

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

3216-96

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **16. 03. 95**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **02.05.94,**
11.08.94, 03.03.95

(31) Číslo prioritní přihlášky: **94/237939, 94/287461,**
95/394011

(33) Země priority: **US, US, US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14. 05. 97**
(Věstník č. 5/97)

(86) PCT číslo: **PCT/US95/03176**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 95/30010**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N15/57
C 12 N9/54
C 11 D3/386

(71) Přihlášovatel:

THE PROCTER & GAMBLE COMPANY,
Cincinnati, OH, US;

(72) Původce:

Brode Philip Frederick III, Cincinnati, OH,
US;

Barnett Bobby Lee, Cincinnati, OH, US;
Rubingh Donn Nelton, Cincinnati, OH, US;
Ghosh Chanchal Kumar, West Chester, OH,
US;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1273,
Praha 4, 14000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Varianty BPN subtilisinu se sníženou
adsorpcí a zvýšenou schopností hydrolýzy

(57) Anotace:

Předkládaný vynález se týká variant BPN' subtilisinu, které mají změněnou sekvenci aminokyselin proti aminokyselinové sekvenci BPN' divokého typu, aminokyselinová sekvence divokého typu zahrnuje oblast první smyčky, oblast druhé smyčky, oblast třetí smyčky, oblast čtvrté smyčky a oblast páté smyčky, kde změněná sekvence aminokyselin obsahuje jiné aminokyseliny, než které se vyskytují v divokém typu BPN' subtilisinu (tj. substituce) ve specificky identifikovaných polohách v jedné nebo více oblastech smyček, čímž má varianta BPN' sníženou adsorpci a zvýšeně hydrolýzuje nerozpustný substrát ve srovnání s divokým typem BPN' subtilisinu. Předkládaný vynález se také týká genů, které kodují tyto varianty BPN' subtilisinu. Předkládaný vynález se také týká prostředků pro čištění různých druhů povrchů, které obsahují tyto varianty BPN' subtilisinu.

CZ 3216-96 A3

Varianty BPN' subtilisinu se sníženou adsorpcí a zvýšenou schopností hydrolýzy

Oblast techniky

č.j.	006277
DOŠLO	
24.1.97	
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ	
PŘÍL.	

Předkládaný vynález se týká nových enzymových variant použitelných v různých druzích čisticích prostředků a dále se týká genů, které takové enzymové varianty kódují.

Dosavadní stav techniky

Enzymy tvoří největší třídu přirozeně se vyskytujících proteinů. Každý druh enzymu obvykle katalyzuje (urychluje reakci, aniž by byl spotřebován) odlišný druh chemické reakce. Jedna třída enzymů nazývaných proteázy je známa svou schopností hydrolyzovat jiné proteiny (rozložit sloučeninu do dvou nebo více jednodušších sloučenin s tím, že přijme části H a OH z molekuly vody na každé straně štěpené chemické vazby). Tato schopnost hydrolyzovat proteiny byla využita tak, že přirozeně se vyskytující a proteiny ovlivňující proteázy byly zahrnuty jako přísada do detergentních prostředků na praní prádla. Mnohé nečistoty na šatech jsou proteinové povahy a proteázy se širokou specifíčností mohou podstatně zlepšit odstranění těchto nečistot.

Bohužel často úroveň účinnosti těchto enzymů v jejich přirozeném bakteriálním prostředí neodpovídá účinnosti v relativně nepřirozeném prostředí při praní. Přesněji,

vlastnosti proteáz jako jsou tepelná stabilita, pH stabilita, oxidační stabilita a substrátová specifická nejsou nevyhnutelně co nejlépe rozvinuty při použití mimo přirozené prostředí enzymu.

Vlastnosti proteázy určuje její aminokyselinová sekvence. Změna aminokyselinové sekvence proteázy může do různého stupně pozměnit vlastnosti enzymu nebo může dokonce inaktivovat enzym, což závisí na poloze, povaze a/nebo velikosti změny v aminokyselinové sekvenci. Při pokusu zlepšit vlastnosti proteáz s cílem zvýšit jejich účinnost v pracovním prostředí byly použity různé přístupy ke změně aminokyselinové sekvence proteáz divokého typu. Tyto přístupy zahrnují takovou změnu aminokyselinové sekvence, aby se zvýšila tepelná stabilita a zlepšila oxidační stabilita za zcela odlišných podmínek.

Navzdory rozmanitosti přístupů v oboru popsaných trvá potřeba nových účinných variant proteáz použitelných k čištění různých druhů povrchů.

Předmětem předkládaného vynálezu je poskytnout varianty enzymu subtilisinu, které ve srovnání s divokým typem enzymu zvýšeně hydrolyzují.

Předmětem předkládaného vynálezu je poskytnout také čisticí prostředky, které obsahují tyto varianty enzymu subtilisinu.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález se týká variant BPN' subtilisinu.

které mají změněnou sekvenci aminokyselin proti aminokyselinové sekvenci BPN' divokého typu. Aminokyselinová sekvence divokého typu zahrnuje oblast první smyčky, oblast druhé smyčky, oblast třetí smyčky, oblast čtvrté smyčky a oblast páté smyčky, kde změněná sekvence aminokyselin obsahuje jiné aminokyseliny, než které se vyskytují v divokém typu BPN' subtilisinu (tj. substituce) ve specificky identifikovaných polohách v jedné nebo více oblastech smyček, čímž má varianta BPN' sníženou adsorpci a zvýšeně hydrolyzuje nerozpustný substrát ve srovnání s divokým typem BPN' subtilisinu. Předkládaný vynález se také týká genů, které kódují tyto varianty BPN' subtilisinu. Předkládaný vynález se také týká prostředků pro čištění různých druhů povrchů, které obsahují tyto varianty BPN' subtilisinu.

I. Varianty subtilisinu

Tento vynález se týká enzymů subtilisinů, zejména BPN', které byly modifikovány změnou různých nukleotidových sekvencí kódujících enzym, a tím se měnila aminokyselinová sekvence enzymu. Modifikované enzymy subtilisiny (dále jen "varianty BPN'") předkládaného vynálezu mají sníženou adsorpci a zvýšeně hydrolyzují nerozpustný substrát ve srovnání s divokým typem BPN' subtilisinu. Předkládaný vynález se také týká mutovaných genů kódujících takové varianty BPN'.

Enzymy subtilisiny předkládaného vynálezu patří do třídy enzymů známých jako proteázy. Proteáza je katalyzátor štěpení peptidových vazeb. Jeden typ proteázy je serinová

proteáza. Serinová proteáza se vyznačuje tím, že v aktivním místě je esenciální serinové reziduum.

Pozorování, že se rychlost enzymové hydrolýzy rozpustného substrátu zvyšuje s koncentrací enzymu, je dobře doloženo. Proto by se zdálo možné, že pro povrchově vázané substráty, takové na jaké se naráží při mnoha způsobech čištění, se rychlost hydrolýzy bude zvyšovat se zvyšující povrchovou koncentrací. Což se prokázal být tento případ. (Brode, P.F. III a D.S. Rauch, LANGMUIR, "Subtilisin BPN': Activity on an Immobilized Substrate", Vol. 8, pp. 1325-1329 (1992)). Vlastně byla pro nerozpustné substráty nalezena lineární závislost rychlosti na povrchové koncentraci při měnící se povrchové koncentraci enzymu. (Rubingh, D.N. a M.D. Bauer, "Catalysis of Hydrolysis by Proteases at the Protein-Solution Interface", v POLYMER SOLUTIONS, BLENDS AND INTERFACES, Ed. I. Noda a D.N. Rubingh, Elsevier, p. 464 (1992)). Překvapivě při snaze použít tuto základní myšlenku při hledání variant proteáz, které mají lepší čisticí výkon, jsme nezjistili, že enzymy, které se více adsorbují jsou výkonnější. Ve skutečnosti jsme překvapivě zjistili, že opak je pravdou: snížená adsorpce enzymu k substrátu vedla ke zvýšené hydrolýze substrátu (tj. lepší čisticí výkon).

Ačkoli si nepřejeme být svázáni teorií, věří se, že zvýšený výkon při srovnání jedné varianty s druhou, je výsledek faktu, že enzymy, které méně adsorbují jsou také méně těsně vázány, a proto jsou mnohem více pohyblivé na povrchu, ze kterého má být odstraněn nerozpustný proteinový

substrát. Při srovnatelných koncentracích enzymu v roztoku je tato zvýšená mobilita dostatečná k tomu, aby převážila jakoukoli výhodu, které se dosáhne dodáním vyšší koncentrace enzymu k povrchu.

Mutace popsané v tomto textu jsou určeny k tomu, aby změnily (tj. snížily) adsorpci enzymu k povrchově vázaným nečistotám. V BPN' tvoří určité aminokyseliny vnější smyčky enzymové molekuly. V diskusi budou tyto smyčky zmiňovány jako oblasti první, druhé, třetí, čtvrté a páté smyčky. Přesněji, polohy aminokyselin 59-66 tvoří oblast první smyčky, polohy 95-107 tvoří oblast druhé smyčky, polohy 126-133 tvoří oblast třetí smyčky, polohy 154-167 tvoří oblast čtvrté smyčky, polohy 187-191 tvoří oblast páté smyčky a polohy 199-220 tvoří oblast šesté smyčky (polohy jsou číslovány analogicky k polohám v aminokyselinové sekvenci pro divoký typ BPN' subtilisinu (sekvence identifikačního čísla 1)).

Věřící se, že tyto oblasti smyček hrají významnou roli v adsorpci molekuly enzymu k povrchově vázanému peptidu a specifické mutace v jedné nebo více těchto smyčkových oblastech mají významný efekt na tuto adsorpci. Ačkoli si nepřejeme být svázáni teorií, věří se, že smyčkové oblasti jsou pro adsorpci molekuly BPN' důležité přinejmenším ze dvou důvodů. Za prvé, aminokyseliny, které jsou obsaženy v oblastech smyček mohou vytvářet těsnější kontakty s každým povrchem, kterému je molekula vystavena. Za druhé, blízkost oblastí smyček k aktivnímu místu a vazebnému místu ("kapse") molekuly BPN' dává smyčkám roli v katalyticky produktivní

adsorpci enzymu k povrchově vázaným substrátům (peptidové/proteinové nečistoty).

