32, asparagin +155, tyrosin +104, methionin +222, glycin +166, histidin +64, glycin +169, fenylalanin +189, serin +33, serin +221, tyrosin +217, glutamat +156 og alanin +152. US-PS 5.182.204 beskriver modifikasjon av aminosyre +224 residiet i *Bacillus*
- 10 *amyloliquefaciens* subtilisin og ekvivalente posisjoner i andre subtilisiner som kan bli modifisert ved substitusjon, innskudd eller delesjon og som kan bli kombinert med modifikasjoner i residene identifisert i US-PS 4.760.025 (RE 34.606) for å danne nyttige subtilisinmutanter eller varianter. US-PS 5.155.033 beskriver lignende mutant subtilisiner som har en modifikasjon ved en ekvivalent posisjon som +225 til B.
- 15 *amyloliquwfaciens* subtilisin. US-PS 5.185.258 og 5.204.015 beskriver mutante subtilisiner som har en modifikasjon ved posisjonene +123 og/eller +274. US-patentsøknad SN 07/898,382 beskriver modifikasjon av mange aminosyreresidier i subtilisin, inkludert spesielt +99, +101, +103, +107, +126, +128, +135, +197 og +204. Alle disse patentene/søknadene er kjente. US-PS 4.914.031 beskriver visse subtilisin
- 20 analoger, inkludert en subtilisin modifisert i posisjon +76. EP0398539 beskriver modifikasjoner av subtilisin, hvor nevnte modifikasjoner involverer modifikasjon i posisjon 76 i kombinasjon med posisjon 109 og 218; posisjon 109, 218 og 222; posisjon 109, 218, 222 og 124 og/eller posisjon 31 og/eller posisjon 33 og/eller posisjon 62 og/eller posisjon 63 og/eller posisjon 217 og/eller posisjon 247. De bestemte residene
- 25 identifisert heri og/eller spesifikke kombinasjoner krevd heri, er ikke identifisert i disse referansene.

- Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer subtilisin varianter som angitt i krav 1, hvor foretrukkede varianter er angitt i krav 2. Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer videre
- 30 DNA sekvenser kodende for slike varianter, samt ekspresjonsvektorer inneholdende slike variant DNA sekvenser.

- Oppfinnelsen tilveiebringer videre vertsceller transformert med slike vektorer, samt vertsceller som har evne til å uttrykke slikt DNA for å produsere varianter enten
- 35 intracellulært eller ekstracellulært.

Oppfinnelsen innbefatter ikke-naturlig forekommende subtilisinvarianter som har forbedret vaske ytelse sammenliknet med forløpersubtilisin som aminosyresekvensen til varianten er avledet fra. Forløpersubtilisin kan være en naturlig-forekommende eller rekombinant subtilisin. Slike varianter har en aminosyresekvens som ikke finnes i naturen og som er oppnådd ved erstatning av en mengde aminosyreresidier til en forløpersubtilisin med forskjellige aminosyrer.

Oppfinnelsen omfatter også variant DNA sekvenser kodende for slike subtilisinvarianter. Disse variant DNA sekvensene er oppnådd fra en forløper DNA sekvens som koder for et naturlig-forekommende eller rekombinant forløperenzym. Til tross for at aminosyreresidierne identifisert for modifikasjon heri er identifisert ifølge nummereringen anvendt for *B. amyloliquefaciens* (som har blitt den konvensjonelle metoden for identifisering av residieposisjonene i alle subtilisiner), er foretrukket forløper DNA sekvens nyttig i foreliggende oppfinnelse DNA sekvensen til *Bacillus lentus* som vist i fig. 6 (SEK ID NO: 11).

#### **Kort beskrivelse av tegningene**

Figurene 1A-C angir DNA og aminosyresekvensen til *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin og et delrestriksjonskart av dette genet (SEK ID NO: 6).

20

Fig. 2 angir konservert aminosyreresidier blant subtilisiner fra *Bacillus amyloliquefaciens* (BPN)' og *Bacillus lentus* (vill-type).

Fig. 3A og 3B angir aminosyresekvensen til fire subtilisiner. Topplinjen representerer aminosyresekvensen til subtilisin fra *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin (også noen ganger referert til som subtilisin BPN') (SEK ID NO: 7). Den andre linjen angir aminosyresekvensen til subtilisin fra *Bacillus subtilis* (SEK ID NO: 8). Den tredje linjen angir aminosyresekvensen til subtilisin fra *B. licheniformis* (SEK ID NO: 9). Den fjerde linjen angir aminosyresekvensen til subtilisin fra *Bacillus lentus* (også referert til som subtilisin 309 i PCT WO89/06276) (SEK ID NO: 10). Symbolet \* angir tilstedeværelse av spesifikke aminosyreresidier sammenliknet med subtilisin BBP'.

30

Fig. 4 angir konstruksjon av plasmid GGA274.

Fig. 5 angir konstruksjon av GGT274 som er en mellomstilling til visse ekspressjonsplasmider anvendt i denne søknaden.

35

Fig. 6A og 6B angir DNA og aminosyresekvensen til subtilisin fra *Bacillus lentus* (SEK ID NO: 11). Moden subtilisin protein blir kodet av kodoner som begynner ved kodon GCG (334-336) som tilsvarer Ala.

5 Figurene 7A og 7B angir DNA og aminosyresekvensen til en foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen (N76D/S103A/V104I) (SEK ID NO: 12). DNA i denne figuren er blitt modifisert ifølge metodene beskrevet og koder for aspartat i posisjon 76, alanin i posisjon 103 og isoleucin i posisjon 104. Moden subtilisin variant protein blir kodet av kodoner begynnende ved kodon GCG (334-336) tilsvarende Ala.

10

Fig. 8 angir konstruksjon av vektor pBCDAICAT.

Fig. 9 angir konstruksjon av vektor pUCCATFNA.

15 Fig. 10 viser stabiliteten til et foretrukket mutant enzym sammenlignet med vill-type, i en flytende detergent formulering.

Karboxyl hydrolaser er enzymer som hydrolyserer forbindelser inneholdende

20



bindinger hvor X er oksygen eller nitrogen. De innbefatter naturlig-forekommende karboxylhydrolaser og rekombinante karboxylhydrolaser. Naturlig-forekommende karboxylhydrolaser innbefatter hovedsakelig hydrolaser, for eksempel peptidhydrolaser så som subtilisiner eller metalloproteaser. Peptidhydrolaser innbefatter  $\alpha$ -aminoacylpeptidhydrolase, peptidylaminosyrehydrolase, acylaminohydrolase, serinkarboxypeptidase, metallokarboxypeptidase, tiolproteinase, karboxyproteinase og metalloproteinase. Serin, metallo, tiol og syreproteaser er innbefattet, samt endo og ekso-proteaser.

30

"Rekombinant karboxyl hydrolase" refererer til en karboxylhydrolase hvor DNA sekvensen kodende for naturlig-forekommende karboxylhydrolase er modifisert for å produsere en mutant DNA sekvens som koder for substitusjon, innskudd eller delesjon av en eller flere aminosyrer i karboxylhydrolase aminosyresekvensen. Egnende modifikasjonsmetoder er beskrevet heri, og i US-PS 4.760.025 (RE 34.606), US-PS 5.204.015 og US-PS 5.185.258.

35

Subtilisiner er karbonylhydrolaser fra bakterier eller sopp som generelt spalter peptidbindingene til proteiner eller peptider. Anvendt heri betyr "subtilisin" en naturligforekommende subtilisin eller en rekombinant subtilisin. En serie av naturligforekommende subtilisiner er kjent for å bli produsert og blir ofte utskilt fra forskjellige mikrobielle arter. Aminesyresekvensene til medlemmene av denne serien er ikke fullstendig homologe. Subtilisiner i denne serien utviser derimot samme eller lignende type proteolytisk aktivitet. Denne klassen av serinproteaser har en vanlig aminesyresekvens til felles som definerer en katalytisk triade som sjelner disse fra chymotrypsin relatert klasse av serinproteaser. Subtilisiner og chymotrypsin relaterte serinproteaser har begge en katalytisk triade som omfatter aspartat, histidin og serin. I subtilisin relaterte proteaser er den relative rekkefølgen til disse aminosyrene, avlest fra amino til karboksyterminusen, aspartat-histidin-serin. I chymotrypsin relaterte proteaser er den relative rekkefølgen derimot histidin-aspartat-serin. Subtilisin som blir referert til heri refererer til serinprotease som har den katalytiske triaden til subtilisin relaterte proteaser. Eksempler innbefatter, men er ikke begrenset til, subtilisiner identifisert heri i fig. 3.

"Rekombinant subtilisin" refererer til en subtilisin hvor DNA sekvensen kodende for subtilisin er modifisert for å produsere en variant (eller mutant) DNA sekvens som koder for substitusjon, delesjon eller innskudd av en eller flere aminosyrer i naturligforekommende subtilisin aminesyresekvens. Egnede metoder for å produsere en slik modifikasjon, og som kan bli kombinert med de som er beskrevet heri, innbefatter de som er beskrevet i US-PS 4.760.025 (RE 34.606), US-PS 5.204.015 og US-PS 5.185.258.

"Ikke-humane karbonylhydrolaser" og DNA kodende for disse kan bli oppnådd fra mange prokaryote og eukaryote organismer. Egnede eksempler på prokaryote organismer innbefatter gram negative organismer så som *E. coli* eller *Pseudomonas* og gram positive bakterier så som *Micrococcus* eller *Bacillus*. Eksempler på eukaryote organismer hvorfra karbonylhydrolase og deres gener kan bli oppnådd innbefatter gjær som så *Saccharomyces cerevisiae*, sopp så som *Aspergillus* sp. og ikke-humane pattedyrkilder så som for eksempel *Bovine* sp. hvorfra genet kodende for karbonylhydrolase chymosin kan bli oppnådd. Som med subtilisiner kan en serie karbonylhydrolaser bli oppnådd fra forskjellige relaterte arter som har aminesyresekvenser som ikke er fullstendig homologe mellom medlemmene til den serien, men som til tross for dette utviser samme eller lignende type biologisk aktivitet. Ikke-human karbonylhydrolase som anvendt heri har følgelig en funksjonell definisjon

som refererer til karbonylhydrolaser som er assosiert, direkte eller indirekte, med prokaryote og eukaryote kilder.

En "karbonylhydrolase variant" har en aminosyresekvens som er avledet fra aminosyresekvensen til en "forløper karbonylhydrolase". Forløper karbonylhydrolaser (så som subtilisin) innbefatter naturlig-forekommende karbonylhydrolase (subtilisin) og rekombinante karbonylhydrolaser (subtilisin). Aminosyresekvensen til karbonylhydrolasevarianten er avledet fra forløper hydrolaseaminosyresekvensen ved substitusjon, delesjon eller innskudd av en eller flere aminosyrer av forløper aminosyresekvensen. En slik modifikasjon er av "forløper DNA sekvensen" som koder for aminosyresekvensen til forløper karbonylhydrolase (subtilisin) i stedet for manipulasjon av forløper karbonylhydrolase (subtilisin) enzymet per se. Egnede metoder for slik manipulasjon av forløper DNA sekvensen innbefatter fremgangsmåtene beskrevet heri, samt fremgangsmåter kjent for fagfolk innenfor dette området (se for eksempel EP 0 328299, WO89/06279 og US-patentene og søknadene som allerede er referert til heri).

Subtilisinvarianter ifølge oppfinnelsen er angitt i krav 1 og 2. Disse posisjonsnummerene til aminosyrene refererer til de som er blitt tildelt moden *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin sekvens presentert i fig. 1. Oppfinnelsen er derimot ikke begrenset til mutasjon av denne bestemte subtilisin, men omfatter også forløperkarbonylhydrolaser inneholdende aminosyreresidier i posisjoner som er "ekvivalent" med de spesielt identifiserte residiene i *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin. I en foretrukket utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er forløper subtilisin *Bacillus lentus* subtilisin og substitusjonene, delesjonene eller innskuddene blir dannet ved ekvivalent aminosyreresidie i *B. lentus*.

Et residie (aminosyre) av forløper karbonylhydrolase er ekvivalent med et residie av *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin dersom det enten er homologt (dvs. tilsvarende posisjon i enten primær eller tertiær struktur) eller analog med et spesifikt residie eller posisjon med det residiet i *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin (dvs. har samme eller lignende funksjonell kapasitet til å kombinere, reagere eller reagere kjemisk).

For å etablere homologi med primær struktur blir aminosyresekvensen til en forløper karbonylhydrolase direkte sammenlignet med *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin primær sekvens og spesielt med et sett av residier kjent for å være ikke-variable i subtilisiner hvor sekvensen er kjent. Fig. 2 heri viser konserverte residier mellom B.

amyloliquefaciens subtilisin og *B. lentus* subtilisin. Etter oppstilling av konserverte residier ved å muliggjøre nødvendige innskudd og delesjoner for å opprettholde oppstilling (dvs. unngåelse av eliminering av konserverte residier gjennom tilfeldig delesjon og innskudd), blir residier som er ekvivalente med bestemte aminosyrer i den primære sekvensen til *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin definert. Oppstilling av konserverte residier bør fortrinnsvis konservere 100% av slike residier. Oppstilling av mer enn 70% eller så lite som 50% av konserverte residier er også tilstrekkelig for å definere ekvivalente residier. Konservering av den katalytiske triaden Asp32/His64/Ser221, bør bli opprettholdt.

10

I fig. 3 er for eksempel aminosyresekvensen til subtilisin fra *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* (carlsbergensis) og *Bacillus lentus* oppstilt for å oppnå maksimal mengde homologi mellom aminosyresekvensene. En sammenligning av disse sekvensene viser at det er mange konserverte residier innbefattet i hver sekvens. Disse konserverte residiene (som mellom BPN' og *B. lentus*) er identifiserte i fig. 2.

15

Disse konserverte residiene kan følgelig bli anvendt for å definere de tilsvarende ekvivalente aminosyreresidiene til *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin i andre karbonylhydrolaser så som subtilisin fra *Bacillus lentus* (PCT Publication No. WO89/06279 publisert juli 13, 1989), foretrukket subtilisin forløperenzym heri, eller subtilisin referert til som PB92 (EP 0 328 299), som er meget homolog med foretrukket *Bacillus lentus* subtilisin. Aminosyresekvensene til visse av disse subtilisinene er oppstilt i figurene 3A og 3B med sekvensen til *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin for å produsere maksimal homologi av konserverte residier. Som det fremgår er et antall delesjoner i sekvensen til *Bacillus lentus* sammenlignet med *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin. Den ekvivalente aminosyren for Val1165 i *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin i andre subtilisiner er isoleucin for *B. lentus* og *B. licheniformis*.

20

25

Aminosyren i posisjon +76 er asparagin (N) i både *B. amyloliquefaciens* og *B. lentus* subtilisiner. I subtilisinvarianten ifølge oppfinnelsen er aminosyren ekvivalent med +76 i *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin substituert med aspartat (D). En sammenligning av visse aminosyreresidier identifisert heri for substitusjon versus den mest foretrukne substitusjonen for hver slik posisjon er gitt i tabell I som illustrasjon.

30

TABELL I

	<u>+76</u>	<u>+99</u>	<u>+101</u>	<u>+103</u>	<u>+104</u>	<u>+107</u>	<u>+123</u>
5 B. amyloliquefaciens (vill-type)	N	D	S	Q	Y	I	N
B. lentus (vill-type)	N	S	S	S	V	I	N
10 Mest foretrukket substitusjon	D	D	R	A	I/Y	V	S

Ekvivalente residier kan også bli definert ved å bestemme homologien på tertiær  
strukturnivå for en forløper karbonylhydrolase hvor den tertiære strukturen er blitt  
bestemt ved røntgen krystallografi. Ekvivalente residier blir definert som de hvor  
15 atomiske koordinater til to eller flere av hovedkjedeatomene til et bestemt  
aminosyreresidie til forløperen karbonylhydrolase og *Bacillus amyloliquefaciens*  
subtilisin (N på N, CA på CA, C på C og O på O) er innenfor 0,13 nm og fortrinnsvis  
0,1 nm etter oppstilling. Oppstillingen blir oppnådd etter at den beste modellen er blitt  
orientert og posisjonert for å gi maksimal overlappning av atomiske koordinater til ikke-  
20 hydrogen proteinatomene til karbonylhydrolase for *Bacillus amyloliquefaciens*  
subtilisin. Den beste modellen er krystallografisk modell med lavest R faktor for  
eksperimentelle diffraksjonsdata ved høyest tilgjengelig resolusjon.

$$25 \quad R \text{ faktor} = \frac{\sum_h |F_o(h)| - |F_c(h)|}{\sum_h |F_o(h)|}$$

Ekvivalente residier som er funksjonelle analoger til et spesifikt residie av *Bacillus*  
*amyloliquefaciens* subtilisin er definert som de aminosyrene til forløper  
30 karbonylhydrolaser som kan innta en konformasjon slik at de enten endrer, modifierer  
eller bidrar til proteinstrukturen, substratbinding eller katalyse på en måte som blir  
definert og innhas av et spesifikt residie av *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin. De  
utgjør de residiene av forløper karbonylhydrolase (hvor en tertiær struktur er blitt  
oppnådd ved røntgenkrystallografi) som okkuperer en analog posisjon i den grad at, til  
35 tross for hovedkjedeatomene til det gitte residiet ikke behøver å tilfredsstille ekvivalens  
kriteriene på grunnlag av okkupering av en homolog posisjon, de atomiske koordinatene  
til minst to av sistkjedeatomene til residiet ligger innenfor 0,13 nm av tilsvarende

sidekjedeatomer til *Bacillus amyloliquefaciens subtilisin*. Koordinatene til den tredimensjonale strukturen til *Bacillus amyloliquefaciens subtilisin* er angitt i EPO søknad nr. 0.251.446 (tilsvarende US-patentsøknad SN 08/212.291) og kan bli anvendt som beskrevet ovenfor for å bestemme ekvivalente residier på tertiært strukturnivå.