Termín "varianta", jak se používá v tomto textu, znamená enzym, jehož sekvence aminokyselin se liší od sekvence divokého typu.

Termín "mutovaný gen BPN'", jak se používá v tomto textu, znamená gen kódující variantu BPN'.

Termín "divoký typ subtilisinu BPN'", jak se používá v tomto textu, se vztahuje na enzym subtilisin znázorněný sekvencí identifikačního čísla 1. Aminokyselinová sekvence subtilisinu BPN' je dále popsána autory Wells, J.A., E. Ferrari, D.J. Henner, D.A. Estell a E.Y. Chen, NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Vol. II, 7911-7925, (1983), zahrnuto v odkazech.

Termín "aminokyselinová sekvence divokého typu", jak se používá v tomto textu, zahrnuje sekvenci identifikačního čísla 1 a také sekvenci identifikačního čísla 1 mající modifikace aminokyselinové sekvence jiné než v některé z těchto poloh 59-66, 95-107, 126-133, 154-167, 187-191 a 199-220.

Termín "hydrofilnější aminokyselina", jak se používá v tomto textu, se vztahuje na jakoukoli jinou aminokyselinu, která má vyšší hydrofilnost než předmětná aminokyselina, s odkazem na tabulku hydrofilnosti níže. Následující tabulka hydrofilnosti (Tabulka 1) uvádí aminokyseliny v sestupném pořadí zvyšující se hydrofilnosti (viz Hopp, T.P. a Woods, K.R., "Prediction of Protein Antigenic Determinants from Amino Acid Sequences", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE USA, Vol. 78, pp. 3824-3828, 1981, zahrnuto

v odkazech).

Tabulka 1

Aminokyselina	Hodnota hydrofilnosti
Trp	-3,4
Phe	-2,5
Tyr	-2,3
Leu, Ile	-1,8
Val	-1,5
Met	-1,3
Cys	-1,0
Ala, His	-0,5
Thr	-0,4
Pro, Gly	-0,0
Gln, Asn	0,2
Ser	0,3
Arg ⁺ , Lys ⁺ , Glu ⁻ , Asp ⁻	3,0

Tabulka 1 také ukazuje, které aminokyseliny nesou náboj (tato vlastnost se vztahuje k pH od 8 až 9). Pozitivně nabité aminokyseliny jsou Arg a Lys, negativně nabité aminokyseliny jsou Glu a Asp a zbývající aminokyseliny jsou neutrální. V preferovaném ztělesnění předkládaného vynálezu je substituující aminokyselina buď neutrální nebo negativně nabitá, výhodněji negativně nabitá (tj. Glu nebo Asp).

Proto, například, prohlášení "substituovat Gln stejně nebo více hydrofilní aminokyselinou, která je neutrální nebo

má negativní náboj" znamená, že Gln by byl nahražen Asn (který je stejně hydrofilní jako Gln) nebo Ser, Glu nebo Asp (které jsou hydrofilnější než Gln), každá z nich je neutrální nebo má negativní náboj a má větší hodnotu hydrofilnosti ve srovnání s Gln. Podobně prohlášení "substituovat Pro hydrofilnější aminokyselinou, která je neutrální nebo má negativní náboj" znamená, že Pro by byl nahražen Gln, Asn, Ser, Glu nebo Asp.

V jednom ztělesnění předkládaného vynálezu má varianta BPN' modifikovanou aminokyselinovou sekvenci proti sekvenci aminokyselin divokého typu, přičemž modifikovaná aminokyselinová sekvence obsahuje substituci v jedné nebo více polohách v jedné nebo více oblastech smyček, první, druhé, třetí, čtvrté nebo páté, čímž má varianta BPN' sníženou adsorpci a zvýšeně hydrolyzuje nerozpustný substrát ve srovnání s divokým typem subtilisinu BPN'.

V dalším ztělesnění předkládaného vynálezu varianta BPN' obsahuje dále jednu nebo více substitucí v oblasti šesté smyčky.

V preferovaném ztělesnění předkládaného vynálezu aminokyselina substituující jednu nebo více poloh v jedné nebo více oblastech smyček je, s odkazem na Tabulku 1, neutrální nebo negativně nabitá a stejně nebo více hydrofilní, výhodně hydrofilnější, než aminokyselina v příslušné poloze v aminokyselinové sekvenci divokého typu.

A. Substituce v oblasti první smyčky

Když substituce nastane v oblasti první smyčky, substituce nastane v jedné nebo více z poloh 59, 60, 61,

62, 63, 65 nebo 66.

Když substituce nastane v poloze 59, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Glu nebo Ser.

Když substituce nastane v poloze 60, substituující aminokyselina je Glu.

Když substituce nastane v poloze 61, substituující aminokyselina je Asp, Gln, Glu nebo Ser.

Když substituce nastane v poloze 62, substituující aminokyselina je Asp, Gln, Glu nebo Ser.

Když substituce nastane v poloze 63, substituující aminokyselina je Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 65, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Pro nebo Ser.

Když substituce nastane v poloze 66, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Pro nebo Ser.

B. Substituce v oblasti druhé smyčky

Když substituce nastane v oblasti druhé smyčky, substituce nastane v jedné nebo více z poloh 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106 nebo 107.

Když substituce nastane v poloze 95, substituující aminokyselina je Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Met, Pro, Ser nebo Thr.

Když substituce nastane v poloze 96, substituující aminokyselina je Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Met, Pro, Ser, Thr nebo Val.

Když substituce nastane v poloze 97, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Pro nebo Ser.

Když substituce nastane v poloze 98, substituující

aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Pro, Ser nebo Thr.

Když substituce nastane v poloze 99, substituující aminokyselina je Glu.

Když substituce nastane v poloze 100, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Pro nebo Ser.

Když substituce nastane v poloze 101, substituující aminokyselina je Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 102, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Pro nebo Ser.

Když substituce nastane v poloze 103, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Glu nebo Ser.

Když substituce nastane v poloze 104, substituující aminokyselina je Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Ser, Thr nebo Val.

Když substituce nastane v poloze 105, substituující aminokyselina je Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 106, substituující aminokyselina je Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr nebo Val.

Když substituce nastane v poloze 107, substituující aminokyselina je Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Met, Pro, Ser, Thr nebo Val.

C. Substituce v oblasti třetí smyčky

Když substituce nastane v oblasti třetí smyčky, substituce nastane v jedné nebo více z poloh 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132 nebo 133.

Když substituce nastane v poloze 126, substituující

aminokyselina je Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Met, Pro, Ser, Thr nebo Val.

Když substituce nastane v poloze 127, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Pro nebo Ser.

Když substituce nastane v poloze 128, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Gly nebo Ser.

Když substituce nastane v poloze 129, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Gly nebo Ser.

Když substituce nastane v poloze 130, substituující aminokyselina je Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 131, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Gly nebo Ser.

Když substituce nastane v poloze 132, substituující aminokyselina je Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 133, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Pro, Ser nebo Thr.

D. Substituce v oblasti čtvrté smyčky

Když substituce nastane v oblasti čtvrté smyčky, substituce nastane v jedné nebo více z poloh 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166 nebo 167.

Když substituce nastane v poloze 154, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Pro nebo Ser.

Když substituce nastane v poloze 155, substituující aminokyselina je Asp, Gln, Glu nebo Ser.

Když substituce nastane v poloze 156, substituující aminokyselina je Asp.

Když substituce nastane v poloze 157, substituující

aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Pro nebo Ser.

Když substituce nastane v poloze 158, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Pro nebo Ser.

Když substituce nastane v poloze 159, substituující aminokyselina je Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 160, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Pro nebo Ser.

Když substituce nastane v poloze 161, substituující aminokyselina je Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 162, substituující aminokyselina je Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 163, substituující aminokyselina je Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 164, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Pro nebo Ser.

Když substituce nastane v poloze 165, substituující aminokyselina je Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Met, Pro, Ser nebo Thr.

Když substituce nastane v poloze 166, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Pro nebo Ser.

Když substituce nastane v poloze 167, substituující aminokyselina je Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Ser, Thr nebo Val.

E. Substituce v oblasti páté smyčky

Když substituce nastane v oblasti páté smyčky, substituce nastane v jedné nebo více z poloh 187, 188, 189, 190 nebo 191.

Když substituce nastane v poloze 187, substituující

aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Pro, Ser a Thr.

Když substituce nastane v poloze 188, substituující aminokyselina je Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 189, substituující aminokyselina je Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Ser, Thr, Tyr nebo Val.

Když substituce nastane v poloze 190, substituující aminokyselina je Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 191, substituující aminokyselina je Asp nebo Glu.

F. Substituce v oblasti šesté smyčky

Když substituce nastane v oblasti šesté smyčky, substituce nastane v jedné nebo více z poloh 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219 nebo 220.

Když substituce nastane v poloze 199, substituující aminokyselina pro polohu 199 je Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 200, substituující aminokyselina pro polohu 200 je His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 201, substituující aminokyselina pro polohu 201 je Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 202, substituující aminokyselina pro polohu 202 je Pro, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 203, substituující aminokyselina pro polohu 203 je Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 204, substituující aminokyselina pro polohu 204 je Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 205, substituující aminokyselina pro polohu 205 je Leu, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 206, substituující aminokyselina pro polohu 206 je Pro, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 207, substituující aminokyselina pro polohu 207 je Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 208, substituující aminokyselina pro polohu 208 je Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 209, substituující aminokyselina pro polohu 209 je Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 210, substituující aminokyselina pro polohu 210 je Ala, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 211, substituující aminokyselina pro polohu 211 je Ala, Pro, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 212, substituující aminokyselina pro polohu 212 je Gln, Ser, Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 213, substituující aminokyselina pro polohu 213 je Trp, Phe, Tyr, Leu, Ile,

Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 214, substituující aminokyselina pro polohu 214 je Phe, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 215, substituující aminokyselina pro polohu 215 je Thr, Pro, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 216, substituující aminokyselina pro polohu 216 je His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 217, substituující aminokyselina pro polohu 217 je Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 218, substituující aminokyselina pro polohu 218 je Gln, Ser, Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 219, substituující aminokyselina pro polohu 219 je Pro, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Když substituce nastane v poloze 220, substituující aminokyselina pro polohu 220 je Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

II. Čisticí prostředky

V dalším ztělesnění předkládaného vynálezu je účinné množství jedné nebo více enzymových variant zahrnuto do prostředků k čištění různých druhů povrchů při potřebě odstranit nečistoty bílkovinné povahy. Takové čisticí prostředky zahrnují detergentní prostředky na čištění

pevných povrchů, neomezené formou (tj. tekuté a práškové), detergentní prostředky pro čištění tkanin - prací prostředky, neomezené formou (tj. práškové, tekuté a prostředky v pevné formě, např. kostkách), prostředky do myček na nádobí (neomezené formou), prostředky na čištění ústní dutiny, neomezené formou (tj. prostředek na čištění zubů, zubní pasta a ústní voda), prostředky na čištění umělého chrupu, neomezené formou (tj. tekuté, tablety) a prostředky na čištění kontaktních čoček, neomezené formou (tj. tekuté, tablety).

Čisticí prostředky také obsahují, kromě variant BPN' popsaných výše, jeden nebo více materiálů čisticích prostředků, které jsou kompatibilní s enzymem proteázou. Termín "materiál čisticího prostředku", jak se v tomto textu užívá, znamená jakýkoliv tekutý, pevný nebo plynový materiál vybraný pro konkrétní typ požadovaného čisticího prostředku a formu produktu (např. tekutina, prášek, sprej, kostka, tyčinka, pasta, gel), a tyto materiály jsou také kompatibilní s variantou BPN' použitou v prostředku. Specifický výběr materiálů čisticího prostředku se snadno učiní tak, že se vezme do úvahy materiál povrchu, který má být čištěn, a požadovaná forma prostředku pro podmínky během použití (např. během použití mycího detergentu). Termín "kompatibilní", jak je v tomto textu použit, znamená, že materiály čisticího prostředku nesnižují proteolytickou aktivitu varianty BPN' do takové míry, že proteáza není účinná tak, jak se vyžaduje při normálním použití. Příklady specifických materiálů čisticích prostředků jsou detailně

uvedeny níže.

Termín "účinné množství varianty enzymu", jak se v tomto textu používá, se vztahuje na množství enzymové varianty potřebné k dosažení enzymatické aktivity nezbytné ve specifickém čisticím prostředku. Taková účinná množství jsou odborníkem snadno určena a jsou založena na mnoha faktorech, jako je použitá konkrétní varianta enzymu, čisticí použití, specifické složení čisticího prostředku a zdali se vyžaduje tekutý nebo suchý prostředek (např. prášek, kostka), a pod. Čisticí prostředky výhodně obsahují od 0,0001% do 10% jedné nebo více variant enzymu předkládaného vynálezu, výhodněji od 0,001% do 1%, ještě výhodněji od 0,01% do 0,1%. Několik příkladů různých čisticích prostředků, kde jsou použity enzymové varianty, je detailně pojednáno níže. Všechny v tomto textu použité díly, procenta a poměry jsou hmotnostní, pokud není uvedeno jinak.

Termín "čisticí prostředky kromě na tkaniny", jak se v tomto textu používá, zahrnuje čisticí prostředky na pevné povrchy, prostředky do myček na nádobí, prostředky na čištění ústní dutiny a prostředky na čištění kontaktních čoček.

A. Čisticí prostředky na pevné povrchy, nádobí a tkaniny

Varianty enzymu předkládaného vynálezu mohou být použity v různých druzích detergentních prostředků, kde se vyžaduje silné pění a dobré odstranění nerozpustného substrátu. Tak mohou být enzymové varianty použity s různými obvyklými přísadami a poskytnou plně definované čističe pevných povrchů, prostředky do myček na nádobí, prací

prostředky a pod. Takové prostředky mohou být ve formě tekutiny, prášku, v pevné formě (kostky) a pod. Tyto prostředky mohou být vyjádřeny jako moderní "koncentrované" detergenty, které obsahují 30%-60% (hmotnostních) povrchově aktivních látek (surfaktantů).

Čisticí prostředky vynálezu mohou volitelně a výhodně obsahovat různé aniontové, neionogenní, obojetně ionogenní a pod. surfaktanty. Tyto surfaktanty jsou typicky přítomné v množství od 5% do 35% prostředku.

Neomezující příklady použitelných surfaktantů zahrnují obvyklé C_{11} - C_{18} alkylbenzen sulfonáty a primární a náhodné alkyl sulfáty, C_{10} - C_{18} sekundární (2,3) alkyl sulfáty vzorců $CH_3(CH_2)_x(CHOSO_3^-M^+)CH_3$ a $CH_3(CH_2)_y(CHOSO_3^-M^+)CH_2CH_3$, kde x a $(y+1)$ jsou celá čísla nejméně 7, výhodně nejméně 9, a M je ve vodě rozpustný kation, především sodík, C_{10} - C_{18} alkyl alkoxy sulfáty (hlavně EO 1-5 ethoxy sulfáty), C_{10} - C_{18} alkyl alkoxy karboxyláty (hlavně EO 1-5 ethoxykarboxyláty) C_{10} - C_{18} alkyl polyglykosidy a jejich odpovídající sulfatované polyglykosidy, C_{12} - C_{18} alfa sulfatované estery mastných kyselin, C_{12} - C_{18} alkyl a alkyl fenol alkoxy láty (hlavně ethoxyláty a smíšené ethoxy/propoxy), C_{12} - C_{18} betainy a sulfobetainy ("sultainy"), C_{10} - C_{18} amin oxidy a pod. Preferované jsou alkyl alkoxy sulfáty (AES) a alkyl alkoxy karboxyláty (AEC). (Také se preferuje použití těchto surfaktantů ve spojení se svrchu uvedenými aminoxidovými a/nebo betainovými či sultainovými surfaktanty, záleží na požadavcích tvůrce). Další běžně používané surfaktanty jsou vyjmenovány ve

standardní literatuře. Obzvláště použitelné surfaktanty zahrnují C₁₀-C₁₈ N-metyl glukamidy popsané v US patentu 5 194 639, Connor a kol., vydaném 16. března 1993, zahrnuto v odkazech.

V prostředcích může být obsažena celá řada dalších přísad používaných v detergentních čisticích prostředcích, včetně jiných aktivních složek, nosičů, hydrotropních látek, výrobních pomocných prostředků, barev nebo pigmentů, rozpouštědel pro tekuté směsi, atd. Jestliže se požaduje další zvýšení pění, mohou být do prostředků zahrnuty zesilovače pění, jako C₁₀-C₁₆ alkolamidy, typicky v množství od 1 do 10%. Typickou třídu takových zesilovačů pění zastupují C₁₀-C₁₄ monoetanol a dietanol amidy. Je také výhodné použití těchto zesilovačů pění se surfaktanty, které vysoce pění sami o sobě, jako amin oxidy, betainy a sultainy zmíněné výše. Je-li vyžadováno další pění, je možno přidat rozpustné hořečnaté soli jako MgCl₂, MgSO₄ a pod., v množství od 0,1% do 2%.

Tekuté detergentní prostředky mohou jako nosiče obsahovat vodu a jiná rozpouštědla. Jsou vhodné primární nebo sekundární alkoholy o nízké molární hmotnosti, například metanol, etanol, propanol a isopropanol. Pro rozpouštěcí surfaktanty se preferují jednosytné alkoholy, ale mohou být také použity polyoly, které obsahují od 2 do 6 atomů uhlíku a od 2 do 6 hydroxy skupin (např. 1,3-propandiol, etylenglykol, glycerin a 1,2-propandiol). Prostředky takové nosiče obsahují v množství od 5% do 90%, typicky od 10% do 50%.

Detergentní prostředky jsou výhodně navrženy tak, že během použití při čisticích úkonech ve vodném prostředí bude mít mycí voda pH mezi 6,8 a 11,0. Typicky jsou konečné produkty navrženy v tomto rozmezí. Technologie upravování pH při doporučeném dávkování zahrnuje použití pufrů, zásad, kyselin, atd. a je odborníkům dobře známa.

Při návrhu složení čisticích prostředků předkládaného vynálezu na pevné povrchy a na tkaniny může navrhovatel použít různé základní složky v množstvích od 5% do 50% (hmotnostních). Typické základní složky zahrnují zeolity o velikosti částic 1-10 mikronů, polykarboxyláty jako citráty a oxydisukcináty, vrstvené silikáty, fosfáty a pod. Další obvyklé základní složky jsou vyjmenovány ve standardních sbírkách vzorců.

Podobně může navrhovatel v těchto prostředcích použít různé přídatné enzymy, jako jsou celulózy, lipázy, amylázy a proteázy, typicky v množstvích od 0,001% do 1% (hmotnostního). V oboru pracích detergentů jsou velmi dobře známy různé čisticí a tkaniny ošetřující enzymy.

V těchto prostředcích mohou být použity různé bělicí sloučeniny, jako perkarbonáty, perboráty a pod., typicky v množstvích od 1% do 15% (hmotnostních). Je-li vyžadováno, tyto prostředky mohou také obsahovat bělicí aktivátory, jako jsou tetraacetyl etylendiamin, nonanoyloxybenzen sulfonát a pod., které jsou v oboru také dobře známy. Použitá množství jsou typicky v rozmezí od 1% do 10% (hmotnostních).

V těchto prostředcích mohou být použity také různé prostředky na odstraňování nečistot, hlavně aniontového

oligoesterového typu, různá chelatační činidla, hlavně aminofosfonáty a etylendiaminosukcináty, různé prostředky na odstranění hlinitých nečistot, hlavně ethoxylovaný tetraetylen pentamin, různá dispergovadla, hlavně polyakryláty a polyaspartáty, různé zjasňovače, hlavně aniontové, různé potlačovače pění, hlavně silikony a sekundární alkoholy, různé změkčovače tkanin, hlavně smektity (valchářské hlíny), a podobně, vše se v prostředcích používá v množstvích pohybujících se v rozmezí od 1% do 35% (hmotnostních). Standardní sbírky vzorců a publikované patenty obsahují četné detailní popisy těchto obvyklých materiálů.

V čisticích prostředcích mohou být také použity stabilizátory enzymů. Tyto enzymové stabilizátory zahrnují propylenglykol (výhodně od 1% do 10%), formiát sodný (výhodně od 0,1% do 1%) a formiát vápenatý (výhodně od 0,1% do 1%).