5

Noen av residiene identifisert for substitusjon er konserverte residier mens andre er ikke dette. Når det gjelder residier som ikke er konserverte er erstatning av en eller flere aminosyrer begrenset til substitusjoner som produserer en variant som har en aminosyresekvens som ikke tilsvarer det som finnes i naturen. Når det gjelder

10 konserverte residier bør slike erstatninger ikke resultere i en naturlig-forekommende sekvens. Karbonylhydrolasevarianter ifølge foreliggende oppfinnelse innbefatter de modne formene av karbonylhydrolase varianter, samt pro- og prepro-formene til slike hydrolase varianter. Prepro-formene er foretrukket konstruksjon siden dette letter ekspresjonen, sekresjon og modning av karbonylhydrolase variantene.

15

"Prosekvens" refererer til en sekvens av aminosyrer bundet til den N-terminale delen av den modne formen til en karbonylhydrolase som når fjernet resulterer i fremkomst av den "modne" formen av karbonylhydrolase. Mange proteolytiske enzymer finnes i naturen som translasjonsproenzymprodukter og, i fravær av post-translasjonell

20 prosessering, blir uttrykt på denne måten. En foretrukket prosekvens for produksjon av karbonylhydrolasevarianter, spesielt subtilisin varianter, er den antatte prosekvensen til *Bacillus amyloliquefaciens subtilisin*, til tross for at andre subtilisin prosekvenser kan bli anvendt. I eksempel 1 og 2 ble den antatte prosekvensen fra subtilisin fra *Bacillus lentus* (ATCC 21536) anvendt.

25

En "signalsekvens" eller "presekvens" refererer til en hvilke som helst sekvens av aminosyrer bundet til den N-terminale delen av en karbonylhydrolase eller til den N-terminale delen av en prohydrolase som kan delta i utskillelse av modne eller proformer av hydrolasen. Denne definisjonen av signalsekvensen er funksjonell og ment å

30 innbefatte alle de aminosyresekvensene som blir kodet av den N-terminale delen av subtilisin genet eller andre utskillbare karbonylhydrolaser som deltar i effektueringen av utskillelse av subtilisin eller andre karbonylhydrolaser under native betingelser.

Foreliggende oppfinnelse anvender slike sekvenser for å oppnå sekresjon av

karbonylhydrolase varianter som definert heri. En foretrukket signalsekvens anvendt i

35

eksemplene omfatter de første 7 aminosyreresidene til signalsekvensen fra *Bacillus subtilis subtilisin* koblet til det gjenværende av signalsekvensen til subtilisin fra *Bacillus lentus* (ATCC 21536).

En "prepro" form av en karbonylhydrolasevariant består av den modne formen av hydrolase med en prosekvens operabelt koblet til aminotermi- nusen til hydrolase og en "pre" eller "signalsekvens" operabelt koblet til aminotermi- nusen til prosekvensen.

5

"Ekspresjonsvektor" refererer til en DNA konstruksjon inneholdende en DNA sekvens som er operabelt koblet til en egnet kontrollsekvens med evne til å oppnå ekspresjon av nevnte DNA i en egnet vert. Slike kontrollsekvenser innbefatter en promoter for å oppnå transkripsjon, en valgfri operatorsekvens for å kontrollere slik transkripsjon, en sekvens  
10 kodende for egnede mRNA ribosom bindingssteder og sekvenser som kontrollerer terminering av transkripsjon og translasjon. Vektoren kan være et plasmid, en fagpartikkel eller bare et potensielt genomisk innskudd. Når transformert inn i en egnet vert kan vektoren replikere og virke uavhengig av vertsgenomet, eller kan i noen tilfeller bli integrert inn i selve genomet. I foreliggende beskrivelse blir "plasmid" og "vektor"  
15 noen ganger anvendt om hverandre i det plasmid er den mest vanlige anvendte formen av vektoren. Oppfinnelsen kan også innbefatte slike andre former for ekspresjonsvektorer som har tilsvarende funksjoner og som er kjent innenfor fagområdet.

20 "Vertsceller" anvendt i foreliggende oppfinnelse omfatter generelt prokaryote eller eukaryote verter som fortrinnsvis er blitt manipulert ifølge fremgangsmåtene beskrevet i US-PS 4.760.025 (RE 34.606) for å forandre de slik at de ikke kan utskille enzymatisk aktiv endoprotease. En foretrukket vertscelle for uttrykking av subtilisin er Bacillus stammen BG2036 som mangler enzymatisk aktiv nøytral protease og alkalisk protease  
25 (subtilisin). Konstruksjon og stamme BG2036 er beskrevet i detalj i US-PS 5.264.366. Andre vertsceller for uttrykking av subtilisin innbefatter Bacillus subtilis I168 (også beskrevet i US-PS 4.760.025 (RE 34.606) og US-PS 5.264.366), samt en hvilken som helst egnet Bacillus stamme så som B. licheniformis, B. lentus, osv.

30 Vertscellene blir transformert eller transfektert med vektorer konstruert ved anvendelse av rekombinante DNA teknikker. Slike transformerte vertsceller har evne til å enten replikere vektorer kodende for karbonylhydrolase varianter eller uttrykke ønsket karbonylhydrolase variant. Når det gjelder vektorer som koder for pre- eller preproformen av karbonylhydrolase varianten blir slike varianter når de blir uttrykt  
35 vanligvis utskilt fra vertscellen og inn i vertscellemediet.

"Operabelt koblet" betyr når det beskrives forholdet mellom to DNA regioner at de er funksjonelt relaterte til hverandre. En presekvens er for eksempel operabelt koblet til et peptid dersom den virker som en signalsekvens som deltar i sekresjonen av den modne formen av proteinet som oftest innbefatter spaltning av signalsekvensen. En  
5 promoter er operabelt koblet til en kodende sekvens dersom den kontrollerer transkripsjonen av sekvensen. Et ribosom bindingssete er operabelt koblet til en kodende sekvens dersom den er posisjonert slik at den muliggjør translasjon.

Gener kodende for naturlig-forekommende forløperkarbonylhydrolase kan bli oppnådd i  
10 henhold til de generelle fremgangsmåtene kjent for fagfolk innenfor dette området. Fremgangsmåtene omfatter generelt syntetisering av merkede prober som har antatte sekvenser kodende for regionene til hydrolasen av interesse, fremstilling av genomiske bibliotek fra organismer som uttrykker hydrolasen og screening av bibliotekene for genet av interesse ved hybridisering til probene. Positivt hybridiserende kloner blir  
15 deretter kartlagt og sekvensert. B. lentus genet anvendt i eksemplene ble klonet som beskrevet i eksempel 1 i US-PS 5.185.258. BPN' genet anvendt i eksempel 5 ble klonet som beskrevet i eksempel 1 i RE 34.606.

Klonet karbonylhydrolase blir deretter anvendt for å transformere en vertscelle for å  
20 uttrykke hydrolasen. Hydrolasegenet blir deretter ligert inn i et høy kopianntall plasmid. Dette plasmidet replikerer i vertene ved at det inneholder velkjente elementer nødvendige for plasmid replikasjon: en promoter operabelt koblet til gjeldende gen (som kan bli tilført som genets egen homologe promoter hvis den blir gjenkjent, dvs. transkribert, av verten), en transkripsjonsterminerings- og polyadenyleringsregion  
25 (nødvendig for stabiliteten til mRNA transkribert av verten fra hydrolasegenet i visse eukaryote vertsceller) som er eksogen eller blir tilført av endogen terminatorregion til hydrolase genet og kan om ønskelig, et seleksjonsgen så som et antibiotika resistens gen som muliggjør kontinuerlig dyrkningsmessig opprettholdelse av plasmid-infiserte  
30 vertsceller ved vekst i antibiotika-inneholdende medium. Plasmier med høyt kopianntall inneholder også et replikasjonsorigo for verten som derved muliggjør at store antall av plasmider blir dannet i cytoplasma uten kromosomale begrensninger. Det hører inn under rammen heri å integrere mange kopier av hydrolasegenet inn i vertsgenomet. Dette blir oppnådd av prokaryote og eukaryote organismer som er spesielt mottagelige for homolog rekombinasjon. Genene anvendt i foreliggende eksempler er et naturlig B.  
35 lentus gen og et naturlig B. amyloliquefaciens gen. Alternativt kan et syntetisk gen kodende for en naturlig-forekommende eller mutant forløper karbonylhydrolase (subtilisin) bli produsert. En slik metode blir DNA og/eller aminosyresekvensen til

forløperhydrolasen (subtilisin) bestemt. Flere, overlappende syntetiske enkelt trådede DNA fragmenter blir derfor syntetisert og som ved hybridisering og ligering produserer et syntetisk DNA kodende for forløper hydrolasen. Et eksempel på syntetisk genkonstruksjon er angitt i eksempel 3 i US-PS 5.204.015.

5

Når det naturlig-forekommende eller syntetiske forløperkarbonylhydrolasegenet er blitt klonet blir det foretatt et antall modifikasjoner for å fremme anvendelsen av genet utover syntesen av naturlig-forekommende forløper karbonylhydrolase. Slike modifikasjoner innbefatter produksjon av rekombinante karbonylhydrolaser som  
10 beskrevet i US-PS 4.760.025 (RE 34.606) og EPO publikasjonnr. 0.251.446 og produksjon av karbonylhydrolasevarianter beskrevet heri.

Følgende kassett mutagenese metode kan bli anvendt for å lette konstruksjonen og identifikasjonen av karbonylhydrolasevariantene ifølge foreliggende oppfinnelse til tross  
15 for at andre metoder inkludert sete-rettet mutagenese kan bli anvendt. Det naturlig forekommende genet som koder for hydrolase blir oppnådd og sekvensert helt eller delvis. Deretter blir sekvensen scannet for et punkt hvor det er ønskelig å danne en mutasjon (delesjon, innskudd eller substitusjon) av en eller flere aminosyrer i det kodede enzymet. Sekvenser som flankerer dette punktet blir vurdert for tilstedeværelse  
20 av restriksjonsseter for erstatning av et kort segment av genet med en oligonukleotidblanding som når uttrykt vil kode for forskjellige mutanter. Slike restriksjonsseter er fortrinnsvis unike seter innenfor hydrolasegenet for å lette erstatning av gensegmentet. Et hvilket som helst hensiktsmessig restriksjonssete som ikke er i stort overskudd i hydrolasegenet kan bli anvendt forutsatt at genfragmentene som blir dannet  
25 som blir dannet ved restriksjonsspaltning kan bli gjenoppstilt i riktig sekvens. Dersom restriksjonsseter ikke er til stede ved beliggenhetene innenfor en hensiktsmessig avstand fra det valgte punktet (fra 10 til 15 nukleotider), blir slike seter dannet ved substituering av nukleotidene i genet på en slik måte at hverken leserammen eller aminosyrene som blir kodet blir endret i den endelige konstruksjonen. Mutasjon av genet for å forandre  
30 dets sekvens for å være i samsvar med den ønskede sekvensen blir oppnådd ved M13 primer ekstensjon i henhold til generelle kjente metoder. Det å lokalisere egnede flankerende regioner og vurdere nødvendige forandringer for å oppnå to hensiktsmessige restriksjonssetesekvenser blir rutinemessig oppnådd ved flertydigheten til den genetiske koden, et restriksjonsenzymkart av genet og det store antallet  
35 forskjellige restriksjonsenzymmer. Dersom et hensiktsmessig flankerende restriksjonssete er tilgjengelig må ovennevnte metode bare bli anvendt i sammenheng med den flankerende regionen som ikke inneholder et sete.

Når det naturlig forekommende DNA eller syntetiske DNA er klonet blir restriksjonssetene som flankerer posisjonene som skal bli mutert eller spaltet med beslektede restriksjonsenzymmer og en mengde endeterminale komplementære oligonukleotidkassetter blir ligert inn i genet. Mutagenesen blir forenklet ifølge denne metoden på grunn av at alle oligonukleotidene kan bli syntetisert slik at de har samme restriksjonsseter, og ingen syntetiske linkere er nødvendige for å danne restriksjonssetene.

- 10 Som anvendt heri blir den proteolytiske aktiviteten definert som hydrolyseraten til peptidbindingene pr milligram aktivt enzym. Mange velkjente prosedyrer eksisterer for måling av proteolytisk aktivitet (K. M. Kalisz, "Microbial Proteinases", Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, A. Fiechter ed., 1988). I tillegg til forbedret vaske ytelse kan variantenzymene ifølge foreliggende oppfinnelse ha andre modifiserte
- 15 egenskaper så som  $K_M$ ,  $k_{cat}/K_M$  forhold og/eller modifisert substratspesifisitet og/eller modifisert pH aktivitetsprofil og/eller modifisert proteolytisk aktivitet. Disse enzymene kan bli skreddersydd for det bestemte substratet som antas å være tilstede.

- Varianten ifølge foreliggende oppfinnelse kan ha endret proteolytisk aktivitet sammenlignet med forløper karbonylhydrolase på grunn av at økning av en slik aktivitet (nummerisk større) muliggjør anvendelse av enzymet for mere effektiv virkning på et målsubstrat.

- Også av interesse er varinatenzymmer som har endret termisk stabilitet og/eller endret substratspesifisitet sammenlignet med forløperen. Karbonylhydrolasen som skal bli mutert er et subtilisin.

- Utførelsesformer ifølge oppfinnelsen er angitt i eksemplene. Disse innbefatter følgende spesifikke kombinasjoner av substituerte residier: N76D/V104I; N76D/S99D/V104I; N76D/S103A/V104I; N76D/V104I/I107V; N76D/V104Y/I107V og N76D/S101R/S103A/V104I. Også beskrevet i eksemplene er alle mutante kombinasjoner som blir krevd i foreliggende oppfinnelse. Disse substitusjonene blir fortrinnsvis dannet i *Bacillus lentus* (rekombinant eller nativ-type) subtilisin til tross for at substitusjonene kan bli dannet i en hvilken som helst *Bacillus* subtilisin.

- 35 Karbonylhydrolasevariantene ifølge oppfinnelsen er nyttige for å formulere forskjellige detergentsammensetninger. Et antall kjente forbindelser er egnede overflateaktive

midler nyttige i sammensetningene som omfatter karbonylhydrolasemutantene ifølge oppfinnelsen. Disse innbefatter ikke-ioniske, anioniske, kationiske, anioniske eller zwitterioniske detergenter, som beskrevet i US 4.404.128 til Barry J. Anderson og US 4.261.868 til Jiri Flora et al. En egnet detergentformulering er den som er beskrevet i eksempel 7 i US patent 5.204.015. Innenfor fagområdet er det kjent forskjellige formuleringer som kan bli anvendt som rensesammensetninger. I tillegg til typiske rensesammensetninger er det underforstått at subtilisinvariantene ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli anvendt for hvilke som helst formål hvor native eller villtype subtilisiner blir anvendt. Disse variantene kan følgelig bli anvendt, f.eks, i såper som er i stykker eller som er flytende, oppvaskmidler, kontaktlinserenseoppløsninger eller produkter, peptidhydrolyse, avfallsbehandling, tekstilapplikasjoner, som fusjonsspaltningenszymer i proteinproduksjon osv. Variantene ifølge foreliggende oppfinnelse oppviser forsterket ytelse i en detergentsammensetning (sammenlignet med forløperen). Forsterket ytelse i en detergent er definert som økning av rensing av visse enzymsensitive flekker så som gress eller blod, som bestemt ved vurdering etter en standard vaskesyklus.

Subtilisinene ifølge oppfinnelsen kan bli formulert til kjente pulverformige eller flytende detergenter med pH mellom 6,5 og 12,0 ved nivåer på omtrent 0,01 til omtrent 5 vekt-% (fortrinnsvis 0,1 til 0,5 vekt-%). Disse detergentrensesammensetningene kan også innbefatte andre enzymer så som kjente proteaser, amylaser, cellulaser, lipaser eller endoglykosidaser, samt dannelsesstoffer og stabiliserende stoffer.