1. Čisticí prostředky na pevné povrchy

Termín "čisticí prostředek na pevné povrchy", jak se v tomto textu používá, se vztahuje na tekuté a práškové detergentní prostředky na čištění pevných povrchů jako jsou podlahy, zdi, koupelnové dlaždičky a pod. Čisticí prostředky na pevné povrchy předkládaného vynálezu obsahují účinné množství jedné nebo více enzymových variant předkládaného vynálezu, výhodně od 0,001% do 10%, výhodněji od 0,01% do 5%, ještě výhodněji od 0,05% do 1% (hmotnostního) aktivního enzymu v prostředku. Kromě obsahu jedné nebo více enzymových variant tyto čisticí prostředky na pevné povrchy typicky

obsahují surfaktant a ve vodě rozpustnou ochrannou základní složku. Avšak někdy se v určitých specializovaných produktech, jako jsou čističe oken ve spreji, surfaktanty nepoužívají, neboť mohou zanechávat na skleněném povrchu nepravidelně pruhovaný povlak.

Je-li surfaktant v prostředku přítomen, pak čisticí prostředek může obsahovat jenom 0,1%, ale typicky obsahuje od 0,25% do 10%, výhodněji od 1% do 5% surfaktantu.

Typicky prostředek obsahuje od 0,5% do 50% detergentní základní složky, výhodně od 1% do 10%.

Výhodně by pH mělo být v rozmezí od 8 do 12. Je-li nezbytné, mohou být použity obvyklé prostředky na upravení pH, jako jsou hydroxid sodný, karbonát sodný nebo kyselina chlorovodíková.

V prostředku mohou být obsažena rozpouštědla. Použitelná rozpouštědla zahrnují, ale nejen je, glykolétery jako je dietylglykol monohexyl éter, dietylglykol monobutyl éter, etylglykol monobutyl éter, etylglykol monohexyl éter, propylglykol monobutyl éter, dipropylglykol monobutyl éter, a dioly jako je 2,2,4-trimetyl-1,3-pentandiol a 2-etyl-1,3-hexandiol. Jsou-li použita, pak jsou tato rozpouštědla typicky přítomna v množstvích od 0,5% do 15%, výhodně od 3% do 11%.

Navíc v předkládaných prostředcích mohou být použita vysoce těkavá rozpouštědla jako je isopropanol nebo etanol, aby se usnadnilo vysychání prostředku z povrchů, když se povrch neopláchne po použití neředěného prostředku. Jsou-li použita, pak jsou těkavá rozpouštědla v prostředku typicky

přítomna v množstvích od 2% do 12%.

Ztělesnění čisticího prostředku na pevné povrchy je doloženo příklady.

2. Prostředky do myček na nádobí

V dalším ztělesnění předkládaného vynálezu obsahují jednu nebo více enzymových variant předkládaného vynálezu prostředky do myček na nádobí. Termín "prostředky do myček na nádobí", jak se v tomto textu používá, se vztahuje na všechny formy prostředků na mytí nádobí, včetně, ale neomezeno na, práškové a tekuté formy. Ztělesnění prostředku do myček na nádobí je doloženo příklady.

3. Čisticí prostředky na tkaniny - prací prostředky

V dalším ztělesnění předkládaného vynálezu obsahují jednu nebo více enzymových variant předkládaného vynálezu prací prostředky. Termín "prací prostředky", jak se v tomto textu používá, se vztahuje na všechny formy detergentních prostředků na praní tkanin, včetně, ale neomezeno na, práškové, tekuté a pevné formy (např. kostka). Preferované prací prostředky jsou v tekuté formě.

a. Práškové prací prostředky

Práškové prací prostředky předkládaného vynálezu obsahují účinné množství jedné nebo více enzymových variant předkládaného vynálezu, výhodně od 0,001% do 10%, výhodněji od 0,005% do 5%, nejvýhodněji od 0,01% do 1% (hmotnostního) aktivního enzymu v prostředku. Kromě jedné nebo více enzymových variant práškové prací prostředky typicky obsahují alespoň jeden surfaktant, jednu nebo více základních složek a v některých případech bělicí prostředek.

Ztělesnění práškového pracího prostředku je doloženo příklady.

b. Tekuté prací prostředky

Tekuté prací prostředky předkládaného vynálezu obsahují účinné množství jedné nebo více enzymových variant předkládaného vynálezu, výhodně od 0,005% do 5%, výhodněji od 0,01% do 1% (hmotnostního) aktivního enzymu v prostředku. Tyto tekuté prací prostředky navíc typicky obsahují aniontový surfaktant, mastnou kyselinu, ve vodě rozpustnou detergentní základní složku a vodu.

Ztělesnění tekutého pracího prostředku je doloženo příklady.

c. Pevné prací prostředky

Pevné prací prostředky předkládaného vynálezu vhodné pro ruční praní zašpiněných tkanin obsahují účinné množství jedné nebo více enzymových variant předkládaného vynálezu, výhodně od 0,001% do 10%, výhodněji od 0,01% do 1% (hmotnostního) prostředku.

Ztělesnění pevného pracího prostředku je doloženo příklady.

B. Přídavné čisticí prostředky

Kromě čisticích prostředků na pevné povrchy, do myček na nádobí a pracích prostředků pojednávaných výše může být jedna nebo více enzymových variant začleněno do různých druhů dalších čisticích prostředků, kde se vyžaduje hydrolýza nerozpustného substrátu. Takové přídavné čisticí prostředky zahrnují, ale nejsou omezeny na, prostředky na čištění ústní dutiny, prostředky na čištění umělého chrupu

a prostředky na čištění kontaktních čoček.

1. Prostředky na čištění ústní dutiny

V dalším ztělesnění předkládaného vynálezu je obsaženo farmaceuticky přijatelné množství jedné nebo více enzymových variant předkládaného vynálezu v prostředcích použitelných na odstraňování nečistot bílkovinné povahy ze zubů a umělého chrupu. Termín "prostředky na čištění ústní dutiny", jak se v tomto textu používá, se vztahuje na prostředky na čištění zubů, zubní pasty, zubní gely, zubní prášky, ústní vody, ústní spreje, ústní gely, žvýkáci gumy, zdravotní pastilky, váčky s práškem, tablety, biogely, preventivní pasty, zubní léčebné roztoky a pod. Výhodně prostředky na čištění ústní dutiny obsahují od 0,0001% do 20% jedné nebo více enzymových variant předkládaného vynálezu, výhodněji od 0,001% do 10%, ještě výhodněji od 0,01% do 5% (hmotnostních) prostředku a farmaceuticky přijatelný nosič. Termín "farmaceuticky přijatelný", jak se v tomto textu používá, znamená, že léky, léčiva nebo inertní složky, které termín popisuje, jsou vhodné pro použití v kontaktu s lidskými tkáněmi a tkáněmi zvířat bez nepatřičné toxicity, nesnášenlivosti, nestability, podráždění, alergické reakce a pod., s přiměřeně přijatelným poměrem účinek/riziko.

Typicky prostředky na čištění ústní dutiny obvykle obsahují od 50% do 99,99%, výhodně od 65% do 99,99%, výhodněji od 65% do 99% (hmotnostních) farmaceuticky přijatelného nosiče v prostředku na čištění ústní dutiny.

Odborníkům jsou dobře známy farmaceuticky přijatelné nosiče a volitelné složky, které mohou být obsaženy

v prostředcích na čištění ústní dutiny předkládaného vynálezu. Celá řada typů prostředků, nosičů a volitelných složek použitelných v prostředcích na čištění ústní dutiny je popsána v U.S. patentech: 5 096 700, Seibel, vydaný 17. března 1992, 5 028 414, Sampathkumar, vydaný 2. července 1991, 5 028 415, Benedict, Bush a Sunberg, vydaný 2. července 1991, všechny zahrnuté v odkazech.

Ztělesnění prostředku na čištění ústní dutiny je doloženo příklady.

2. Prostředky na čištění umělého chrupu

V dalším ztělesnění předkládaného vynálezu obsahují jednu nebo více enzymových variant předkládaného vynálezu prostředky na čištění umělého chrupu vně ústní dutiny. Tyto prostředky na čištění umělého chrupu obsahují účinné množství jedné nebo více enzymových variant, výhodně od 0,0001% do 50% jedné nebo více enzymových variant, výhodněji od 0,001% do 35%, ještě výhodněji od 0,01% do 20% (hmotnostních) prostředku a nosič čisticího prostředku. V oboru jsou dobře známy různé formy prostředků na čištění umělého chrupu, jako šumivé tablety a pod. (viz např. U.S. patent 5 055 305, Young, zahrnuto v odkazech) a jsou všeobecně vhodné ke spojení s jednou nebo více enzymovými variantami pro odstraňování nečistot bílkovinné povahy z umělého chrupu.

Ztělesnění prostředku na čištění umělého chrupu předkládaného vynálezu je doloženo příklady.

3. Prostředky na čištění kontaktních čoček

V dalším ztělesnění předkládaného vynálezu obsahují

jednu nebo více enzymových variant předkládaného vynálezu prostředky na čištění kontaktních čoček. Tyto prostředky na čištění kontaktních čoček obsahují účinné množství jedné nebo více enzymových variant, výhodně od 0,01% do 50% jedné nebo více enzymových variant, výhodněji od 0,01% do 20%, ještě výhodněji od 1% do 5% (hmotnostních) prostředku a nosič čisticího prostředku. V oboru jsou dobře známy různé formy prostředků na čištění kontaktních čoček, jako tablety, tekutiny a pod. (viz např. U.S. patent 4 863 627, Davies, Meaken a Rees, vydaný 5. září 1989, U.S. patent Re. 32 672, Huth, Lam a Kirai, znovu vydaný 24. května 1988, U.S. patent 4 609 493, Schäfer, vydaný 2. září 1986, U.S. patent 4 690 793, Ogunbiyi a Smith, vydaný 1. září 1987, U.S. patent 4 614 549, Ogunbiyi, Riedhammer a Smith, vydaný 30. září 1986 a U.S. patent 4 285 738, Ogata, vydaný 25. srpna 1981, všechny zahrnuty v odkazech) a jsou všeobecně vhodné ke sloučení s jednou nebo více enzymovými variantami pro odstraňování nečistot bílkovinné povahy z kontaktních čoček.