Tilsetning av subtilisiner ifølge oppfinnelsen til konvensjonelle rensesammensetninger utgjør ikke noen spesielle begrensninger på anvendelsen. En hvilken som helst temperatur og pH egnet for detergenten er følgelig også egnet for foreliggende sammensetninger dersom pH hører inn under ovennevnte område, og temperaturen er under subtilisins denatureringstemperatur. Subtilisiner ifølge oppfinnelsen kan i tillegg bli anvendt i en rensesammensetning uten detergenter, igjen enten alene eller i kombinasjon med dannelsesmidler og stabiliserende midler.

Det følgende skal forklare oppfinnelsen.

**EKSEMPEL 1****Konstruksjon for ekspresjon av GG36 genet i B.subtilisin**

- 5 Kloning og konstruksjon for ekspresjon av subtilisingenet fra *B.lentus* ble utført vesentlig som beskrevet i US patent 5.185.258. Plasmid GGA274 (beskrevet i fig 4 heri) ble ytterligere modifisert på følgende måte som vist i fig 5. PstI setet som ble innført i løpet av konstruksjon av GGA274 plasmidet ble fjernet ved oligonukleotidrettet mutagenese beskrevet nedenfor, med et oligonukleotid som har følgende sekvens:
- 10 5'GAAGCTGCAACTCGTTAAA3' (SEK. ID No. 1). Understreket "A" residiet eliminerer gjenkjenningsssekvensen til restriksjonsenzymet PstI og forandret det tilsvarende aminosyreresidiet fra alanin til treonin i posisjon 274. Treonin i posisjon 274 er villtype-residie som opprinnelig finnes i klonet *B.lentus* subtilisingensekvensene. DNA segmentet som koder for subtilisin ble spaltet ut fra plasmid GGA274 eller derivatene
- 15 derav (GGT274 vist i fig 5) ved EcoRI og BamHI spaltning. DNA fragmentet ble subklonet tilbake i bakteriofag M13-baserte vektorer, så som MP19, for mutagenese. Etter mutagenese ble EcoRI og HindIII spaltning, etterfulgt av kloning, utført for å flytte det muterte subtilisingenet tilbake til et ekspresjonsplasmid som GGA274 for ekspresjon og isolering av muterte subtilisinproteiner.

20

**EKSEMPEL 2****Oligonukleotidrettet mutagenese**

- 25 Oligonukleotidrettet mutagenese ble utført som beskrevet i Zoller, M et al (1983), *Methods Enzymol.*, 100:468-500. Som et eksempel kan nevnes at et syntetisk oligonukleotid av sekvensen 5' GCTGCTCTAGACAATTCG 3' (SEK. ID No. 2) ble anvendt for å forandre aminosyreresidiet ved posisjon 76 fra asparagin (N) til asparaginsyre (D) eller N76D. Understreket "G" og "C" residiene angir forandringer fra villtypegen-
- 30 sekvensen. CA holder leucin i posisjon +76 og forandrer aminosyresekvensen for å introdusere et XbaI gjenkjenningssete til XbaI restriksjonsenzymet (TCTAGA), mens forandringen ved GAC forandrer asparagin ved +76 til aspartat.

- For mutagenese ved posisjonene 99, 101 og 103 og 104 kan forskjellige oligonukleotider bli anvendt avhengig av kombinasjonen av ønskede mutasjoner. For eksempel ble
- 35 et oligonukleotid med sekvensen

5' GTATTAGGGGVGGACGGTCGAGGCGCCAATCAGCTCGATT 3' (SEK. ID No. 3) anvendt for samtidig å danne følgende forandringer: S99D; S101R; S103A og V104I i et enkelt subtilisinmolekyl. Likeledes ble oligonukleotider med sekvensen 5' TCAGGTTCGGTCTCGAGCGTTGCCCAAGGATTG 3' (SEK. ID No. 4) og 5' CACGTTGCTAGCTTGAGTTTAG 3' (SEK ID No. 5) anvendt for å danne henholdsvis I107V og N123S. Igjen angir understrekede residier forandringer fra villtypesekvenser som produserer ønskede forandringer enten i aminosyresekvenser eller restriksjonsenzymgjenkjenningssekvenser.

### 10 EKSEMPEL 3

#### **Proteolytisk aktivitet til subtilisinvariantene**

Ifølge fremgangsmåtene i eksempel 2 ble varianter oppført i tabell III dannet. Den proteolytiske aktiviteten til hver av disse subtilisinvariantene er vist i tabell II. De kinetiske parametrene  $k_{cat}$ ,  $K_M$  og  $k_{cat}/K_M$  ble målt for hydrolyse av syntetisk peptidsubstrat suksinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitroanilid ved anvendelse av metoden beskrevet i P. Bonneau et al, (1991) J. Am. Chem. Soc. Vol. 113, No. 3, side 1030. En liten aliquot av subtilisinvariantstokkoppløsningen ble tilsatt til en 1 cm cuvette inneholdende substrat oppløst i 0,1 M Tris-HCL buffer, pH 8,6 og termostatbehandlet ved 25°C. Reaksjonsprosessen ble fulgt spektrofotometrisk ved registrering av absorbansen av restriksjonsproduktet p-nitroanilin ved 410 nm. Kinetiske parametre ble oppnådd ved anvendelse av en ikke-lineær regresjonsalgoritme for å tilpasse reaksjonshastigheten og produktkonsentrasjonen for hver reaksjon til Michaelis-Menten ligningen.

**Tabell II**

Kinetiske parametre  $k_{cat}$ ,  $K_M$  og  $k_{cat}/K_M$  målt for *Bacillus lentus* Subtilisin og varianter.

5

Enzym	$k_{cat}$ (S <sup>-1</sup> )	$K_M$ (M)	$k_{cat}/K_M$ (S <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )
B-lentus Subtilisin	170	0,00078	2,18x10 <sup>5</sup>
N76D	219	0,0008	2,74x10 <sup>5</sup>
N76D/S99D	88	0,00061	1,44x10 <sup>5</sup>
N76D/S103A	400	0,0014	2,86x10 <sup>5</sup>
N76D/V104I	459	0,0011	4,17x10 <sup>5</sup>
N76D/I107V	219	0,0011	1,99x10 <sup>5</sup>
N76D/N123S	115	0,0018	6,40x10 <sup>4</sup>
N76D/S99D/S101R	146	0,00038	3,84x10 <sup>5</sup>
N76D/S99D/S103A	157	0,0012	1,31x10 <sup>5</sup>
N76D/S99D/V104I	247	0,00097	2,55x10 <sup>5</sup>
N76D/S101R/S103A	405	0,00069	5,90x10 <sup>5</sup>
N76D/S101R/V104I	540	0,00049	1,10x10 <sup>6</sup>
N76D/S103A/V104I	832	0,0016	5,20x10 <sup>5</sup>
N76D/V104I/I107V	497	0,00045	1,10x10 <sup>6</sup>
N76D/V104Y/I107V	330	0,00017	1,90x10 <sup>6</sup>
N76D/V104I/N123S	251	0,0026	9,65x10 <sup>4</sup>
N76D/I107V/N123S	147	0,0035	4,20x10 <sup>4</sup>
N76D/S99D/S101R/S103A	242	0,00074	3,27x10 <sup>5</sup>
N76D/S99D/S101R/V104I	403	0,00072	5,60x10 <sup>5</sup>
N76D/S99D/S103A/V104I	420	0,0016	2,62x10 <sup>5</sup>
N76D/S101R/S203A/V104I	731	0,00065	1,12x10 <sup>6</sup>
N76D/S103A/V104I/N123S	321	0,0026	1,23x10 <sup>5</sup>
N76D/V104I/I107V/N123S	231	0,003	7,70x10 <sup>4</sup>
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I	624	0,00098	6,37x10 <sup>5</sup>
N76D/S99D/S103A/V104I/N123S	194	0,0043	4,51x10 <sup>4</sup>
N76S/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S	311	0,0023	1,35x10 <sup>5</sup>

Resultatene oppført i tabell II indikerer at alle subtilisinvariantene som ble testet har beholdt proteolytisk aktivitet. Detaljerte analyser av dataene viste at den proteolytiske

aktiviteten ble betydelig endret for *Bacillus lentus subtilisin* ved forskjellige kombinasjoner av substitusjoner ved aminosyreresidene ekvivalente med posisjonene 76, 99, 101, 103, 104, 107 og 123 i *Bacillus amyloliquefaciens*.

#### 5 EKSEMPEL 4

##### **Termisk stabilitet til subtilisinvariantene**

En sammenligning av den termiske stabiliteten observert for *Bacillus lentus subtilisin* og variantene ifølge foreliggende oppfinnelse dannet ifølge fremgangsmåten i eksempel 2 er vist i tabell III. Renset enzym, 15 ug/ml i 0,1 M glysin 0,01 % Tween-80 pH 10,0, med eller uten 50 mM CaCl<sub>2</sub> ble tatt aliquoter av i små rør og inkubert ved 10°C i 5 minutter, 10°C til 60°C over 1 minutt, og 60°C i 20 minutter. Rørene ble plassert på is i 10 minutter. Aliquoter fra rørene ble analysert for enzymaktivitet ved tilsetning til 1 cm cuvetter inneholdende 1,2 mM av syntetisk peptidsubtrat suksinyl-L-ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitroanilid oppløst i 0,1 M tris-HCL buffer, termostatbehandlet ved 25°C. Opprinnelig lineær reaksjonshastighet ble fulgt spektrofotometrisk ved å registrere absorbansen av reaksjonsproduktet p-nitroanilin ved 410 nm som en funksjon av tiden. Data er present som prosent aktivitet før oppvarming. Resultatene oppført i tabell III indikerer at en stor mengde av variantene utviser termisk stabilitet som er sammenlignbar med *Bacillus lentus subtilisin* (24 av 26) i testtilstanden med 50 mM CaCl<sub>2</sub> tilsatt. I testtilstanden uten 50 mM CaCl<sub>2</sub> tilsatt er den store mengden av variantene (19 av 26) betydelig mer stabile enn *Bacillus lentus subtilisin*. Variantene N76D/S99D, N76D/V104I, N76D/S99D/V104I, N76D/S103A/V104I, N76D/V104I/I104I, N76D/V104Y/I107V og N76D/S101R/S103A/V104I er betydelig mer stabile enn den enkeltsubstitusjonsvarianten N76D i testbetingelsen uten tilsatt 50 mM CaCl<sub>2</sub>.

**Tabell III**

Termisk stabilitet målt for *Bacillus lentus* Subtilisin og variantene ved pH 10, 60°C,  
± 50 mM CaCl<sub>2</sub> tilsatt.

5

Enzym	% gjenværende opprinnelig aktivitet	
	- CaCl <sub>2</sub>	+ CaCl <sub>2</sub>
<i>B. lentus</i> Subtilisin	2	96
N76D	34	97
N76D/S99D	49	98
N76D/S103A	26	92
N-76D/V104I	58	98
N76D/I107V	32	96
N76D/N123S	0	97
N76D/S99D/S101R	30	100
N76D/S99D/S103A	36	100
N76D/S99D/V104I	48	97
N76D/S101R/S103A	26	100
N76D/S101R/V104I	38	100
N76D/S103A/V104I	58	100
N76D/V104I/I107V	60	97
N76D/V104Y/I107V	48	74
N76D/V104I/N123S	0	98
N76D/I107V/N123S	16	100
N76D/S99D/S101R/S103A	38	100
N76D/S99D/S101R/V104I	33	100
N76D/S99D/S103A/V104I	38	98
N76D/S101R/S103A/V104I	40	99
N76D/S103A/V104I/N123S	1	98
N76D/V104I/I107V/N123S	3	99
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I	36	99
N76D/S99D/S103A/V104I/N123S	2	95
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S	0	100

**EKSEMPEL 5****Oligonukleotidrettet mutagenese med enkelttrådet DNA templat dannet fra fagmid**5 **A. Konstruksjon av *B.lentus* varianter**

Mutageneseprotokollen var vesentlig den samme som beskrevet ovenfor i eksempel 2. Enkelttrådet DNA templat ble dannet ifølge fagmidmetoden. For å konstruere fagmidvektoren for å danne enkelttrådet DNA templat ble først vektoren pBCDAICAT dannet.

10 Arbeidsskjema for vektorkonstruksjonen er beskrevet i figur 8. Først ble ClaI til ClaI fragmentet kodende for CAT genet fra pC194 plasmid (Horinouchi, S og Weisblum B, J. Bacteriol. 150:8-15, 1982) klonet inn i AccI setet til polylinkerregionen av pUC19 (New England BioLabs, Beverly, MA) for å danne plasmid pUCCHL og EcoRI-DraI 0,6 KB fragmentet fra 5' enden av GG36DAI kodende DNA ble klonet inn i EcoRI og

15 EcoRV setene til pBSKS plasmid (Stratagene Inc, San Diego, CA) for å danne pBC2SK5. Enkelt EcoRI sete til plasmid pBC2SK5 ble eliminert ved EcoRI spaltning, etterfulgt av ifylling av katalysert-bi-T4 DNA polymerase og religert for å danne plasmid pBC2SK-5R som ikke har EcoRI sete. EcoRI-DraI fragmentet som ble klonet inn i pBCSK-5R ble isolert som et PstI-HindIII fragment og klonet inn i PstI-HindIII

20 settet av pUCCHL (del av polylinkeren til pUC19) for å danne plasmid pUCCHL5R. Den kodende sekvensen til GG36DAI genet ble sapltet ut som et EcoRI-BamHI fragment og klonet inn i EcoRI-BamHI setene til pUCCHL5R for å danne pUCCAT. Den større EcoRI-HindIII fragmentet til pUCCAT ble deretter klonet inn i EcoRI og HindIII setene til BS2KS+ for å danne plasmidet pBVDAICAT.

25

For å danne enkelttrådet DNA ble *E.coli* inneholdende pBCDAICAT injisert med fag R408 (oppnådd fra Stratagene, San Diego, CA) ifølge protokollen beskrevet i Russel, M, Kidd, S og Kelley M.R, GENE 45:333-338, 1986. Når enkelttrådet DNA templat var tilgjengelig ble standard mutagenesemetoder som beskrevet ovenfor i eksempel 2 utført.

30 Konstruksjon av visse mutanter er beskrevet i detalj nedenfor.

For konstruksjon av *B.lentus* (GG36) N76D/S103A/V104I/L217H ble et EcoRI-BamHI DNA fragment kodende for GG36 N76D/S103A/V104I anvendt for konstruksjon av pUCCAT (se fig 8) for å danne plasmid pBCDAICAT. Etter at enkelttrådet DNA

35 templat ble dannet ifølge protokollen beskrevet ovenfor ble en mutageneseprimer med følgende sekvens

\* \*\*\* \*\*x ClaI

5' TAT GCC AGC CAC AAC GGT ACT TCG ATG GCT 3' (SEK. ID No. 13)  
 anvendt for å danne L217H. Som angitt ovenfor angir de understrekede residiene  
 nukleotidforandringer som ble utført og x ClaI indikerer at eksisterende ClaI setet ble  
 5 eliminiert etter mutagenesen. Mutageneseprotokollen var som beskrevet i eksempel 2.  
 Etter mutagenese ble plasmid DNA først screenet for eliminering av ClaI sete og kloner  
 som mangler ClaI setet ble utsatt for DNA sekvensanalyser for å verifisere DNA  
 sekvensen som dannet L til H forandringen ved 217ende aminosyreresidie.

10 **B. Konstruksjon av BPN' varianter og deres ekspresjon i B.subtilis**

Konstruksjon av B.amyloliquefaciens (BPN') N76D/Q103A/Y104I/Y217L ble utført på  
 en lignende måte med unntakelse av at dette ble gjort i to påfølgende trinn. N76D ble  
 først ført inn i BPN' Y217L for å danne BPN' N76D/Y217L og en andre mutagenese ble  
 15 utført for å omdanne BPN' N76D/Y217L til BPN' N76D/Q103A/Y104I/Y217L. For å  
 danne enkeltrådet DNA templat for den første mutagenesen ble et EcoRI-BamHI frag-  
 ment kodende for BPN' Y217L subtilisin (avledet fra Y217L plasmid beskrevet i Wells  
 J. et al PNAS, 84, 5167, 1087) anvendt for å konstruere et plasmid pUCCATFNA (se  
 fig 9). pUCCATFNA plasmidet inneholdende BPN' Y217L ble anvendt for å konstruere  
 20 pBCFNACAT plasmid (fig 9). Enkeltrådet DNA ble dannet som beskrevet ovenfor. For  
 å danne BPN' N76D/Y217L ble en oligonukleotidprimer med sekvensen

\* \*\*\* \*\*x XbaI

5' C ACA GTT GCG GCT CTA GAT AAC TCA ATC GGT G 3' (SEK. ID No. 14)  
 25 anvendt for å danne forandringen N76D. Enkeltrådet DNA ble deretter dannet fra  
 pBCFNACAT plasmidet inneholdende BPN' N76D/Y217L (pBCFNACAT plasmidet  
 etter N76D mutagenese) og mutagenese med annet oligonukleotid med sekvensen

\* \*\*\* \*\*x PvuII

30 5' GCT GAC GGT TCC GGC GCT ATT AGT TGG ATC ATT 3' (SEK ID No. 15) for  
 å oppnå BPN' N76D/Q103A/Y104I/Y217L. Alle trinnene involvert i kloningen, enkelt-  
 trådet DNA preparering, mutagenese og screening for mutanter ble utført som beskrevet  
 ovenfor.

35 Ekspresjon av BPN' genet og variantene derav ble oppnådd ved integrering av plasmid  
 DNA (pBCFNACAT inneholdende forskjellige varianter av BPN' genet) direkte inn i en  
 proteasemanglende stamme av Bacillus subtilis som beskrevet i RE 34,606.

Mange varianter ble dannet ifølge teknikkene i eksempel 2 og 5. Kinetikkdata og stabilitetsdata ble dannet for slike varianter. Kinetikkdataene ble dannet ved anvendelse av metodene beskrevet i eksempel 3 og er gitt i tabell IV. Stabilitetsdata ble dannet som beskrevet heri. Resultatene er vist i tabell V.

5

#### **Analyseprosedyre for termisk stabilitet**

Renset enzym ble bufferskiftet inn i 0,1 M glysin pH 10,0, 0,01 % Tween-80 ved applisering av enzymet på en kolonne bestående av Sephadex G-25 ekvilibrert med denne  
10 bufferen og eluering av enzymet fra kolonnen ved anvendelse av samme buffer.

Til et rør inneholdende 0,1 M glysin, 0,01 % Tween-80 pH 10,0 termostatbehandlet ved 60°C ble bufferskiftenzymet tilsatt for å tilveiebringe en sluttenzymkonsentrasjon på 15 ug/ml.

15

Aliquoter ble fjernet fra 60°C inkubasjon ved forskjellige tidspunkter og øyeblikkelig analysert for enzymaktivitet ved tilsetning til en 1 cm cuvette inneholdende 1,2 mM syntetisk peptidsubstrat suksinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitroanilid oppløst i 0,1 M tris-HCL buffer, pH 8,6, termostatbehandlet ved 25°C. Den opprinnelige lineære  
20 reaksjonshastigheten ble fulgt spektrofotometrisk ved registrering av absorbansen av reaksjonsproduktet p-nitroanilin ved 410 nm som en funksjon av tiden.

Halveringstiden, som er lengden av tid nødvendig for 50 % enzyminaktivering, ble bestemt utifra førsteordensplot av reaksjonshastigheten som en funksjon av inkubasjons-  
25 tiden ved 60°C.

Data er presentert i tabell V som prosent av halveringstid bestemt for *Bacillus lentus* subtilisin (GG36) under identiske betingelser.

Tabell IV

Enzym	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{S}^{-1}$ )	$K_{\text{M}}$ (mM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ( $\text{S}^{-1}\text{M}^{-1}$ )
B. lentus subtilisin	170	0.78	2.20E+05
N76D/S103G/V104I*	380	1.4	2.70E+05
N76D/S103A/V104F	730	0.33	2.20E+06
N76D/S103A/V104N	790	2.8	2.80E+05
N76D/S103A/V104S	170	0.83	2.00E+05
N76D/S103A/V104T	370	1.9	2.00E+05
N76D/S103A/V104W	880	0.31	2.80E+06
N76D/S103A/V104Y	690	0.5	1.40E+06
K27R/N76D/V104Y/N123S	500	1.2	4.20E+05
N76D/S101G/S103A/V104I*	620	1.3	4.80E+05
N76D/S103A/V104I/S105A*	550	1.3	4.20E+05
N76D/S103A/V104I/S105D*	440	1.7	2.60E+05
N76D/S103A/V104T/I107A*	120	5.7	2.10E+04
N76D/S103A/V104T/I107L*	310	3.2	9.70E+04
N76D/S103A/V104I/L126A	90	2.2	4.10E+04
N76D/S103A/V104I/L126F	180	1.9	9.50E+04
N76D/S103A/V104I/L126I	100	2.4	4.20E+04
N76D/S103A/V109I/L126V	64	3.2	2.00E+04
N76D/S103A/V104I/S128G*	560	1.7	3.30E+05
N76D/S203A/V104I/S128L*	430	3.8	1.10E+05
N76D/S103A/V104I/L135A	140	0.76	1.80E+05
N76D/S103A/V104I/L135F	390	0.69	5.70E+05
N76D/S103A/V104I/L135I	110	0.73	1.50E+05
N76D/S103A/V104I/L135V	140	0.86	1.60E+05
N76D/S103A/V104I/S156E*	170	2.6	6.50E+04
N76D/S103A/V104I/S166D*	160	3.5	4.60E+04
N76D/S103A/V104I/D197E	510	1.4	3.60E+05
N76D/S103A/V104I/N204A*	530	1.1	4.80E+05
N76D/S103A/V104I/N204G*	580	1.4	4.10E+05
N76D/S103A/V104I/N204C*	370	1.3	2.90E+05
N76/S103A/V104I/P210I*	500	1.2	4.20E+05
N76D/S103A/V104I/L217H*	80	0.63	1.30E+05
N76D/S103A/V104I/M222A	70	3.1	2.30E+04
N76D/S103A/V104I/M222S	80	3.1	2.60E+04
N76D/S103A/V104I/T260P	660	1.5	4.40E+05
N76D/S103A/V104I/S265N	590	1.3	4.50E+05

Tabell IV (fortsettelse)

Enzym	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{S}^{-1}$ )	$K_{\text{M}}$ (mM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ( $\text{S}^{-1}\text{M}^{-1}$ )
K27R/N76D/V104Y/I107V/N123S	220	1.4	1.60E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E	430	1.1	3.90E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C	400	1.1	3.60E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L	440	1.2	3.70E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/S216V	440	1.2	3.70E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S	760	0.98	7.80E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/T260P	410	1.2	3.40E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/T274A	390	1	3.90E+05
N76D/S103A/V104I/L126F/S265N	170	2.1	8.10E+04
N76D/S103A/V104I/S156E/S166D*	40	6.3	6.40E+03
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/G197E	410	0.98	4.20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/N218S	540	0.66	8.20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E/N218S	770	0.79	9.80E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C/N218S	610	0.99	6.20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L/N218S	580	0.78	7.40E+05
K27R/M76D/V104Y/N123S/N218S/T260P	660	1	6.60E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T274A	590	0.89	6.60E+05
K27R/N76D/V104Y/Q109S/N123S/N218S/T274A	520	1	5.20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/D197E/N218S	460	0.65	7.10E+05
<i>B. amyloliquefaciens</i> subtilisin (BPN')	50	0.14	3.60E+05
BFN'-N76D/Y217L*	380	0.46	8.30E+05

\* Disse mutantene dannet ifølge eksempel 5 og alle andre ble dannet ifølge eksempel 2.

Tabell V

Enzym	Termisk stabilitet (% halveringstid av nativt enzym)
B. lentus subtilisin	100
N76D	590
N76D/S99D	840
N76D/S103A	390
N76D/V104I	660
N76D/I107V	710
N76D/N123S	70
N76D/S99D/S101R	610
N76D/S99D/S103A	590
N76D/S99D/V104I	910
N76D/S101R/S103A	930
N76D/S101R/V104I	500
N76D/S103A/V104I	460
N76D/S103G/V104I*	370
N76D/S103A/V104F	480
N76D/S103A/V104N	230
N76D/S103A/V104S	230
N76D/S103A/V104T	370
N76D/S103A/V104W	280
N76D/S103A/V104Y	400
N76D/V104I/I107V	940
N76D/V104Y/I107V	820
N76D/V104I/N123S	80
N76D/I107V/N123S	150
K27R/N76D/V104Y/N123S	100
N76D/S99D/S101R/S103A	570
N76D/S99D/S101R/V104I	1000
N76D/S99D/S103A/V104I	680
N76D/S101G/S103A/V104I*	390
N76D/S101R/S103A/V104I	470
N76D/S103A/V104I/S105A*	360
N76D/S103A/V104I/S105D*	370
N76D/S103A/V104T/I107A*	270
N76D/S103A/V104T/I107L*	230
N76D/S103A/V104I/N123S	110
N76D/V104I/I107V/N123S	220
N76D/S103A/V104I/L126A	270
N76D/S103A/V104I/L126F	950
N76D/S103A/V104I/L126I	410

Tabell V (fortsettelse)

Enzym	Termisk stabilitet (% halveringstid av nativt enzym)
N76D/S103A/V104I/L126V	320
N76D/S103A/V104I/S128G*	640
N76D/S103A/V104I/S128L*	760
N76D/S103A/V104I/L135A	230
N76D/S103A/V104I/L135F	200
N76D/S103A/V104I/L135I	510
N76D/S103A/V104I/L135V	500
N76D/S103A/V104I/S156E*	120
N76D/S103A/V104I/S166D*	590
N76D/S103A/V104I/D197E	460
N76D/S103A/V104I/N204A*	230
N76D/S103A/V104I/N204G*	240
N76D/S103A/V104I/N204C*	500
N76D/S103A/V104I/P210I*	1370
N76D/S103A/V104I/L217H*	60
N76D/S103A/V104I/M222A	520
N76D/S103A/V104I/M222S	490
N76D/S103A/V104I/T260P	490
N76D/S103A/V104I/S265N	360
K27R/N76D/V104Y/I107V/N123S	210
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E	120
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C	110
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L	380
K27R/N76D/V104Y/N123S/S216V	140
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S	270
K27R/N76D/V104Y/N123S/T260P	40
K27R/N76D/V104Y/N123S/T274A	60
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I	590
N76D/S99D/S103A/V104I/N123S	110
N76D/S103A/V104I/L126F/S265N	810
N76D/S103A/V104I/S156E/S166D*	220
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/G197E	90
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/N218S	250
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E/N218S	270
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C/N218S	460
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L/N218S	1400
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T260P	310
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T274A	180
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S	90
K27R/N76D/V104Y/Q109S/N123S/N218S/T274A	230
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/D197E/N218S	240
B. amyloliquefaciens subtilisin (BPN')	100
BPN'-N76D/Y217L*	420

5

\* Disse mutantene ble dannet ifølge eksempel 5 og alle andre i følge eksempel 2.

**EKSEMPEL 6****Ytelsestest ved vasking**

- 5 Ytelsen ved vasking av variantene beskrevet i tidligere eksempler ble vurdert ved å måle fjerning av farge fra EMPA 116 (blod/melk/karbon svart på bomull) kluter (Testfabrics, Inc, Middlesex, NJ 07030).

- 10 Seks EMPA 116 kluter kuttet i stykker på 7 x 11 cm med "pinked" kanter, ble plassert i hver skål av et Model 7243S Terg-O-Tometer (United States Testing Co. Inc. Hoboken, NJ) inneholdene 1000 ml vann, 15 gpg hardhet ( $\text{Ca}^{++}:\text{Mg}^{++}::3:1::\text{w:w}$ ), 7 g detergent, og enzym etter behov. Detergentbasen utgjorde WFK1 detergent fra wfk - Testgewebe GmbH, Adlerstrasse 42, Postfach 13 07 62, D-47759 Krefeld, Tyskland:

Komponent	% sluttformulering
Zeolitt A	25 %
Natriumsulfat	25 %
Natriumkarbonat	10 %
Lineær alkylbensensulfonat	8,8 %
Alkoholetoksyilat (7-8 EO)	4,5 %
Natriumsåpe	3 %
Natriumsilikat	3 %
$\text{SiO}_2:\text{Na}_2\text{O}::3.3:1$	

15

Til denne grunnleggende detergenten ble følgende tilsatt:

Komponent	% sluttformulering
Natriumperboratmonohydrat	13 %
Kopolymer (Sokalan CP5)	4 %
TAED (Mykon ATC Green)	3 %
Enzym	0,05 %
Klargjørende middel (Tinopal AMS-GX)	0,2 %

- 20 Natriumperboratmonohydrat ble oppnådd fra Degussa Corporation, Ridgefield-Park, NJ 07660. Sokalan CP5 ble oppnådd fra BASF Corporation, Parsippany, NJ 07054. Mykon ATC Green (TAED, tetraacetyletylendiamin) ble oppnådd fra Warwick International

Limited, Mostyn, Holywell, Clwyd CH8 9HE, England. Tinopal AMS GX ble oppnådd fra Ciba-Geigy Corporation, Greensboro, NC 27419.

Seks EMPA 116 stykker ble vasket i detergent med enzym i 30 minutter ved 60°C og ble deretter skylt to ganger i 5 minutter hver gang i 1000 ml vann. Enzymene ble tilsatt til sluttkonsentrasjon på 0,05 til 1 ppm for standardkurver, og 0,25 ppm for rutinemessige analyser. Stykkene ble tørket og presset, og refleksjonskoeffisienten fra stykkene ble målt ved anvendelse av L verdien på L\*a\*b\* skalaen til Minolta Chroma Meter, Model CR-200 (Minolta Corporation, Ramsey, NJ 07446). Ytelsen blir rapportert som en prosentandel av ytelsen til B.lentus (GG36) protease og ble beregnet ved å dele mengden av B.lentus (GG36) protease med mengden av variantproteasen som var nødvendig for å gi samme flekkjerningsytelse x 100. Dataene er vist i tabell VI.

15 TABELL VI

Enzym	Vaske ytelse
B. lentus subtilisin	100
N76D	310
N76D/S103A	230
N76D/V104I	130
N76D/I107V	160
N76D/S99D/S101R	370
N76D/S99D/S103A	290
N76D/S101R/S103A	130
N76D/S101R/V104I	300
N76D/S103A/V104I	320
N76D/S103G/V104I	160
N76D/S103A/V104F	210
N76D/S103A/V104N	110
N76D/S103A/V104T	170
N76D/V104I/I107V	210
N76D/S99D/S101R/S103A	220
N76D/S99D/S101R/V104I	140
N76D/S101G/S103A/V104I	170
N76D/S101R/S103A/V104I	150
N76D/S103A/V104I/S105A	170
N76D/S103A/V104T/I107A	120
N76D/S103A/V104T/I107L	110
N76D/S103A/V104I/L126F	110
N76D/S103A/V104I/S128G	280

TABELL VI (fortsettelse)

<b>Enzym</b>	<b>Vaske ytelse</b>
N76D/S103A/V104I/L135I	160
N76D/S103A/V104I/L135V	160
N76D/S103A/V104I/D197E	170
N76D/S103A/V104I/N204A	160
N76D/S103A/V104I/N204G	150
N76D/S103A/V104I/P210I	470
N76D/S103A/V104I/M222A	100
N76D/S103A/V104I/T260P	280
N76D/S103A/V104I/S265N	190

5

**Eksempel 7**Proteasestabiliteten i en flytende detergentformulering

En sammenligning av protease stabiliteten overfor inaktivering i en flytende detergent formulering ble utført for *Bacillus lentus subtilisin* og variantenzymet N76D/S103A/V104I ifølge prosedyren beskrevet heri. Detergent formuleringen anvendt i studien var en kommersielt oppnådd flaske av Tide Ultra liquid lanudry detergent laget i USA av Procter & Gamble Company. Varmebehandling av detergent formuleringen var nødvendig for å inaktivere in situ-proteasen. Dette ble oppnådd ved inkubering av detergenten ved 96°C i en periode på 4,5 timer. Konsentrerte prepareringer av *B. lentus subtilisin* og N76D/S103A/V104I, i området 20 g/liter enzym, ble deretter tilsatt til varme-behandlet Tide Ultra ved rom-temperatur til en sluttkonsentrasjon på 0,3 g/l enzym i detergentformuleringen. Varme-behandlet detergent med protease tilsatt ble deretter inkubert i et vannbad termostatbehandlet ved 50°C. Alikvoter ble fjernet fra inkuberingsrørene etter 0, 24, 46, 76 og 112 timer tidsintervaller og analysert for enzymaktivitet ved tilsetning til en 1 cm kuvette inneholdende 1,2 mM syntetisk peptidsubstrat suc-Ala-Ala-Pro-phe-p-nitroanilid løst opp i 0,1 M tris-HCl buffer, pH 8.6 og termostatbehandlet ved 25°C. Opprinnelig lineær reaksjonshastighet ble fulgt spektrofotometrisk ved registrering av absorbansen til reaksjonsproduktet p-nitroanilin ved 410 nm som en funksjon av tiden. Som vist i fig. 10 ble N76D/S103A/V104I varianten observert å ha en betydelig større stabilitet overfor inaktivering enn nativt *B. lentus* enzym. Beregnede halveringstider for inaktivering i Tide Ultra detergent formuleringen for de to enzymene, under spesifiserte tidsbetingelser, er 45 timer for *B. lentus subtilisin* og 125 timer for N76D/S103A/V104I varianten.