Ztělesnění prostředku na čištění kontaktních čoček předkládaného vynálezu je doloženo příklady.

Zatímco byla popisována konkrétní ztělesnění předkládaného vynálezu, je odborníkům zřejmé, že se mohou provádět různé změny a úpravy předkládaného vynálezu, aniž by se opustila základní myšlenka a oblast vynálezu. V připojených patentových nárocích je zamýšleno pokrýt všechny tyto úpravy, které jsou v oblasti vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Příprava enzymových variant

Příklad 1

Mutované geny BPN'

Fagemid (pSS-5) obsahující gen divokého typu subtilisinu BPN' (Mitchinson, C. a J.A. Wells, (1989), "Protein Engineering of Disulfide Bonds in Subtilisin BPN', BIOCHEMISTRY, Vol. 28, pp. 4807-4815) je transformován do kmene CJ236 *Escherichia coli* *ung* a vytvoří se jednovláknový templát DNA obsahující uracil za použití pomocného fága VCSM13 (Kunkel, T.A., J.D. Roberts a R.A. Zakour, "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection", METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 154, pp. 367-382, (1987), jak modifikováno autory Yuckenberg, P.D., F. Witney, J. Geisselsoder a J. McClary, "Site-directed in vitro mutagenesis using uracil-containing DNA and phagemid vectors", DIRECTED MUTAGENESIS - A PRACTICAL APPROACH, Ed. M.J. McPherson, pp. 27-48, (1991), oba články jsou zahrnuty v odkazech). K tvorbě všech mutací (v podstatě jak prezentováno Yuckenbergem a kol., 1991, výše) je použita modifikace metody řízené mutageneze za použití jediného primeru dle Zollera a Smithe (Zoller, M.J. a M. Smith, "Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any fragment of DNA",

NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Vol. 10, pp. 6487-6500, (1982), zahrnuto v odkazech). Oligonukleotidy jsou tvořeny za použití syntetizátoru DNA Applied Biosystem Inc. 380B. Reakční produkty mutagenese jsou transformovány do kmene MM294 *Escherichia coli* (American Type Culture Collection *E. coli* 33625). Správnost všech mutantů je potvrzena sekvenováním DNA a izolovaná DNA je transformována do expresního kmene BG2036 *Bacillus subtilis* (Yang, M.Y., E. Ferrari a D.J.Henner, (1984), "Cloning of the Neutral Protease Gene of *Bacillus subtilis* and the Use of the Cloned Gene to Create an *In Vitro*-derived Deletion Mutation", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Vol. 160, pp. 15-21). Pro některé mutanty je použit k tvorbě uracilového templátu modifikovaný pSS-5 s posunovou mutací ve stopovacím kodonu v aminokyselině 217. Oligonukleotidy jsou navrženy tak, aby obnovily správný čtecí rámec v poloze 217 a také kódovaly náhodné substituce v polohách 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 187, 188, 189, 190, 191, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219 a 220 (ekvimolární a/nebo různé směsi všech čtyř nukleotidů pro všechny tři báze v těchto kodonech). Mutace, které opravují posunovou mutaci ve stopovacím kodonu a tvoří funkční enzym, jsou rozpoznávány podle schopnosti štěpit kasein. Náhodné substituce se zjišťují sekvenováním DNA.

Příklad 2

Fermentace

Buňky *Bacillus subtilis* (BE2036) obsahující zkoumanou mutaci subtilisinu se pěstují do střední logaritmické fáze v jednom litru kultivačního bujonu LB s glukózou a očkují se do kvasné kádě (fermentoru) Biostat ED (B. Braun Biotech, Inc., Allentown, Pennsylvania) do celkového objemu 10 litrů. Kultivační médium obsahuje kvasinkový výtažek, škrob, přípravek snižující pěnivost, pufrý a stopové minerály (viz FERMENTATION: A PRACTICAL APPROACH, Ed. B. McNeil a L.M. Harvey, 1990). Bujon je během fermentačního pochodu udržován na konstantním pH=7,0. Pro antibiotickou selekci mutovaného plazmidu se přidává chloramfenikol. Buňky se pěstují přes noc ve 37 °C až do hodnoty $A_{600}=60$ a pak se sklízí.

Příklad 3

Čištění

Aby se získal čistý enzym, fermentační bujon prochází následujícími kroky. Odstředěním se odstraní z bujonu buňky *Bacillus subtilis* a bujon se přečistí odstraněním jemných částic pomocí molekulárního síta s limitem molekulární hmotnosti 100K. Pak následuje koncentrace na molekulárním síti s limitem 10K, průtoková dialýza ke snížení iontové síly a nastavení pH na 5,5 za použití 0,025M pufru MES (2-(N-morfolin)ethansulfonová kyselina). Enzym se dále čistí navrstvením buď na chromatografickou kolonu s měničem

kationtů nebo na afinitně adsorpční chromatografickou kolonu a vyluhuje se z kolon pomocí gradientu s NaCl nebo propylenglykolem (viz Scopes, R.K., PROTEIN PURIFICATION PRINCIPLES AND PRACTICE, Springer-Verlag, New York, (1984), zahrnuto v odkazech).

K určení koncentrace aktivního enzymu ve frakcích sbíraných během gradientové eluce se používá zkouška s pNA (DelMar, E.G., C. Largman, J.W. Brodrick a M.C. Geokas, ANAL. BIOCHEM., Vol. 99, pp. 316-320, (1979), zahrnuto v odkazech). Tato zkouška měří rychlost, kterou se uvolňuje p-nitroanilin při enzymové hydrolýze rozpustného syntetického substrátu, sukcinyl-alanin-alanin-prolin-fenylalanin-p-nitroanilidu (sAAPF-pNA). Rychlost tvorby žluté barvy při hydrolytické reakci se měří na spektrofotometru ve 410 nm a je úměrná koncentraci aktivního enzymu. Navíc se používají měření absorpance ve 280 nm k určení celkové koncentrace proteinu. Poměr aktivní enzym/celkový protein udává čistotu enzymu a používá se ke zjištění frakcí, které budou sloučeny do zásobního roztoku.

Aby se zabránilo autolýze enzymu během skladování, přidává se ke sloučeným frakcím získaným z chromatografických kolon stejná váha propylenglykolu. Po dokončení čisticí procedury se kontrolovala čistota zásobního roztoku enzymu SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s natrium dodecylsulfátem) a čistá koncentrace enzymu se určovala metodou titrace aktivního místa za použití trypsinového inhibitoru typu II-T: bílku krocaního vejce zakoupeného od Sigma Chemical Company (St.

Louis, Missouri). Měřené konverzní faktory ukazují, které změny vytvořené v molekule enzymu v různých polohách vedou k enzymové variantě, která má zvýšenou aktivitu proti divokému typu na rozpustném substrátu pNA.

V přípravku pro použití se vyluhuje zásobní roztok enzymu přes kolonu se Sephadexem-G25 (Pharmacia, Piscataway, New Jersey), aby se odstranil propylenglykol a vyměnil pufr. Pufr MES ze zásobního roztoku enzymu se vymění za pufr 0,1M Tris (Tris(hydroxymetyl-aminometan)), který obsahuje 0,01M CaCl_2 a pH má upraveno na 8,6 pomocí HCl. Všechny pokusy jsou prováděny v pufru Tris o pH 8,6 zahřátém na 25 °C.

Příklad 4

Příprava modelového povrchu

Jako podklad pro kovalentně navázaný substrát sAAPF-pNA zakoupený od Bachem, Inc. (Torrence, California) je použito aminopropylové porézní sklo (CPG) zakoupené od CPG Inc. (Fairfield, New Jersey). Reakce se uskutečňuje v dimetyl sulfoxidu a jako vazebné činidlo se používá 1-ethyl-3-[3-(dimetylamino)propyl]karbodimid hydrochlorid (EDC). Po dokončení (monitorováno zkouškou pNA) je odstraněno přebytečné rozpouštědlo a CPG:sAAPF-pNA je opláchnut dimetyl sulfoxidem (DMSO) a dvojitě destilovanou vodou. Následuje sušení v sušárně s profukováním N_2 při 70 °C. Reakční schéma a příprava immobilizovaného substrátu se provádí dle popisu Brode, P.F. III, a D.S. Rauch, "Subtilisin BPN': Activity on an Immobilized Substrate".

LANGMUIR, Vol. 8, pp. 1325-1329, (1992), zahrnuto v odkazech.

Povrch CPG váže $62\,000 \pm 7\,000$ molekul pNA na μm^2 . Povrchová plocha zůstane nezměněna od hodnoty $50,0\text{ m}^2/\text{g}$, jak udává CPG Inc. pro použité sklo CPG. Toto naznačuje, že postup použitý k navázání sAAPF-pNA na CPG nezničí porézní strukturu (střední průměr je 486 Å).

Příklad 5

Test povrchové hydrolýzy

Za použití CPG:sAAPF-pNA mohou být měřeny v jediném pokuse jak adsorpce enzymové varianty tak i hydrolýza peptidu navázaného na CPG. Do baňky obsahující pufr Tris a CPG:sAAPF-pNA, který byl zbaven plynu, se přidá malý objem zásobního roztoku enzymové varianty. Baňka se protřepává na třepačce po dobu 90 minut, během kterých se třepačka zastavuje v různých časových intervalech (například, každé 2 minuty během časných stadií adsorpční hydrolýzy, např. prvních 20 minut, a každých 10 minut až do konce pokusu). CPG:sAAPF-pNA je umožněno sedimentovat a roztok se odebírá na vzorky. Experimentální postup a kalkulace adsorpce a hydrolýzy se provádí dle popisu Brodyho a kol., 1992, výše.

Všechny enzymy se monitorují na stabilitu proti autolýze a neměly by projevit znatelnou ztrátu způsobenou autolýzou v průběhu celého pokusu. Proto adsorpce enzymu může být určena měřením úbytku z roztoku. Rozdíl mezi

původní koncentrací enzymové varianty a koncentrací měřenou v každém jednotlivém časovém bodu udává množství adsorbované enzymové varianty. Množství pNA hydrolyzovaného z povrchu se měří odečtením absorbance při 410 nm poměrné části vzorku. Celkové množství hydrolyzovaného pNA se vypočítává sečtením množství odebraného na vzorky a množství zbylého v baňce. Tato hodnota se koriguje odečtením množství pNA, který je hydrolyzován pufrům Tris při pH 8,6 v nepřítomnosti enzymu. Tato bazická hydrolýza je v rozmezí 7-29% celkové hydrolýzy závislé na účinnosti enzymu.