30

I beskrivelsen er det blitt referert til forskjellige aminosyrer ved hjelp av vanlige en- og tre-bokstavkoder. Slike koder er identifisert i Dale, J.W. (1989), Molecular Genetics of Bacteria, John Wiley & Sons, Ltd., Appendix B.

5

**SEKVENSLISTE****(1) GENERELL INFORMASJON:**

- (i) **APPLICANT:** Graycar, Thomas P  
Bott, Richard R  
Wilson, Lori J
- (ii) **TITLE OF INVENTION:** Subtilisin Variants
- (iii) **NUMBER OF SEQUENCES:** 15
- (iv) **CORRESPONDENCE ADDRESS:**
  - (A) **ADDRESSEE:** Genencor International, Inc
  - (B) **STREET:** 180 Kimball Way
  - (C) **CITY:** So. San Francisco
  - (D) **STATE:** CA
  - (E) **COUNTRY:** USA
  - (F) **ZIP:** 94080
- (v) **COMPUTER READABLE FORM:**
  - (A) **MEDIUM TYPE:** Floppy disk
  - (B) **COMPUTER:** IBM PC compatible
  - (C) **OPERATING SYSTEM:** PC-DOS/MS-DOS
  - (D) **SOFTWARE:** PatentIn Release #1.0, Version #1.25
- (vi) **CURRENT APPLICATION DATA:**
  - (A) **APPLICATION NUMBER:**
  - (B) **FILING DATE:** 13-OCT-1994
  - (C) **CLASSIFICATION:**
- (viii) **ATTORNEY/AGENT INFORMATION:**
  - (A) **NAME:** Horn, Margaret A.
  - (B) **REGISTRATION NUMBER:** 33,401
  - (C) **REFERENCE/DOCKET NUMBER:** GC235-2
- (ix) **TELECOMMUNICATION INFORMATION:**
  - (A) **TELEPHONE:** (415) 742-7536
  - (B) **TELEFAX:** (415) 742-7217

10

15

**(2) INFORMASJON FOR SEK ID NO: 1:****(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:****(A) LENGDE: 19 basepar****(B) TYPE: nukleinsyre****(C) TRÅDTYPE: enkel****(D) TOPOLOGI: lineær****(ii) MOLEKYLTYPE: DNA (genomisk)****(xi) SEKVENSBESKRIVELSE FOR SEK ID NO: 1:****GAAGCTGCAA CTCGTAAA**

19

**(2) INFORMASJON FOR SEK ID NO: 2:****(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:****(A) LENGDE: 18 basepar****(B) TYPE: nukleinsyre****(C) TRÅDTYPE: enkel****(D) TOPOLOGI: lineær****(ii) MOLEKYLTYPE: DNA (genomisk)****(xi) SEKVENSBESKRIVELSE FOR SEK ID NO: 2:****GCTGCTCTAG ACAATTCG**

18

**(2) INFORMASJON FOR SEK ID NO: 3:****(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:****(A) LENGDE: 39 basepar****(B) TYPE: nukleinsyre****(C) TRÅDTYPE: enkel****(D) TOPOLOGI: lineær****(ii) MOLEKYLTYPE: DNA (genomisk)****(xi) SEKVENSBESKRIVELSE FOR SEK ID NO: 3:****GTATTAGGGG CGGACGGTCG AGGCGCCATC AGCTCGATT**

39

## (2) INFORMASJON FOR SEK ID NO: 4:

## (i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 33 basepar

(B) TYPE: nukleinsyre

5 (C) TRÅDTYPE: enkel

(D) TOPOLOGI: lineær

## (ii) MOLEKYLTYPE: DNA (genomisk)

## 10 (xi) SEKVENSBESKRIVELSE FOR SEK ID NO: 4:

TCAGGTTCGG TCTCGAGCGT TGCCCAAGGA TTG

33

## (2) INFORMASJON FOR SEK ID NO: 5:

## (i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

15 (A) LENGDE: 22 basepar

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅDTYPE: enkel

(D) TOPOLOGI: lineær

## 20 (ii) MOLEKYLTYPE: DNA (genomisk)

## (xi) SEKVENSBESKRIVELSE FOR SEK ID NO: 5:

CACGTTGCTA GCTTGAGTTT AG

22

## 25 (2) INFORMASJON FOR SEK ID NO: 6:

## (i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 1497 basepar

(B) TYPE: nukleinsyre

30 (C) TRÅDTYPE: enkel

(D) TOPOLOGI: lineær

## (ii) MOLEKYLTYPE: DNA (genomisk)

## (xi) SEKVENSBEKRIVELSE FOR SEK ID NO: 6:

GGTCTACTAA AATATTATTC CATACTATAC AATTAATACA CAGAATAATC TGTCTATTGG 60  
TTATTCTGCA AATGAAAAAA AGGAGAGGAT AAAGAGTGAG AGGCAAAAAA STATGGATCA 120  
GTTTGCTGTT TGCTTTAGCG TTAATCTTTA CGATGGCGTT CGGCAGCACA TCCTCTGCCC 180  
AGGCGGCAGG GAAATCAAAC GGGGAAAAGA AATATATTGT CGGGTTTAAA CAGACAATGA 240  
GCACGATGAG CGCCGCTAAG AAGAAAGATG TCATTTCTGA AAAAGGCGGG AAAGTGCAAA 300  
AGCAATCAA ATATGTAGAC GCAGCTTCAG TCACATTAAG CGAAAAAGCT GTAAAAGAAT 360

TGAAAAAGA CCCGAGCGTC GCTTACGTTG AAGAAGATCA CGTAGCACAT GCGTACGCGC 420  
AGTCCGTGCC TTACGGCGTA TCACAAATTA AAGCCCTGC TCTGCACTCT CAAGGCTACA 480  
CTGGATCAA TGTTAAAGTA GCGGTTATCG ACAGCGGTAT CGATTCTTCT CATCCTGATT 540  
TAAAGGTAGC AAGCGGAGCC AGCATGGTTC CTTCTGAAAC AAATCCTTTC CAAGACAACA 600  
ACTCTCACGG AACTCACGTT GCCGGCACAG TTGCGGCTCT TAATAACTCA ATCGGTGTAT 660  
TAGGCGTTGC GCCAAGCGCA TCACTTTACG CTGTAAGAAT TCTCGGTGCT GACGGTFCGG 720  
GCCAATACAG CTGGATCATT AACGGAATCG AGTGGGCGAT CGCAAACAAT ATGGACGTTA 780  
TTAACATGAG CCTCGGCGGA CCTTCTGGTT CTGCTGCTTT AAAAGCGGCA GTTGATAAAG 840  
CCGTTGCATC CGGCGTCGTA GTCGTTGCGG CAGCCCGTAA CGAAGGCACT TCCGGCAGCT 900  
CAAGCACAGT GGGCTACCCT GGTAATACC CTTCTGTTCAT TGCAGTAGGC GCTGTTGACA 960  
GCAGCAACCA AAGAGCATCT TTCTCAAGCG TAGGACCTGA GCTTGATGTC ATGGCACCTG 1020  
GCGTATCTAT CCAAAGCACG CTTCTGGAA ACAATACGG GCGGTACAAC GGTACGTCAA 1080  
TGGCATCTCC GCACGTTGCC GGAGCGGCTG CTTTGATTCT TTCTAAGCAC CCGAACTGGA 1140  
CAAACACTCA AGTCCGCGAG AGTTTAGAAA ACACCACTAC AAACTTGGT GATTCTTTGT 1200  
ACTATGGAAG AGGGCTGATC AACGTACAAG CGGCAGCTCA GTAAAACATA AAAACCAGGC 1260  
CTTGCCCCCG CCGGTTTTTT ATTATTTTTT TTCCTCCGCA TGTTCAATCC GCTCCATAAT 1320  
CGACGGATGG CTCCCTCTGA AAATTTTAAAC GAGAAACGGC GGGTTGACCC GGCTCAGTCC 1380  
CGTAACGGCC AACTCCTGAA ACGTCTCAAT CGCCGCTTCC CGGTTTCCGG TCAGCTCAAT 1440  
GCCATAACGG TCGGCGGCGT TTTCTGATA CCGGGAGACG GCATTCTGTA TCGGATC 1497

## 5 (2) INFORMASJON FOR SEK ID NO: 7:

## (i) SEKVENS KARAKTERTREKK:

- (A) LENGDE: 275 aminosyrer  
(B) TYPE: aminosyre  
(C) TRÅDTYPE: enkel  
(D) TOPOLOGI: lineær

10

## (ii) MOLEKYLTYP: protein

## (xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEK ID NO: 7:

Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Val Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu  
 1 5 10 15  
 His Ser Gln Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp  
 20 25 30  
 Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asp Leu Lys Val Ala Gly Gly Ala  
 35 40 45  
 Ser Met Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Phe Gln Asp Asn Asn Ser His  
 50 55 60  
 Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly  
 65 70 75 80  
 Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu  
 85 90 95  
 Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu  
 100 105 110  
  
 Trp Ala Ile Ala Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly  
 115 120 125  
 Pro Ser Gly Ser Ala Ala Leu Lys Ala Ala Val Asp Lys Ala Val Ala  
 130 135 140  
 Ser Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Thr Ser Gly  
 145 150 155 160  
 Ser Ser Ser Thr Val Gly Tyr Pro Gly Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala  
 165 170 175  
 Val Gly Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val  
 180 185 190  
 Gly Pro Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr  
 195 200 205  
 Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser  
 210 215 220  
 Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn  
 225 230 235 240  
 Trp Thr Asn Thr Gln Val Arg Ser Ser Leu Glu Asn Thr Thr Thr Lys  
 245 250 255  
 Leu Gly Asp Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala  
 260 265 270  
 Ala Ala Gln  
 275

## 5 (2) INFORMASJON FOR SEK ID NO: 8:

## (i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 275 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(C) TRÅDTYPE: enkel

10

(D) TOPOLOGI: lineær

## (ii) MOLEKYLTYPPE: protein

## (xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEK ID NO: 8:

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

Ser Gly Ile Val Val Ala Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Ser Ser Gly  
 145 150 155 160  
 Ser Thr Ser Thr Val Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Pro Ser Thr Ile Ala  
 165 170 175  
 Val Gly Ala Val Asn Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Ala  
 180 185 190  
 Gly Ser Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr  
 195 200 205  
 Leu Pro Gly Gly Thr Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr  
 210 215 220  
 Pro His Val Ala Gly Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Thr  
 225 230 235 240  
 Trp Thr Asn Ala Gln Val Arg Asp Arg Leu Glu Ser Thr Ala Thr Tyr  
 245 250 255  
 Leu Gly Asn Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala  
 260 265 270  
 Ala Ala Gln  
 275

## 5 (2) INFORMASJON FOR SEK ID NO: 9:

## (i) SEKVENSBESKRIVELSE:

- (A) LENGDE: 274 aminosyrer  
 (B) TYPE: aminosyre  
 (C) TRÅDTYPE: enkel  
 (D) TOPOLOGI: lineær

10

## (ii) MOLEKYLTTYPE: protein

## (xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEK ID NO: 9:

Ala Gln Thr Val Pro Tyr Gly Ile Pro Leu Ile Lys Ala Asp Lys Val  
 1 5 10 15  
 Gln Ala Gln Gly Phe Lys Gly Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp  
 20 25 30  
 Thr Gly Ile Gln Ala Ser His Pro Asp Leu Asn Val Val Gly Gly Ala  
 35 40 45  
 Ser Phe Val Ala Gly Glu Ala Tyr Asn Thr Asp Gly Asn Gly His Gly  
 50 55 60  
 Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asp Asn Thr Thr Gly Val  
 65 70 75 80  
 Leu Gly Val Ala Pro Ser Val Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Asn  
 85 90 95  
 Ser Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Ser Gly Ile Val Ser Gly Ile Glu Trp  
 100 105 110  
 Ala Thr Thr Asn Gly Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Ala  
 115 120 125  
 Ser Gly Ser Thr Ala Met Lys Gln Ala Val Asp Asn Ala Tyr Ala Arg  
 130 135 140  
 Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Asn Ser Gly Ser  
 145 150 155 160  
 Thr Asn Thr Ile Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Asp Ser Val Ile Ala Val  
 165 170 175  
  
 Gly Ala Val Asp Ser Asn Ser Asn Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly  
 180 185 190  
 Ala Glu Leu Glu Val Met Ala Pro Gly Ala Gly Val Tyr Ser Thr Tyr  
 195 200 205  
 Pro Thr Asn Thr Tyr Ala Thr Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro  
 210 215 220  
 His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Leu  
 225 230 235 240  
 Ser Ala Ser Gln Val Arg Asn Arg Leu Ser Ser Thr Ala Thr Tyr Leu  
 245 250 255  
 Gly Ser Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Glu Ala Ala  
 260 265 270  
 Ala Gln

## 5 (2) INFORMASJON FOR SEK ID NO: 10:

## (i) SEKVENSBESKRIVELSE:

- (A) LENGDE: 269 aminosyrer  
 (B) TYPE: aminosyre  
 (C) TRÅDTYPE: enkel  
 (D) TOPOLOGI: lineær

10

## (ii) MOLEKYLTYPEN: protein

## (xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEK ID NO: 10:

Ala Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala  
 1 5 10 15  
 His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp  
 20 25 30  
 Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser  
 35 40 45  
 Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr  
 50 55 60  
 His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu  
 65 70 75 80  
 Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala  
 85 90 95  
  
 Ser Gly Ser Gly Ser Val Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala  
 100 105 110  
 Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser  
 115 120 125  
 Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly  
 130 135 140  
 Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Gly Ser Ile Ser  
 145 150 155 160  
 Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln  
 165 170 175  
 Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile  
 180 185 190  
 Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr  
 195 200 205  
  
 Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala  
 210 215 220  
 Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile  
 225 230 235 240  
 Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu  
 245 250 255  
 Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg  
 260 265

## 5 (2) INFORMASJON FOR SEK ID NO: 11:

## (i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

- (A) LENGDE: 1140 basepar  
 (B) TYPE: nukleinsyre  
 (C) TRÅDTYPE: enkel  
 (D) TOPOLOGI: lineær

10

## (ii) MOLEKYLTYPE: DNA (genomisk)

## (xi) SEKVENNS BESKRIVELSE: SEK ID NO: 11:

```

ATGAAGAAAC CGTTGGGGAA AATTGTGCA AGCACCGCAC TACTCATTTC TGTGCTTTT 60
AGTTCATCGA TCGCATCGGC TGCTGAAGAA GCAAAGAAA AATATTTAAT TGGCTTTAAT 120
GAGCAGGAAG CTGTCACTGA GTTTGTAGAA CAAGTAGAGG CAAATGACGA GGTCCGCTTT 180
CTCTCTGAGG AAGAGGAAGT CGAAATTGAA TTGCTTCATG AATTGAAAC GATTCCTGTT 240
TTATCCGTTG AGTTAAGCCC AGAAGATGTG GACGCGCTTG AACTCGATCC AGCGATTTCT 300
TATATTGAAG AGGATGCAGA AGTAACGACA ATGGCGCAAT CAGTCCCATG GGAATTAGC 360
CGTGTGCAAG CCCCAGCTGC CCATAACCGT GGATTGACAG GTTCTGGTGT AAAAGTTGCT 420
GTCCCTCGATA CAGGTATTTC CACTCATCCA GACTTAAATA TTCGTGGTGG CGCTAGCTTT 480
GTACCAGGGG AACCATCCAC TCAAGATGGG AATGGGCATG GCACGCATGT GSCCGGACG 540
ATTGCTGCTT TAAACAATTC GATTGGCGTT CTTGGCGTAG CGCCGAGCGC GGAACATAAC 600
GCTGTTAAAG TATTAGGGGC GAGCGGTTC GGTTCGGTCA GCTCGATTGC CCAAGGATTG 660
GAATGGGCAG GGAACAATGG CATGCACGTT GCTAATTTGA GTTTAGGAAG CCCTTCGCCA 720
AGTGCCACAC TTGAGCAAGC TOTTAATAGC GCGACTTCTA GAGGCGTTCT TGTGTAGCG 780
GCATCTGGGA ATTCAGGTGC AGGCTCAATC AGCTATCCGG CCCGTTATGC GAACGCAATG 840
GCAGTCGGAG CTA CTGACCA AAACAACAAC CGCGCCAGCT TTTCACAGTA TGGCGCAGGG 900
CTTGACATTG TCGCACCAGG TGTAACCGT GAGAGCACAT ACCCAGGTTT AACGTATGCC 960
AGCTTAAACG GTACATCGAT GGCTACTCCT CATGTTGCAG GTGCAGCAGC CCTTGTTAAA 1020
CAAAGAACC CATCTGGTC CAATGTACAA ATCCGCAATC ATCTAAAGAA TACGGCAACG 1080
AGCTTAGGAA GCACGAACCT GTATGGAAGC GGACTTGTC ATGCAGAAGC GGCAACACGC 1140