Příklad 6

Kinetická analýza rozpustného substrátu

Rychlosti hydrolýzy rozpustného substrátu sAAPF-pNA se monitorují měřením přírůstku absorbance jako funkce času ve 410 nm na spektrofotometru DU-70. Koncentrace enzymu je udržována konstantní a pohybuje se v rozmezí 6-10 nanomolů, zatímco koncentrace substrátu se mění od 90 do 700 μM sAAPF-pNA pro každé kinetické stanovení. Každou sekundu po dobu 900 sekund se odebírají údaje absorbance a data jsou přenesena do kalkulační tabulky programu LOTUSTM (Lotus Development Corporation, Cambridge, Massachusetts). Analýza kinetických parametrů se provádí standardní Linewear Burkovou analýzou, ve které data v počáteční části testu (obvykle první minuta) jsou fitována lineární regresní křivkou a poskytnou tak hodnotu v_0 . Data v_0 a s_0 jsou vynesena do grafu standardním inverzním způsobem a umožní

určit hodnoty K_M a k_{cat} .

Tabulky variant BPN' k příkladům 1 až 6

Příklady variant BPN' předkládaného vynálezu, které mají sníženou adsorpci a zvýšenou hydrolýzu k povrchově vázaným substrátům, jsou uvedeny v tabulkách 2-25, viz níže. V popisu specifických mutací je originální aminokyselina vyskytující se v divokém typu uvedena jako první, na druhém místě je číslo polohy a substituující aminokyselina je třetí.

Tabulka 2

Smyčka 1 - varianty s jedinou mutací

Gln59Asn
Gln59Asp
Gln59Glu
Gln59Ser
Asp60Glu
Asn61Asp
Asn61Gln
Asn61Glu
Asn61Ser
Asn62Asp
Asn62Gln
Asn62Glu
Asn62Ser
Ser63Asp
Ser63Glu
Gly65Asn
Gly65Asp
Gly65Gln
Gly65Glu
Gly65Pro
Gly65Ser
Thr66Asn
Thr66Asp
Thr66Gln
Thr66Glu
Thr66Gly
Thr66Pro
Thr66Ser

Tabulka 3

Smyčka 1 - varianty s dvojitou mutací

Gln59Ser + Asn62Glu
 Asp60Glu + Asn61Ser
 Asn61Glu + Asn62Ser
 Gln59Ser + Gly65Gln
 Asn61Gln + Gly65Asn
 Asn61Ser + Asn62Asp
 Gln59Glu + Asn61Gln
 Asp60Glu + Gly65Gln
 Gln59Asp + Gly65Pro
 Asn61Asp + Gly65Asn
 Gln59Ser + Asn62Asp
 Gln59Asn + Gly65Gln
 Asn62Asp + Thr66Gly
 Gln59Asn + Asn62Glu
 Asn61Ser + Ser63Glu
 Gln59Ser + Asp60Glu
 Asp60Glu + Thr66Gln
 Asn61Glu + Thr66Gly
 Asp60Glu + Asn62Gln
 Asn62Gln + Gly65Pro
 Asn61Ser + Thr66Ser
 Asp60Glu + Gly65Pro
 Ser63Glu + Gly65Pro
 Asp60Glu + Thr66Ser
 Gln59Ser + Asn61Glu
 Asn62Asp + Gly65Gln
 Asn61Gln + Ser63Asp
 Gln59Asp + Gly65Asn
 Ser63Asp + Thr66Pro
 Ser63Glu + Thr66Asn
 Asn62Glu + Thr66Asn
 Asn61Asp + Gly65Ser
 Gly65Pro + Thr66Ser
 Gln59Ser + Asn62Ser
 Asp60Glu + Gly65Ser
 Ser63Asp + Gly65Ser
 Asn61Gln + Ser63Glu
 Asn61Asp + Asn62Ser
 Gln59Glu + Gly65Pro
 Gln59Ser + Asn61Asp
 Gln59Asp + Asn62Ser
 Gln59Asn + Gly65Ser
 Ser63Glu + Thr66Ser
 Asn61Ser + Ser63Asp
 Asn62Ser + Gly65Pro

Tabulka 4

Smyčka 1 - varianty s trojitou mutací

Gln59Ser + Ser63Asp + Gly65Pro
 Asn62Gln + Gly65Ser + Thr66Asp
 Gln59Ser + Asp60Glu + Thr66Gln
 Gln59Asn + Ser63Glu + Thr66Pro
 Asn61Ser + Gly65Asn + Thr66Glu
 Ser63Glu + Gly65Ser + Thr66Asn
 Asn62Asp + Gly65Ser + Thr66Gly
 Gln59Ser + Asn62Asp + Thr66Pro
 Gln59Ser + Asp60Glu + Asn61Gln
 Asn61Gln + Ser63Asp + Gly65Ser
 Asn62Glu + Gly65Asn + Thr66Gln
 Asp60Glu + Gly65Asn + Thr66Ser
 Asn62Ser + Ser63Asp + Thr66Gln
 Gln59Asp + Asn62Gln + Gly65Pro
 Asn62Ser + Ser63Glu + Thr66Gly
 Asn61Asp + Asn62Ser + Gly65Asn
 Asp60Glu + Asn61Gln + Asn62Ser
 Asp60Glu + Asn61Gln + Gly65Ser
 Asp60Glu + Gly65Pro + Thr66Asn
 Gln59Ser + Asn61Glu + Asn62Asp
 Asn61Asp + Asn62Asp + Gly65Pro
 Asn61Glu + Asn62Glu + Thr66Gln
 Gln59Asp + Asp60Glu + Thr66Gln
 Gln59Asp + Asp60Glu + Thr66Pro
 Asn62Asp + Ser63Asp + Gly65Asn
 Asn62Glu + Ser63Glu + Gly65Asn
 Asn62Asp + Ser63Glu + Gly65Gln
 Gln59Ser + Asn62Asp + Ser63Glu
 Asn62Glu + Ser63Asp + Gly65Ser
 Asn61Asp + Asn62Asp + Ser63Glu
 Gln59Glu + Asp60Glu + Asn61Glu
 Asp60Glu + Asn62Glu + Ser63Asp
 Asp60Glu + Asn61Glu + Ser63Glu
 Gln59Ser + Asp60Glu + Asn62Glu

Tabulka 5

Smyčka 1 - varianty se čtyřnásobnou mutací

Gln59Ser + Asp60Glu + Gly65Gln + Thr66Gln
 Gln59Ser + Asn62Ser + Ser63Asp + Gly65Gln
 Asp60Glu + Asn62Ser + Gly65Pro + Thr66Gln
 Asn62Gln + Ser63Glu + Gly65Pro + Thr66Gln
 Asn61Gln + Asn62Gln + Ser63Asp + Gly65Pro
 Gln59Asn + Asp60Glu + Asn61Gln + Gly65Asn
 Gln59Glu + Asn62Ser + Gly65Pro + Thr66Ser

Gln59Asn + Asn61Asp + Asn62Asp + Thr66Asn
 Gln59Asp + Asp60Glu + Asn62Ser + Gly65Ser
 Asn61Gln + Asn62Asp + Ser63Glu + Thr66Gln
 Asp60Glu + Asn61Asp + Asn62Glu + Gly65Ser
 Asn61Asp + Asn62Glu + Ser63Glu + Thr66Ser
 Asn61Asp + Asn62Glu + Ser63Asp + Gly65Ser
 Gln59Glu + Asp60Glu + Asn61Asp + Gly65Ser
 Asp60Glu + Asn62Asp + Ser63Glu + Thr66Pro
 Asp60Glu + Asn62Glu + Ser63Glu + Thr66Asn
 Asp60Glu + Asn62Glu + Ser63Asp + Gly65Ser
 Asp60Glu + Asn61Asp + Ser63Glu + Thr66Asn
 Gln59Ser + Asp60Glu + Asn61Asp + Ser63Asp
 Asp60Glu + Asn61Asp + Ser63Asp + Gly65Pro
 Asp60Glu + Asn61Asp + Ser63Asp + Thr66Gly
 Asp60Glu + Asn61Asp + Ser63Glu + Gly65Asn
 Gln59Ser + Asp60Glu + Asn62Asp + Thr66Gly
 Asp60Glu + Asn62Asp + Gly65Ser + Thr66Pro
 Asp60Glu + Asn61Gln + Asn62Glu + Gly65Ser
 Gln59Ser + Asp60Glu + Asn62Asp + Gly65Gln
 Asp60Glu + Asn61Ser + Asn62Gln + Ser63Glu
 Asp60Glu + Asn61Ser + Ser63Asp + Thr66Pro
 Gln59Ser + Asp60Glu + Asn61Gln + Ser63Glu
 Asp60Glu + Ser63Glu + Gly65Ser + Thr66Asn
 Gln59Asn + Asp60Glu + Ser63Asp + Gly65Gln
 Asp60Glu + Ser63Glu + Gly65Pro + Thr66Ser

Tabulka 6

Smyčka 2 - varianty s jedinou mutací

Val95Ala
 Val95Asn
 Val95Asp
 Val95Cys
 Val95Gln
 Val95Glu
 Val95Gly
 Val95His
 Val95Met
 Val95Pro
 Val95Ser
 Val95Thr
 Leu96Ala
 Leu96Asn
 Leu96Asp
 Leu96Cys
 Leu96Gln
 Leu96Glu
 Leu96Gly
 Leu96His
 Leu96Ile

Leu96Met
Leu96Pro
Leu96Ser
Leu96Thr
Leu96Val
Gly97Asn
Gly97Asp
Gly97Gln
Gly97Glu
Gly97Pro
Gly97Ser
Ala98Asn
Ala98Asp
Ala98Gln
Ala98Glu
Ala98Gly
Ala98His
Ala98Pro
Ala98Ser
Ala98Thr
Asp99Glu
Gly100Asn
Gly100Asp
Gly100Gln
Gly100Glu
Gly100Pro
Gly100Ser
Ser101Asp
Ser101Glu
Gly102Asn
Gly102Asp
Gly102Gln
Gly102Glu
Gly102Pro
Gly102Ser
Gln103Asn
Gln103Asp
Gln103Glu
Gln103Ser
Tyr104Ala
Tyr104Asn
Tyr104Asp
Tyr104Cys
Tyr104Gln
Tyr104Glu
Tyr104Gly
Tyr104His
Tyr104Ile
Tyr104Leu
Tyr104Met

Tyr104Pro
 Tyr104Ser
 Tyr104Thr
 Tyr104Val
 Ser105Asp
 Ser105Glu
 Trp106Ala
 Trp106Asn
 Trp106Asp
 Trp106Cys
 Trp106Gln
 Trp106Glu
 Trp106Gly
 Trp106His
 Trp106Ile
 Trp106Leu
 Trp106Met
 Trp106Phe
 Trp106Pro
 Trp106Ser
 Trp106Thr
 Trp106Tyr
 Trp106Val
 Ile107Ala
 Ile107Asn
 Ile107Asp
 Ile107Cys
 Ile107Gln
 Ile107Glu
 Ile107Gly
 Ile107His
 Ile107Leu
 Ile107Met
 Ile107Pro
 Ile107Ser
 Ile107Thr
 Ile107Val

Tabulka 7

Smyčka 2 - varianty s dvojitou mutací

Val 95Gln + Ser101Glu
 Gly 97Ser + Gly100Gln
 Ser105Glu + Trp106Gly
 Asp 99Glu + Gln103Asn
 Ala 98Gln + Trp106Thr
 Gly 97Asp + Ile107Thr
 Gly100Ser + Gly102Gln
 Leu 96Ser + Ser101Glu
 Asp 99Glu + Ile107Ala

Leu 96Asn + Asp 99Glu
Gly102Gln + Trp106Asp
Tyr104Leu + Trp106Glu
Tyr104Pro + Ile107Asp
Gly 97Ser + Ser101Asp
Gly100Pro + Ser101Glu
Val 95Asn + Ala 98Asp
Val 95Met + Ile107Gly
Asp 99Glu + Trp106Cys
Gly100Asn + Trp106Thr
Gln103Ser + Trp106Pro
Gly102Asp + Gln103Ser
Gly102Ser + Trp106Gln
Ser101Asp + Gly102Pro
Leu 96Cys + Trp106Asp
Asp 99Glu + Gly102Ser
Gly102Asp + Trp106Val
Gly 97Ser + Trp106Phe
Gln103Asp + Tyr104Thr
Ala 98His + Gly100Gln
Ser105Glu + Trp106Leu
Leu 96His + Tyr104Thr
Gly 97Pro + Ser101Glu
Val 95Thr + Trp106Ile
Gly100Asp + Tyr104Ile
Val 95Pro + Gln103Asn
Gln103Asn + Trp106Ile
Ala 98His + Gly102Pro
Trp106Asn + Ile107His
Val 95Gln + Leu 96Asp
Gly 97Asp + Ala 98Gln
Gly100Ser + Ser101Glu
Val 95Asp + Tyr104Gly
Tyr104Ala + Ser105Asp
Gly100Pro + Ser105Glu
Leu 96Cys + Tyr104Leu
Val 95Gly + Gly100Ser
Gly102Gln + Tyr104Ser
Ala 98Gly + Trp106Phe
Gly100Asp + Trp106Phe
Val 95Glu + Ala 98Gln
Ser101Glu + Tyr104Asn
Leu 96Val + Ser101Asp
Gly102Glu + Gln103Asn
Gly102Glu + Trp106Gly
Ala 98Gln + Gly100Asp
Gly100Gln + Gln103Ser
Gly 97Glu + Tyr104Leu
Ser101Asp + Gly102Ser
Ala 98His + Ser101Asp

Gly 97Asp + Gln103Asn

Tabulka 8

Smyčka 2 - varianty s trojitou mutací

Val 95Gln + Leu 96Thr + Ser101Glu
Ala 98His + Gln103Glu + Trp106Cys
Ala 98Gln + Ser101Glu + Tyr104Met
Ser101Asp + Gln103Ser + Ile107Cys
Ala 98Pro + Asp 99Glu + Gly102Pro
Val 95Pro + Gly 97Glu + Gly100Gln
Ser101Glu + Gly102Pro + Ile107His
Leu 96Pro + Gly100Pro + Gly102Asn
Gly100Glu + Gly102Asn + Trp106Tyr
Ala 98Asn + Gln103Glu + Ile107Ser
Gly 97Pro + Gly100Asp + Trp106Met
Gln103Asn + Tyr104Leu + Ser105Asp
Gly 97Pro + Ala 98Gln + Tyr104Cys
Ala 98Gly + Gly100Glu + Gln103Ser
Leu 96Ile + Gly 97Pro + Ser105Asp
Ala 98Pro + Gly100Pro + Ile107Ala
Val 95Pro + Gln103Asp + Ile107Met
Val 95Gln + Ser101Glu + Trp106Phe
Leu 96Val + Ser101Glu + Ile107Pro
Leu 96Gly + Gly 97Glu + Trp106Thr
Gly 97Asp + Tyr104Ser + Trp106His
Gly 97Ser + Gly100Pro + Tyr104Cys
Gln103Ser + Ser105Asp + Ile107His
Ala 98Glu + Tyr104Cys + Trp106Phe
Val 95Gln + Gly100Pro + Gly102Ser
Val 95Ala + Gly102Asp + Tyr104Ser
Val 95Ala + Leu 96Met + Ser105Asp
Gly102Gln + Trp106Leu + Ile107Gly
Leu 96Asn + Gly 97Glu + Ile107Pro
Gly100Pro + Gly102Gln + Gln103Glu
Gly 97Asp + Ala 98Asn + Trp106Leu
Ala 98Gln + Gly100Pro + Trp106His
Leu 96Thr + Gly100Asn + Ser105Glu
Val 95Ser + Leu 96Asn + Gly 97Pro
Gly100Gln + Ser105Glu + Trp106Gln
Gly 97Glu + Tyr104Thr + Trp106Val
Leu 96Ala + Ala 98Gln + Gly100Glu
Val 95His + Gly 97Gln + Ser101Glu
Val 95Pro + Gly102Asn + Gln103Glu
Gln103Asn + Trp106Ile + Ile107Ala
Gly 97Ser + Ala 98Glu + Tyr104Gln
Val 95Glu + Leu 96Ile + Ile107Gln
Leu 96Gln + Ala 98Ser + Asp 99Glu
Leu 96Pro + Ser101Glu + Gly102Pro
Gly 97Asn + Ala 98Pro + Gly100Pro

Gly 97Asn + Ala 98Glu + Gly100Asn
 Gly102Pro + Trp106Ala + Ile107Pro
 Gly100Ser + Gly102Glu + Trp106Cys
 Leu 96Thr + Gly102Glu + Ile107Val
 Leu 96Cys + Trp106Leu + Ile107Pro
 Leu 96Thr + Ser105Glu + Trp106Tyr
 Leu 96Ala + Gly100Asp + Ser101Asp
 Gly 97Asn + Ser101Glu + Gly102Asp
 Val 95Gln + Ser101Asp + Gly102Asp
 Asp 99Glu + Gly100Asp + Trp106Phe
 Tyr104Glu + Ser105Asp + Ile107Asp
 Leu 96Glu + Ser101Glu + Trp106Val
 Tyr104Met + Ser105Asp + Ile107Asp
 Gly 97Asp + Gly100Asp + Trp106Pro
 Val 95Ala + Gly 97Asp + Asp 99Glu

Tabulka 9

 Smyčka 2 - varianty se čtyřnásobnou mutací

Leu 96Gln + Gly 97Ser + Ser101Glu + Trp106Val
 Val 95Ala + Ala 98Gln + Gly100Asn + Gln103Asp
 Val 95Gln + Tyr104Ile + Trp106Gly + Ile107Pro
 Val 95Met + Leu 96Gly + Gly100Pro + Trp106Gly
 Ala 98Gln + Gly100Pro + Tyr104Thr + Trp106His
 Gly 97Pro + Ala 98His + Gly100Pro + Ile107Asp
 Ala 98Pro + Gly100Glu + Trp106Ser + Ile107Met
 Leu 96Gln + Gly 97Ser + Ser105Asp + Ile107Val
 Ala 98Gly + Ser101Asp + Trp106Ala + Ile107Gln
 Val 95Ser + Gly 97Ser + Asp 99Glu + Gln103Ser
 Leu 96Thr + Gly 97Ser + Asp 99Glu + Tyr104Asn
 Val 95Thr + Leu 96Gln + Ala 98Pro + Ser105Glu
 Val 95Gly + Gly 97Ser + Tyr104Asn + Trp106Glu
 Leu 96Gln + Gly 97Ser + Tyr104Thr + Ile107Glu
 Val 95Ser + Leu 96Pro + Gly100Gln + Ser101Asp
 Leu 96Met + Gly100Ser + Ser101Asp + Trp106Asn
 Leu 96Ile + Ala 98Ser + Gly100Pro + Gly102Glu
 Val 95Asn + Ala 98Gly + Gln103Ser + Tyr104Val
 Gly 97Asn + Asp 99Glu + Gly102Asn + Trp106His
 Gly 97Ser + Gly102Asp + Gln103Asp + Ile107His
 Val 95Pro + Gly100Glu + Ser101Glu + Tyr104Gly
 Ala 98Pro + Gly100Asp + Ser101Asp + Ile107Cys
 Leu 96Gly + Ser101Asp + Gly102Asp + Ile107Gly
 Val 95His + Tyr104Asp + Ser105Asp + Trp106Ala
 Gly102Pro + Ser105Asp + Trp106Asp + Ile107Thr
 Leu 96Glu + Ala 98Gln + Gly102Asp + Tyr104Pro
 Ala 98Thr + Asp 99Glu + Gly100Glu + Ser101Glu
 Gly 97Ser + Ala 98Glu + Asp 99Glu + Gly100Glu
 Leu 96Asp + Gly 97Glu + Gly100Glu + Ile107Asn
 Leu 96Asn + Gly100Asp + Ser101Asp + Gly102Glu
 Val 95Gly + Ser101Glu + Gly102Asp + Gln103Asp