```

## 5 (2) INFORMASJON FOR SEK ID NO: 12:

## (i) SEKVENNS KARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 1140 basepar

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅDTYPE: enkel

10 (D) TOPOLOGI: lineær

## (ii) MOLEKYLTTYPE: DNA (genomisk)

15

20

## (xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEK ID NO: 12:

ATGAAGAAAC CGTTGGGGAA AATTGTCGCA AGCACCGCAC TACTCATTTC TGTTGCTTTT 60  
 AGTTCATCGA TCGCATCGGC TGCTGAAGAA GCAAAAGAAA AATATTTAAT TGGCTTTAAT 120  
 GAGCAGGAAG CTGTCAGTGA GTTGTAGAA CAAGTAGAGG CAAATGACGA GGTCGCCATT 180  
 CTCTCTGAGG AAGAGGAAGT CGAATTGAA TTGCTTCATG AATTTGAAAC GATTCCTGTT 240  
 TTATCCGTTG AGTTAAGCCC AGAAGATGTG GACGCGCTTG AACTCGATCC AGCGATTTCT 300  
 TATATTGAAG AGGATGCAGA AGTAACGACA ATGGCGCAAT CAGTGCCATG GGGAATTAGC 360  
 CGTGTGCAAG CCCAGCTGC CCATAACCGT GGATTGACAG GTTCTGGTGT AAAAGTTGCT 420  
 GTCCTCGATA CAGGTATTTC CACTCATCCA GACTTAAATA TTCGTGGTGG CGCTAGCTTT 480  
 GTACCAGGGG AACCATCCAC TCAAGATGGG AATGGGCATG GCACGCATGT GGCCGGGACG 540  
 ATTGCTGCTT TAGACAATC GATTGGCGTT CTTGGCGTAG CGCCGAGCGC GGAACATAC 600  
 GCTGTTAAG TATTAGGGG GAGCGGTCA GCGCCATCA GCTCGATTGC CCAAGGATTG 660  
 GAATGGCAG GGAACAATGG CATGCACGTT GCTAATTTGA GTTTAGGAAG CCCTTCGCCA 720  
 AGTGCCACAC TTGAGCAAGC TGTTAATAGC GCGACTTCTA GAGGCGTTCT TGTTGTAGCG 780  
 GCATCTGGGA ATTCAGGTGC AGGCTCAATC AGCTATCCGG CCCGTTATGC GAACGCAATG 840  
 GCAGTCGGAG CTACTGACCA AAACAACAAC CGCGCCAGCT TTTCACAGTA TGGCGCAGGG 900  
 CTTGACATTG TCGCACCAGG TGTAACGTG CAGAGCACAT ACCCAGGTTT AACGTATGCC 960  
 AGCTTAAACG GTACATCGAT GGCTACTCCT CATGTTGCAG GTGCAGCAGC CCTTGTAAA 1020  
 CAAAAGAACC CATCTTGGTC CAATGTACAA ATCCGCAATC ATCTAAAGAA TACGGCAACG 1080  
 AGCTTAGGAA GCACGAACCTT GTATGGAAGC GGACTTGTC AATGCAGAAGC GGCAACACGC 1140

## 5 (2) INFORMASJON FOR SEK ID NO: 13:

## (i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 30 basepar

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅDTYPE: enkel

10 (D) TOPOLOGI: lineær

## (ii) MOLEKYLTYP: DNA (genomisk)

## (xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEK ID NO: 13:

TATGCCAGCC ACAACGGTAC TTCGATGGCT

30

15

**(2) INFORMASJON FOR SEK ID NO: 14:****(i) SEKVENS KARAKTERTREKK:****(A) LENGDE: 31 basepar****(B) TYPE: nukleinsyre****(C) TRÅDTYPE: enkel****(D) TOPOLOGI: lineær****(ii) MOLEKYLTYPE: DNA (genomisk)****(xi) SEKVENS BESKRIVELSE: SEK ID NO: 14:****CACAGTTGCG GCTCTAGATA ACTCAATCGG T**

31

**(2) INFORMASJON FOR SEK ID NO: 15:****(i) SEKVENS KARAKTERTREKK:****(A) LENGDE: 33 basepar****(B) TYPE: nukleinsyre****(C) TRÅDTYPE: enkel****(D) TOPOLOGI: lineær****(ii) MOLEKYLTYPE: DNA (genomisk)****(xi) SEKVENS BESKRIVELSE: SEK ID NO: 15:****GCTGACGGTT CCGGCGCTAT TAGTTGGATC ATT**

33

P a t e n t k r a v

1.

Subtilisinvariant, k a r a k t e r i s e r t v e d at den har en  
 5 aminosyresekvens, som ikke finnes i naturen, og som er avledet fra et forløpersubtilisin,  
 omfattende substitusjoner som svarer til: N76D/S103A; N76D/V104I; N76D/I107V  
 eller N76D/S99D/S101R fra *B. amyloliquefaciens*-subtilisin, hvor subtilisinvarianten  
 har forbedret vaske ytelse sammenliknet med forløpersubtilisin.

10 2.

Subtilisinvariant ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at  
 subtilisinvariantene omfatter substitusjoner som svarer til: N76D/S99D/S103A;

N76D/S101R/S103A; N76D/S101R/V104I; N76D/S103A/V104I; N76D/S103G/V104I; N76D/S103A/  
 V104F; N76D/S103A/V104N; N76D/S103A/V104T; N76D/V104I/I107V; N76D/S99D/S101R/S103A; N76D/S99D/  
 S101R/V104I; N76D/S101G/S103A/V104I; N76D/S101R/S103A/V109I; N76D/S103A/V104I/S105A; N76D/  
 15 S103A/V104T/I107A; N76D/S103A/V104T/I107L; N76D/S103A/V104I/L126F; N76D/S103A/V104I/S128G; N76D/  
 S103A/V104I/L135I; N76D/S103A/V104I/L135V; N76D/S103A/V104I/D197E; N76D/S103A/V104I/N204A; N76D/  
 S103A/V104I/N204G; N76D/S103A/V104I/P210I; N76D/S103A/V104I/T280P eller N76D/S103A/V104I/S285N  
 fra *B. amyloliquefaciens*-subtilisin.

3.

20 Subtilisinvariant ifølge krav 1 eller krav 2, k a r a k t e r i s e r t  
 v e d at forløpersubtilisinet er et *Bacillus*-subtilisin.

4.

Subtilisinvariant ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at  
 25 forløpersubtilisinet er *Bacillus lentus*-subtilisin.

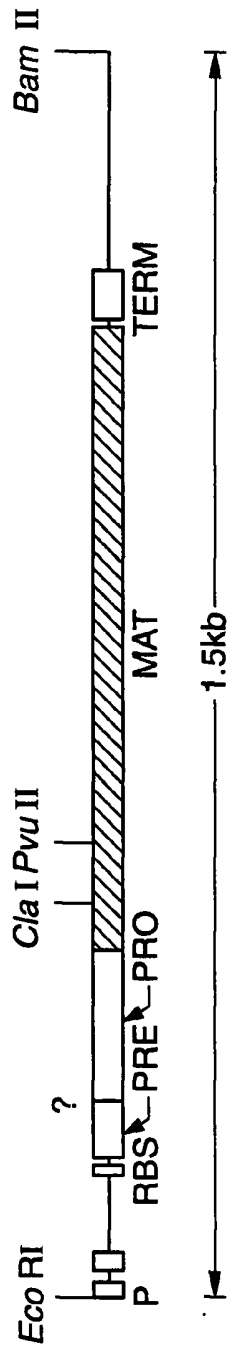
5. DNA, k a r a k t e r i s e r t v e d at det koder for en  
 subtilisinvariant ifølge krav 1 eller krav 2.

30 6.

Ekspresjonsvektor, k a r a k t e r i s e r t v e d at den koder for  
 et DNA ifølge krav 5.

7.

35 Vertcelle, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er transformert  
 med ekspresjonsvektoren ifølge krav 6.



**FIG. 1A**

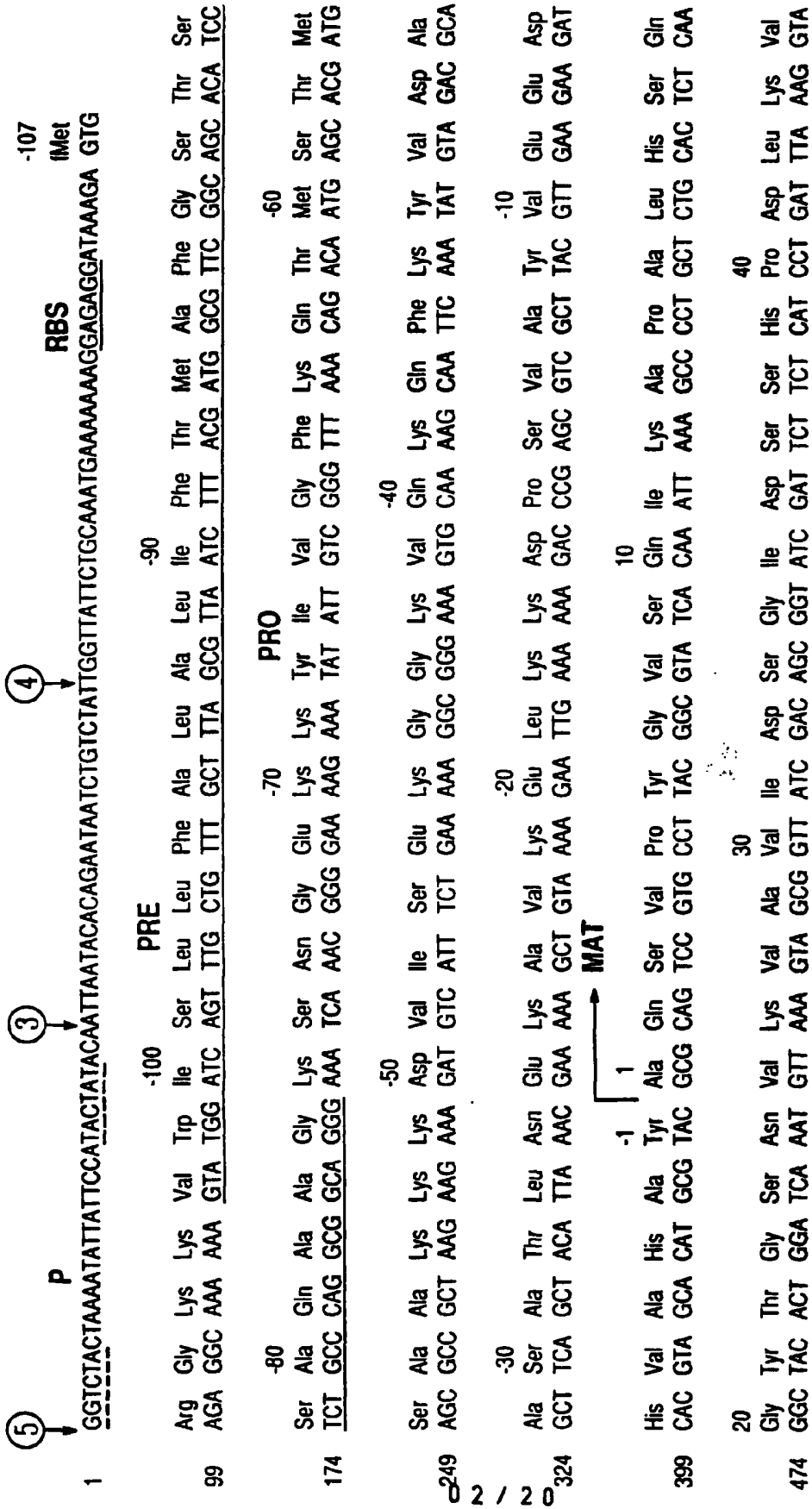


FIG. 1B - 1

50 Ala Gly Gly Ala Ser Met Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Asn Asp 60 Asp Asn Ser His Gly Thr His Val Ala  
 549 GCA GGC GGA GCC AGC ATG GTT CCT TCT GAA ACA AAT CCT TTC CAA GAC AAC AAC TCT CAC GGA ACT CAC GTT GCC

70 Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys  
 624 GGC ACA GTT GCG GCT CTT AAT AAC TCA ATC GGT GTA TTA GGC GTT GCG CCA AGC GCA TCA CTT TAC GCT GTA AAA

80 Ser Ala 90  
 100 Asp Ala 110  
 120 Val Leu CTC GGT GCT GAC Asp Ala 130  
 140 Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro Ser Gly Ser Ala Ala Leu Lys Ala Val Asp Lys Ala Val Ala  
 174 GAC GTT ATT AAC ATG AGC CTC GGC GGA CCT TCT GGT TCT GCT GCT TTA AAA GCG GCA GTT GAT AAA GCC GTT GCA

150 Ser Thr 160  
 170 Ser Gly Val Val Val Val Ala Ala Gly Asn Glu Gly Thr Ser Gly Ser Ser Thr Val Gly Tyr Pro Gly  
 180 TCC GGC GTC GTA GTC GTT GCG GCA GCC GGT AAC GAA GGC ACT TCC GGC AGC TCA AGC ACA GTG GGC TAC CCT GGT

190 Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala Val Gly Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly Pro  
 200 AAA TAC CCT TCT GTC ATT GCA GTA GGC GCT GTT GAC AGC AGC AAC CAA AGA GCA TCT TTC TCA AGC GTA GGA CCT

210 Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly  
 224 GAG CTT GAT GTC ATG GCA CCT GGC GTA TCT ATC CAA AGC ACG CTT CCT GGA AAC AAA TAC GGC GCG TAC AAC GGT

230 Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala Gly Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Thr Asn Thr  
 240 ACG TCA ATG GCA TCT CCG CAC GGT GCC GGA GCG GCT GCT TTG ATT CTT TCT AAG CAC CCG AAC TGG ACA AAC ACT

**FIG. 1B - 2**

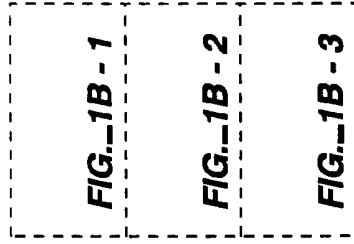
1149 CAA GTC CGC AGC AGT TTA GAA AAC ACC ACT ACA Thr Thr Lys Leu Gly Asp Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn  
 250 Gln Gln Glu Asn Thr Thr Thr Thr Lys Leu Gly Asp Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn  
 260

270 Val Gln Ala Ala Ala Gln OC  
 1224 GTA CAG GCG GCA GCT CAG TAA AACATAAAAAACCGGCCCTGGCCCCCGGGTTTTTATTTTTTCTCCCGCAIGTTCAATCCGGCTCC  
**TERM**

1316 ATAATCGACGGATGGCTCCCTCTGAAAATTTTAACGAGAAACGGCGGTTGACCCGGCTCAGTCCCGTAACGGCCCAAGTCCCTGAAACGCTCAATCGCGG

1416 CTCCCGGTTCCGGICAGCTCAATGCCGTAACGGTCGGCGGGTTTTCCCTGATACCGGGAGACGGCATTGTAATCGGATC

**FIG.\_1B - 3**



**FIG.\_1B**

CONSERVED RESIDUES IN SUBTILISINS FROM  
*BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS*

1	10	20
A Q S V P . G . . . . .	A P A . H . . G	
21	30	40
. T G S . V K V A V . D . G . . . .	H P	
41	50	60
D L . . . G G A S . V P . . . . .	Q D	
61	70	80
. N . H G T H V A G T . A A L N N S I G		
81	90	100
V L G V A P S A . L Y A V K V L G A . G		
101	110	120
S G . . S . L . . G . E W A . N . . . .		
121	130	140
V . N . S L G . P S . S . . . . .	A . .	
141	150	160
. . . . . G V . V V A A . G N . G . . . .		
161	170	180
. . . . . Y P . . Y . . . . .	A V G A .	
181	190	200
D . . N . . A S F S . . G . . L D . . A		
201	210	220
P G V . . Q S T . P G . . Y . . . .	N G T	
221	230	240
S M A . P H V A G A A A L . . . .	K . . . .	
241	250	260
W . . . Q . R . . L . N T . . . .	L G . . . .	
261	270	
. . Y G . G L . N . . A A . . . .		

COMPARISON OF SUBTILISIN SEQUENCES FROM:

*B. amyloliquefaciens*

*B. subtilis*

*B. licheniformis*

*B. lentus*

01	A	Q	S	V	P	Y	G	V	S	Q	I	K	A	P	A	L	H	S	Q	G	Y	T	G	S	N	V	K	V	A	V	I	D	S	G	I	D	S	S	H	P						
	A	Q	S	V	P	Y	G	V	S	Q	I	K	A	P	A	L	H	S	Q	G	Y	T	G	S	N	V	K	V	A	V	I	D	S	G	I	D	S	S	H	P						
	A	Q	T	V	P	Y	G	V	S	Q	I	K	A	D	K	V	Q	A	Q	G	F	K	G	A	N	V	K	V	A	V	L	D	T	G	I	Q	A	S	H	P						
	A	Q	S	V	P	W	G	V	S	R	V	Q	A	P	A	H	N	R	G	L	T	G	S	G	V	K	V	A	V	L	D	T	G	I	S	T	*	H	P							
41	C	D	L	K	V	A	G	G	A	S	M	V	P	S	E	T	N	P	F	Q	D	N	N	S	H	G	T	H	V	A	G	T	V	A	A	L	N	N	S	I	G					
	D	L	N	V	R	G	G	A	S	F	V	P	S	E	T	N	P	Y	Q	D	G	S	S	H	G	T	H	V	A	G	T	I	A	A	L	N	N	S	I	G						
	D	L	N	V	V	G	G	A	S	F	V	P	A	G	E	A	Y	N	*	T	D	G	N	G	H	G	T	H	V	A	G	T	V	A	A	L	N	N	S	I	G					
	D	L	N	I	R	G	G	A	S	F	V	P	G	E	*	P	S	T	Q	D	G	N	G	H	G	T	H	V	A	G	T	I	A	A	L	N	N	S	I	G						
81	V	L	G	V	A	P	S	A	S	L	Y	A	V	K	V	L	G	A	D	G	S	G	Q	Y	S	W	I	I	N	G	I	E	W	A	I	A	N	N	M	D						
	V	L	G	V	S	P	S	A	S	L	Y	A	V	K	V	L	D	S	T	G	S	G	Q	Y	S	W	I	I	N	G	I	E	W	A	I	S	N	N	M	D						
	V	L	G	V	A	P	S	V	S	L	Y	A	V	K	V	L	N	S	S	G	S	G	Y	S	G	I	V	S	G	I	E	W	A	T	N	G	M	D								
	V	L	G	V	A	P	S	A	E	L	Y	A	V	K	V	L	G	A	S	G	S	G	S	V	S	I	A	Q	G	L	E	W	A	G	N	N	G	M	H							
121	V	I	N	M	S	L	G	G	P	S	G	S	A	A	L	K	A	A	V	D	K	A	V	A	S	G	V	V	V	A	A	A	A	A	A	G	N	E	G	T	S	G				
	V	I	N	M	S	L	G	G	P	T	G	S	T	A	L	K	T	V	V	D	K	A	V	S	S	G	I	V	V	A	A	A	A	A	A	A	A	G	N	E	G	S	S	G		
	V	I	N	M	S	L	G	G	A	S	G	S	T	A	M	K	Q	A	V	D	N	A	Y	A	R	G	V	V	V	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	N	S	G	S	G	
	V	A	N	L	S	L	G	S	P	S	A	T	L	E	Q	A	V	N	S	A	T	S	R	G	V	L	V	V	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	S	G	N	S	G	A	G	S

FIG.-3A

161 S S S T V G Y P G K Y P S S V I A V G A V D S S N Q R A S F S S V G P E L D V M A  
 S T S T V G Y P A K Y P S S T I A V G A V N S S S N Q R A S F S S A G S E L D V M A  
 S T N T I G Y P A K Y P S S V I A V G A V D S S N S N Q R R A S F S S V G A E L D V M A  
 \* \* \* I S Y P A R Y A N A M A V G A T D Q S S N N R R A S F S S Q Y G A C L D I V A

201 P G V S I Q S T L P G N K Y G A Y N G T S M A S P H V A G A A L I L S K H P N  
 P G V S I Q S T L P G N K Y G A Y N G T S M A S P H V A G A A L I L S K H P T  
 P G V S I Q S T L P G N K Y G A Y N G T S M A S P H V A G A A L I L S K H P N  
 P G V S I Q S T L P G N K Y G A Y N G T S M A S P H V A G A A L I L S K H P S

241 W T N T Q V R S S L E N T T T K L G D S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q  
 W T N A Q V R S S L E S T T A T Y L L G N S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q  
 L S A S Q V R R N R H L L S S T N L Y G S G L I N V E A A A T  
 W S N V Q I R R N H L L S S T N L Y G S G L I N V E A A A T

FIG.-3B

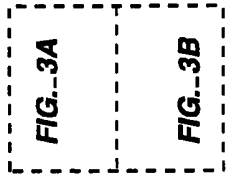
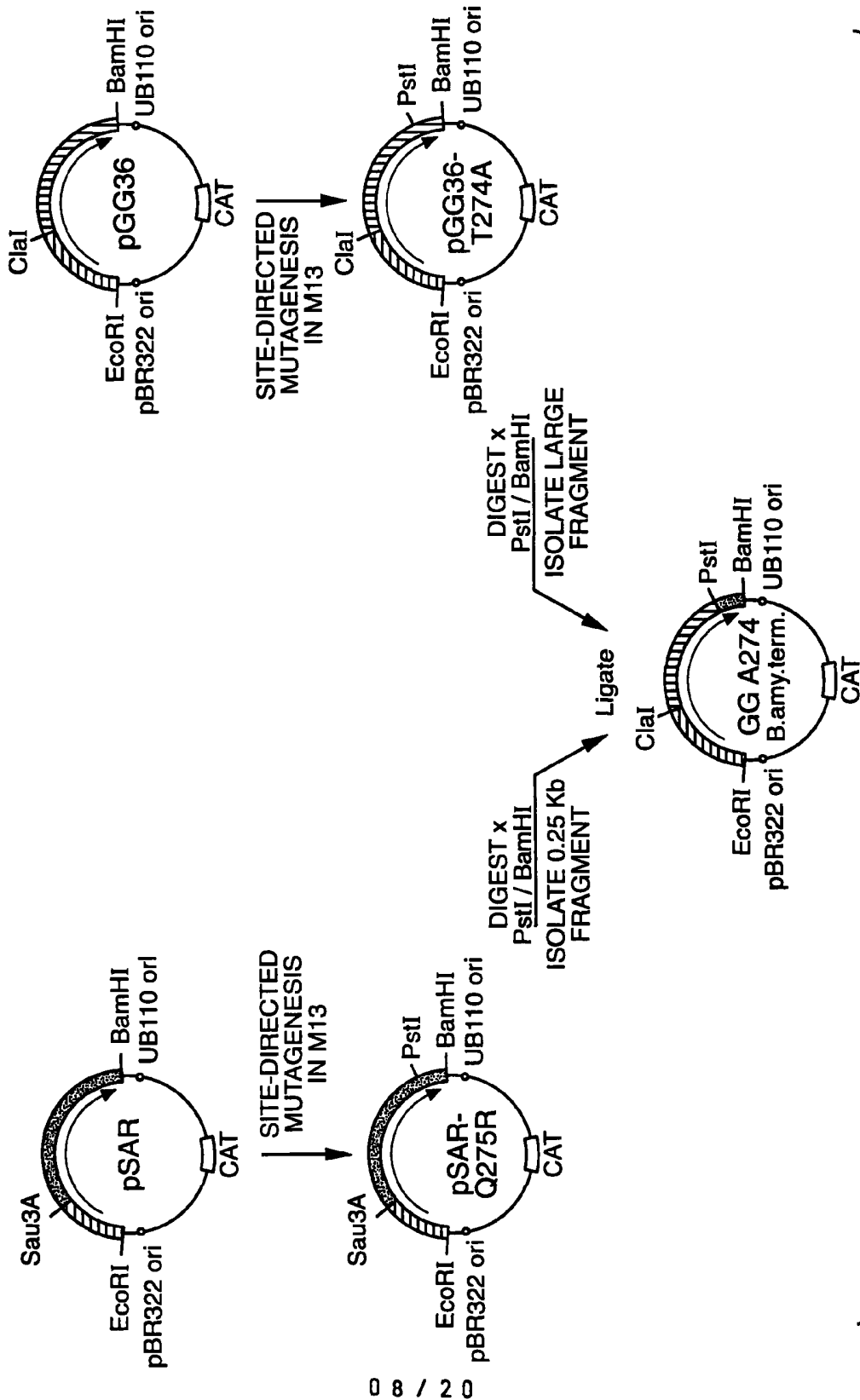


FIG.-3



**FIG. 4**

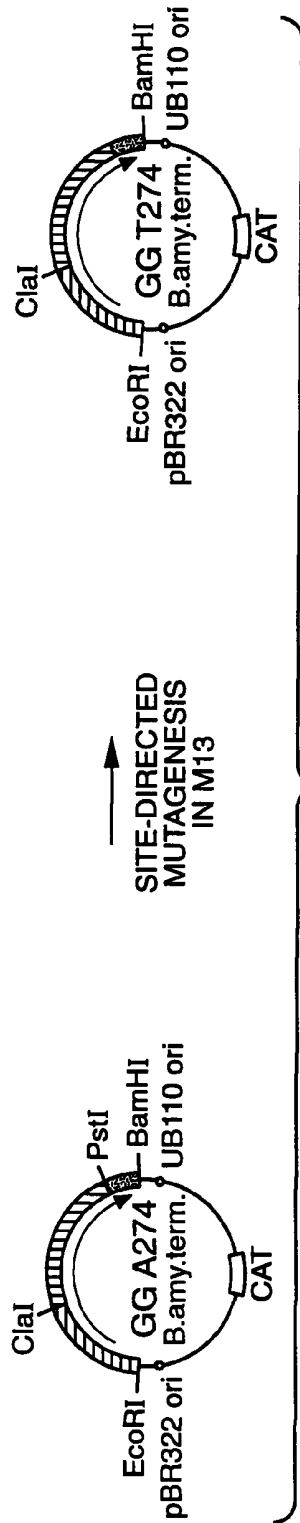


FIG.\_5

10	30	50
ATGAGAAACCGTTGGGAAAATTGTCGCAAGCACCGCACTACTCATTTCTGTGCTTTT		
MetLysLysProLeuGlyLysIleValAlaSerThrAlaLeuLeuIleSerValAlaPhe		
70	90	110
AGTTCATCGATCGCATCGGCTGCTGAAGAGCAAAAGAAAATAATTTAATTGGCTTTAAT		
SerSerSerIleAlaSerAlaAlaGluAlaLysGluLysTyrLeuIleGlyPheAsn		
130	150	170
GAGCAGGAAAGCTGCAGTGAGTTGTAGAACCAAGTAGAGGCAAAATGACGAGGTCGCCATT		
GluGlnGluAlaValSerGluPheValGluGlnValGluAlaAsnAspGluValAlaIle		
190	210	230
CTCTCTGAGGAAAGAGTCGAAATTGAATTGCTTCATGAATTTGAAACGATTCCTGTT		
LeuSerGluGluGluGluValGluIleGluLeuLeuHisGluPheGluThrIleProVal		
250	270	290
TTATCCGTTGAGTTAAGCCAGAGATGTGGACGGCTTGAACCTCGATCCAGCGATTCT		
LeuSerValGluLeuSerProGluAspValAspAlaLeuGluLeuAspProAlaIleSer		
310	330	350
TATATTGAAGAGGATGCAGAGTAACGACAATGGCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGC		
TyrIleGluGluAspAlaGluValThrThrMetAlaGlnSerValProTrpGlyIleSer		
370	390	410
CGTGTCAAGCCCGCTGCCCATAAACCGTGGATTGACAGGTTCTGGTGTAAAGTTGCT		
ArgValGlnAlaProAlaAlaHisAsnArgGlyLeuThrGlySerGlyValLysValAla		

FIG.-6A

430 450 470  
 GTCCTGATACAGGTATTCCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTT  
 ValLeuAspThrGlyIleSerThrHisProAspLeuAsnIleArgGlyAlaSerPhe

490 510 530  
 GTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGACG  
 ValProGlyGluProSerThrGlnAspGlyAsnGlyHisGlyThrHisValAlaGlyThr

550 570 590  
 ATTGCTGCTTTAAACAATTGCGATTGGCGTTCTTGGCGTAGCGCGGAGCGGAACTATAC  
 IleAlaAlaLeuAsnAsnSerIleGlyValLeuGlyValAlaProSerAlaGluLeuTyr

610 630 650  
 GCTGTTAAAGTATTAGGGGAGCGGTTTCAGGTTCCGGTCAGCTCGATTGCCCAAGGATTG  
 AlaValLysValLeuGlyAlaSerGlySerGlySerValSerSerIleAlaGlnGlyLeu

670 690 710  
 GAATGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTTGCTAATTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCCA  
 GluTrpAlaGlyAsnAsnGlyMethHisValAlaAsnLeuSerLeuGlySerProSerPro

730 750 770  
 AGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGAGCGGTTCTTGTGTAGCG  
 SerAlaThrLeuGluGlnAlaValAsnSerAlaThrSerArgGlyValLeuValValAla

790 810 830  
 GCATCTGGGAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCGTTATGCCGAACGCAATG  
 AlaSerGlyAsnSerGlyAlaGlySerIleSerTyrProAlaArgTyrAlaAsnAlaMet

FIG.-6B





430                    450                    470  
 GTCCTGATACAGGTATTCCACTCATCCAGACTTAATAATTCGTGGTGCGCTAGCTTT  
 ValLeuAspThrGlyIleSerThrHisProAspLeuAsnIleArgGlyGlyAlaSerPhe

490                    510                    530  
 GTACCAGGGAAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGACG  
 ValProGlyGluProSerThrGlnAspGlyAsnGlyHisGlyThrHisValAlaGlyThr

550                    570                    590  
 ATTGCTGCTTAGACAACTCGATTGGCGTTCTTGGCGTAGCCGCGGAACTATAC  
 IleAlaAlaLeuAspAsnSerIleGlyValLeuGlyValAlaProSerAlaGluLeuTyr

610                    630                    650  
 GCTGTTAAAGTATTAGGGCGAGCGGTTTCAGGGCCCATCAGCTCGATTGCCCAAGGATTG  
 AlaValIysValLeuGlyAlaSerGlySerGlyAlaIleSerSerIleAlaGlnGlyLeu

670                    690                    710  
 GAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTTGCTAATTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCCA  
 GluTrpAlaGlyAsnAsnGlyMethHisValAlaAsnLeuSerLeuGlySerProSerPro

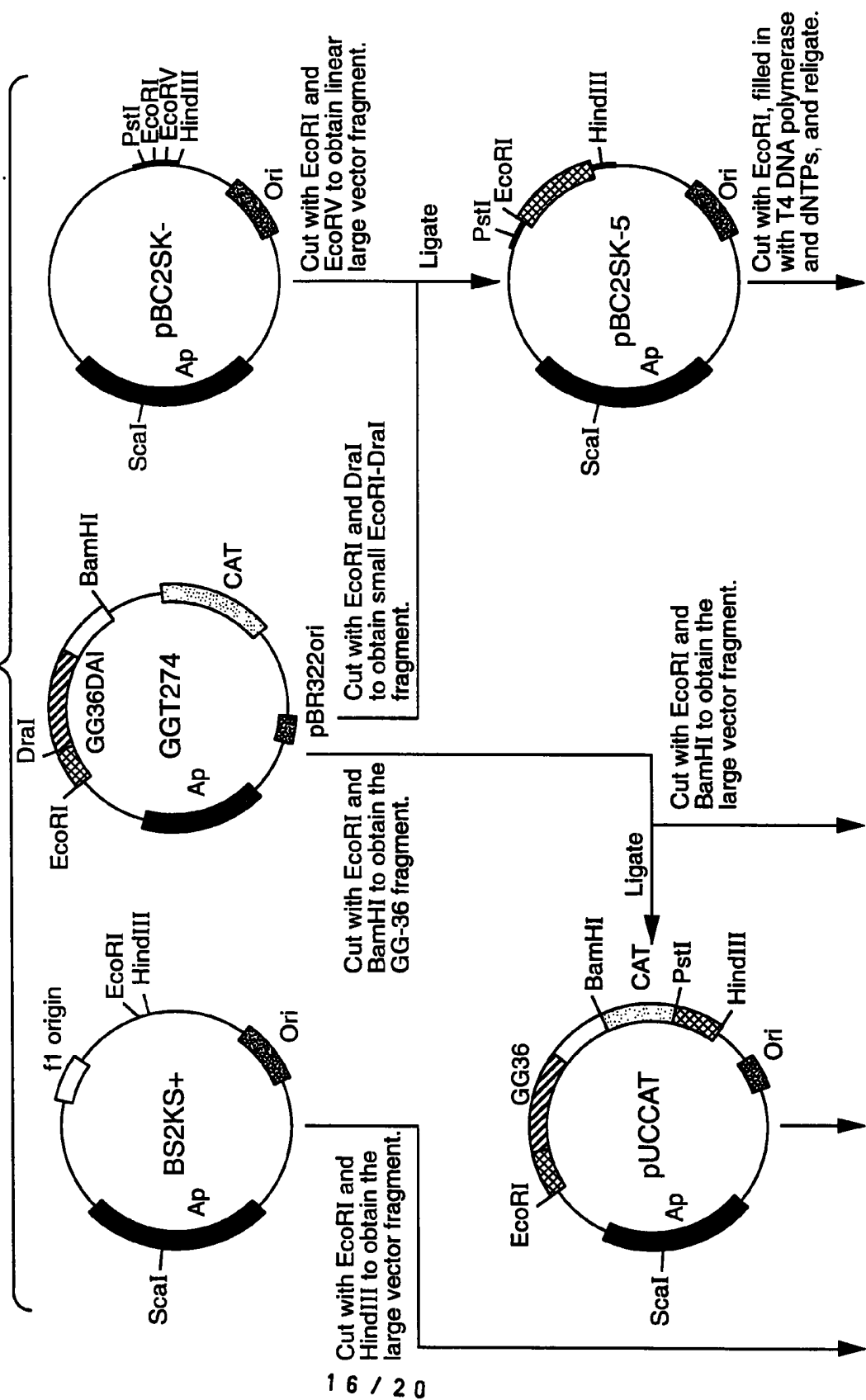
730                    750                    770  
 AGTGCCCACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGAGCGGTTCTTGTGTAGCG  
 SerAlaThrLeuGluGlnAlaValAsnSerAlaThrSerArgGlyValLeuValValAla

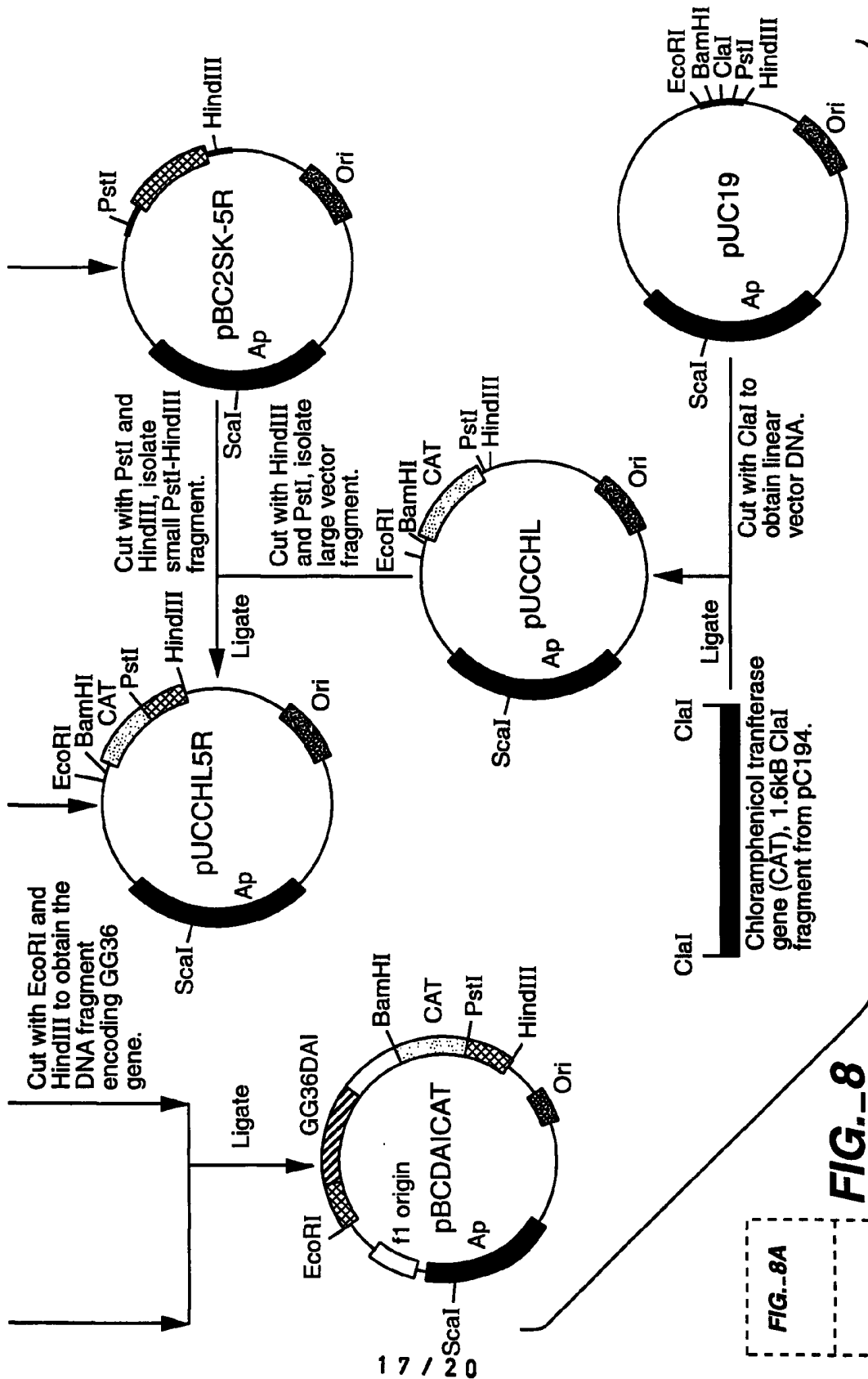
790                    810                    830  
 GCATCTGGGAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCGTTATGCGAACCGCAATG  
 AlaSerGlyAsnSerGlyAlaGlySerIleSerTyrProAlaArgTyrAlaAsnAlaMet

FIG.-7B



**FIG. 8A**





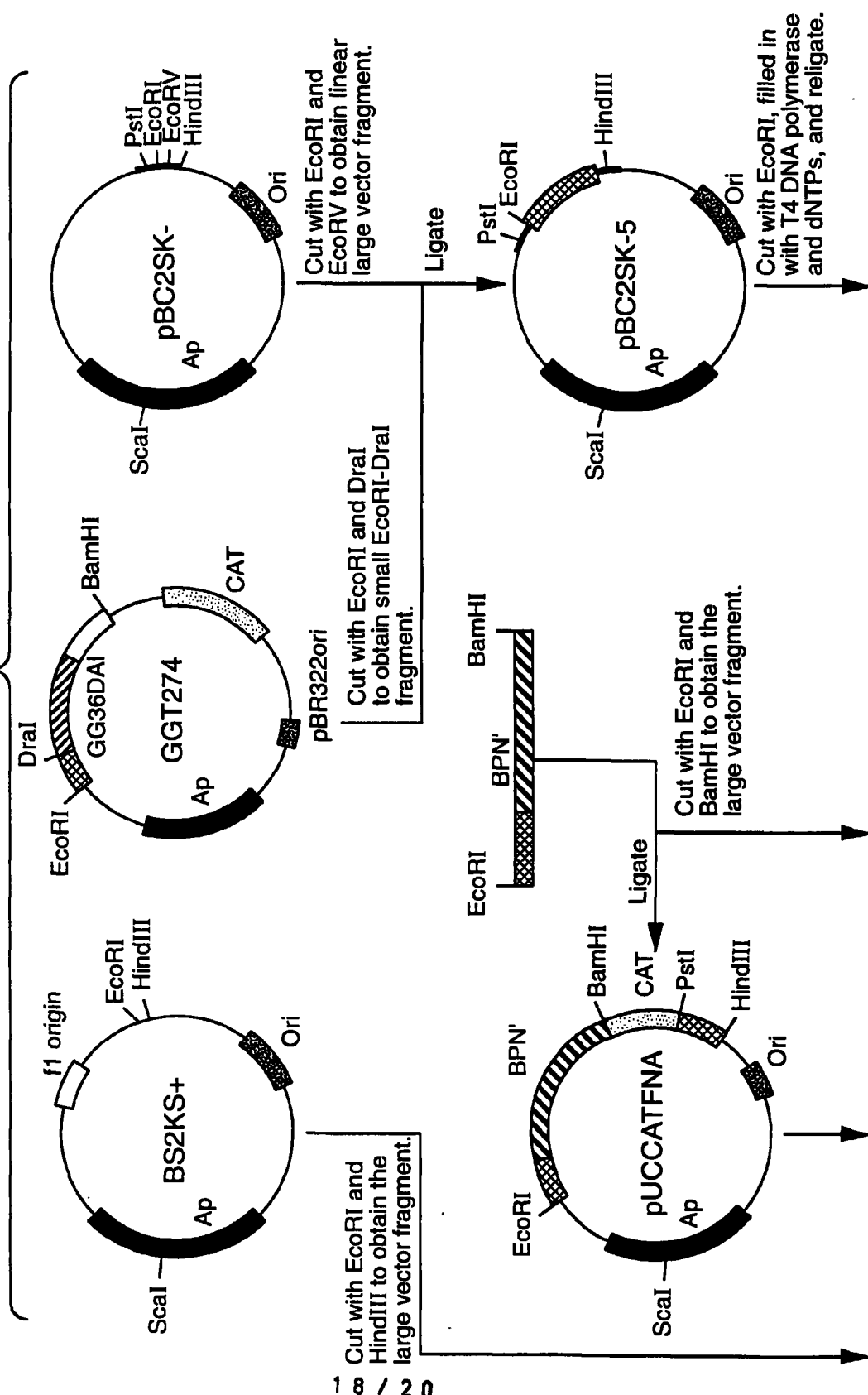
**FIG..8**

**FIG..8B**

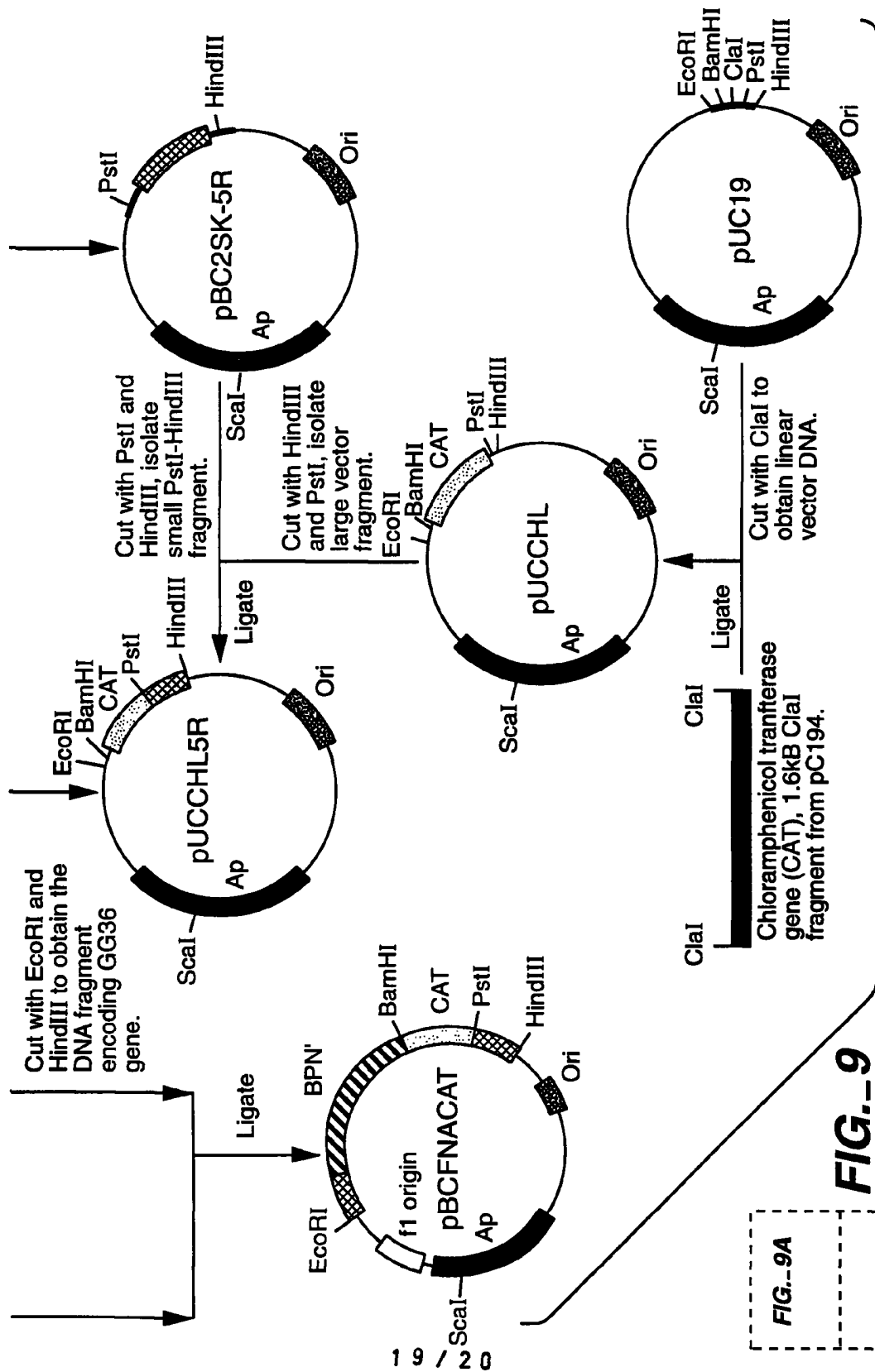
**FIG..8A**

**FIG..8B**

**FIG. 9A**



1  
2  
3  
4  
5

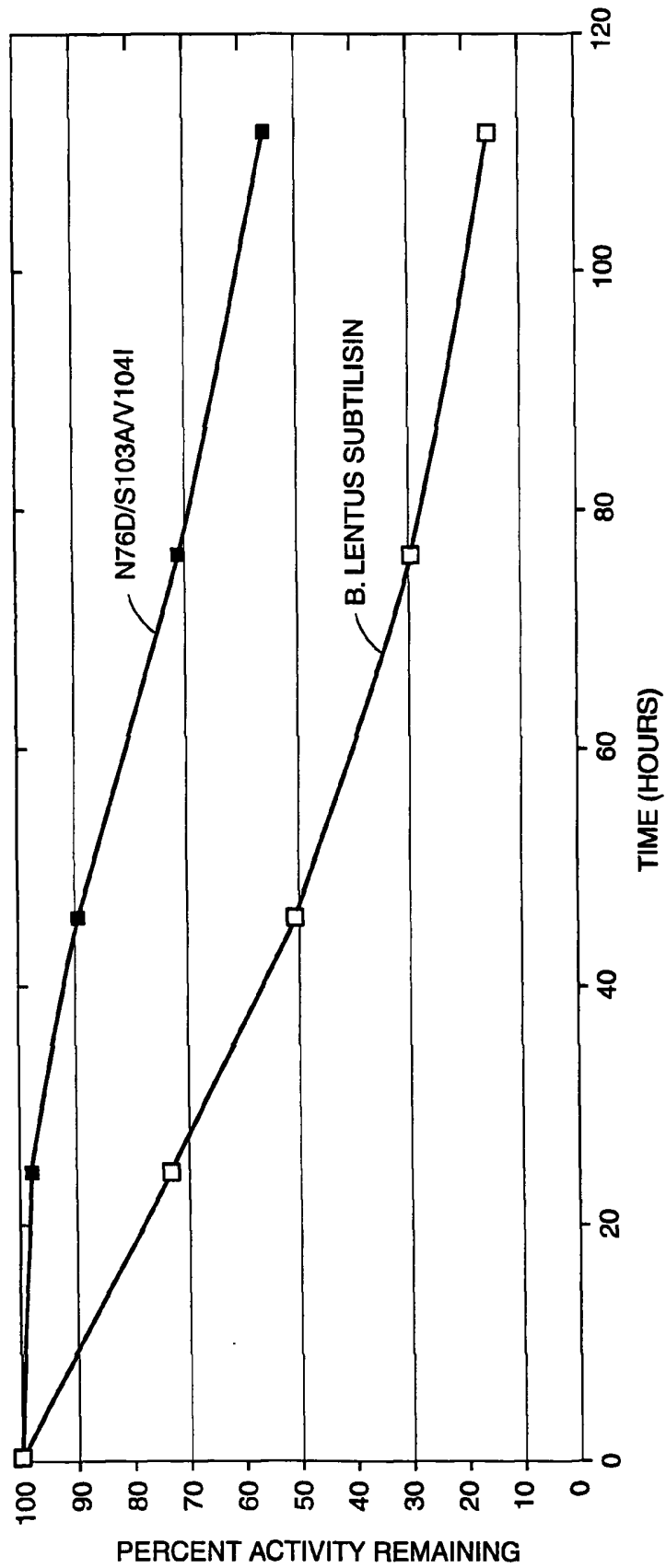


**FIG. 9B**

**FIG. 9A**

**FIG. 9A**

**FIG. 9B**



**FIG.- 10**