Val 95His + Leu 96Glu + Gly100Gln + Ser101Glu
 Leu 96Glu + Gly100Gln + Ser101Asp + Gly102Ser
 Gly 97Asp + Gly100Asp + Gly102Pro + Ile107Gly
 Gly 97Glu + Asp 99Glu + Gly100Pro + Tyr104Ser
 Leu 96Ile + Gly 97Gln + Gln103Glu + Ser105Glu
 Gln103Asp + Ser105Asp + Trp106Asn + Ile107His
 Val 95Pro + Ala 98Pro + Gln103Glu + Ser105Asp
 Val 95His + Asp 99Glu + Ser101Glu + Gly102Pro
 Leu 96Asn + Asp 99Glu + Gly100Asn + Ser101Glu
 Ala 98Asp + Asp 99Glu + Ser101Asp + Ile107Pro
 Leu 96Thr + Gly 97Glu + Gly100Glu + Gly102Asp
 Val 95Glu + Gly102Asp + Tyr104Ser + Ile107Glu
 Leu 96Gly + Gly102Asp + Gln103Asp + Ser105Glu
 Gly102Glu + Gln103Glu + Ser105Glu + Trp106Cys
 Asp 99Glu + Ser101Glu + Gly102Glu + Gln103Asn
 Asp 99Glu + Ser101Glu + Gly102Glu + Trp106Gly
 Gly102Glu + Gln103Asn + Tyr104Asp + Ile107Thr
 Val 95His + Leu 96Val + Gln103Glu + Ile107Glu
 Gly 97Ser + Gly102Ser + Gln103Glu + Ile107Glu
 Val 95Glu + Leu 96Asp + Gln103Asp + Ile107Asn
 Val 95Thr + Gly102Glu + Trp106Tyr + Ile107Asp
 Val 95Glu + Gly 97Glu + Ala 98Gly + Gly100Asp
 Leu 96Ala + Gly 97Pro + Ala 98Asp + Ser101Asp
 Val 95Asp + Leu 96Asp + Tyr104Glu + Ile107Ser
 Val 95Pro + Gly102Glu + Tyr104Pro + Ser105Asp
 Leu 96Asn + Gly102Asp + Gln103Asn + Ser105Glu
 Leu 96Asn + Gly102Asp + Tyr104Ala + Ser105Glu
 Leu 96Ser + Gly 97Gln + Gly102Glu + Ser105Asp
 Leu 96Thr + Asp 99Glu + Gly102Asp + Ile107Gly

Tabulka 10

Smyčka 3 - varianty s jedinou mutací

Leu126Ala
 Leu126Asn
 Leu126Asp
 Leu126Cys
 Leu126Gln
 Leu126Glu
 Leu126Gly
 Leu126His
 Leu126Ile
 Leu126Met
 Leu126Pro
 Leu126Ser
 Leu126Thr
 Leu126Val
 Gly127Asn
 Gly127Asp
 Gly127Gln

Gly127Glu
Gly127Pro
Gly127Ser
Gly128Asn
Gly128Asp
Gly128Gln
Gly128Glu
Gly128Pro
Gly128Ser
Pro129Asn
Pro129Asp
Pro129Gln
Pro129Glu
Pro129Gly
Pro129Ser
Ser130Asp
Ser130Glu
Gly131Asn
Gly131Asp
Gly131Gln
Gly131Glu
Gly131Pro
Gly131Ser
Ser132Asp
Ser132Glu
Ala133Asn
Ala133Asp
Ala133Gln
Ala133Glu
Ala133Gly
Ala133His
Ala133Pro
Ala133Ser
Ala133Thr

Tabulka 11

Smýčka 3 - varianty s dvojitou mutací

Leu126Gln + Ser130Glu
Gly131Gln + Ala133Asn
Pro129Asp + Gly131Gln
Gly128Ser + Ser130Glu
Leu126Pro + Ala133Gly
Gly127Asp + Ala133Gly
Leu126Asp + Pro129Gln
Gly131Asn + Ala133Gln
Gly127Pro + Gly131Glu
Gly128Asn + Gly131Asp
Pro129Gln + Ser130Glu
Gly128Pro + Ser130Asp

Gly128Gln + Pro129Ser
Gly128Asn + Pro129Gly
Leu126Val + Ser130Asp
Leu126Val + Pro129Ser
Leu126Cys + Pro129Glu
Gly127Asp + Ala133Thr
Gly128Pro + Pro129Glu
Gly127Ser + Gly131Asp
Leu126His + Pro129Asp
Gly131Pro + Ala133Glu
Gly127Ser + Gly128Ser
Pro129Asn + Gly131Glu
Leu126Val + Pro129Asp
Pro129Gly + Ala133Asp
Leu126Val + Ser130Glu
Pro129Glu + Ala133Pro
Pro129Gly + Ser130Asp
Leu126His + Gly128Glu
Gly128Asn + Ser132Glu
Gly127Pro + Ser132Asp
Gly127Gln + Pro129Gln
Gly128Pro + Pro129Asp
Gly128Asn + Ser130Glu
Leu126Cys + Pro129Asn
Pro129Asn + Ser132Glu
Leu126Ser + Ser132Asp
Gly128Glu + Gly131Ser
Pro129Asn + Ser130Asp
Leu126Ser + Ser132Glu
Pro129Gln + Gly131Pro
Gly127Asp + Gly128Gln
Gly128Gln + Pro129Glu
Gly127Pro + Pro129Gly
Pro129Gln + Ala133Gln
Leu126Val + Gly128Asp
Gly128Ser + Ser132Glu
Leu126Asn + Pro129Gly
Leu126Ile + Ala133Gly
Gly128Ser + Gly131Gln
Gly127Ser + Ser130Asp
Leu126Cys + Ser132Asp
Gly127Pro + Ser130Glu
Leu126His + Ala133Asp
Gly131Ser + Ala133Glu
Gly131Pro + Ala133Gln
Gly131Asp + Ala133Ser
Leu126Asp + Ala133Asn
Leu126Glu + Pro129Gln

Tabulka 12

Smyčka 3 - varianty s trojitou mutací

Leu126His + Pro129Glu + Ala133Asn
 Leu126Asp + Gly128Ser + Gly131Gln
 Pro129Asn + Gly131Ser + Ser132Glu
 Gly128Pro + Pro129Asn + Ser130Glu
 Gly128Gln + Ser130Glu + Ala133Ser
 Gly131Gln + Ser132Glu + Ala133Gln
 Gly128Asp + Gly131Ser + Ala133Asn
 Gly131Ser + Ser132Asp + Ala133Pro
 Pro129Ser + Gly131Gln + Ala133Glu
 Gly128Asn + Ser130Glu + Gly131Gln
 Leu126Gly + Gly127Gln + Gly131Pro
 Leu126Pro + Gly127Glu + Gly128Pro
 Leu126Ser + Pro129Ser + Ser132Asp
 Gly128Ser + Ser132Glu + Ala133Asn
 Leu126Val + Ser132Glu + Ala133Gln
 Pro129Gly + Ser130Glu + Gly131Pro
 Leu126Thr + Gly127Pro + Ala133Asn
 Leu126His + Ser130Asp + Ala133Pro
 Leu126Cys + Gly127Ser + Pro129Ser
 Leu126Gly + Ser132Asp + Ala133Ser
 Gly128Gln + Pro129Gln + Gly131Asn
 Gly128Asp + Gly131Asn + Ala133His
 Leu126Cys + Ser130Glu + Ala133Gly
 Gly127Ser + Ser130Asp + Ala133Gly
 Leu126His + Pro129Asn + Ser130Asp
 Leu126Asn + Gly131Asp + Ala133Gln
 Leu126Met + Gly128Asn + Ser132Asp
 Leu126Glu + Gly127Gln + Ala133His
 Leu126Met + Ser132Asp + Ala133His
 Ser130Glu + Gly131Gln + Ala133Gln
 Gly127Pro + Gly128Ser + Ala133Ser
 Leu126Ala + Pro129Gly + Ser132Glu
 Gly131Asn + Ser132Asp + Ala133Asn
 Leu126Val + Gly131Asp + Ala133Ser
 Leu126Ser + Gly127Asn + Ala133Gln
 Pro129Gln + Ser130Glu + Ala133His
 Leu126Met + Gly127Ser + Ser130Asp
 Leu126Cys + Pro129Asn + Gly131Asp
 Pro129Ser + Ser130Asp + Ala133Asn
 Leu126Ser + Pro129Gly + Ser132Glu
 Gly127Ser + Pro129Gln + Ser132Asp
 Gly127Pro + Gly128Asn + Pro129Gln
 Leu126His + Ser132Asp + Ala133Asn
 Gly128Pro + Pro129Glu + Ala133Thr
 Pro129Ser + Gly131Glu + Ala133Pro
 Leu126His + Gly128Pro + Pro129Gln

Leu126Met + Gly127Asp + Gly128Asp
 Gly128Pro + Gly131Glu + Ser132Asp
 Gly131Asp + Ser132Glu + Ala133Pro
 Gly128Glu + Pro129Glu + Ala133Asn
 Pro129Ser + Ser132Glu + Ala133Glu
 Leu126Asn + Ser130Glu + Gly131Asp
 Pro129Asn + Ser130Glu + Gly131Asp
 Leu126His + Ser130Glu + Gly131Glu
 Pro129Glu + Ser130Asp + Gly131Asn
 Gly127Ser + Pro129Asp + Ser130Asp
 Ser130Asp + Gly131Asp + Ser132Asp
 Gly128Asp + Ser130Glu + Gly131Asn
 Leu126Met + Gly128Glu + Ser130Asp
 Gly128Asp + Pro129Asn + Ser130Glu

Tabulka 13

Smýčka 3 - varianty se čtyřnásobnou mutací

Leu126Ser + Pro129Asn + Ser130Asp + Ala133His
 Leu126Met + Pro129Ser + Ser132Glu + Ala133Asn
 Gly127Ser + Gly131Gln + Ser132Glu + Ala133Gln
 Leu126Asn + Gly127Pro + Gly128Glu + Pro129Gly
 Leu126Asn + Pro129Gly + Gly131Asp + Ala133Gly
 Leu126Gly + Pro129Gly + Ser132Glu + Ala133Pro
 Leu126Gly + Gly127Asp + Pro129Gly + Gly131Pro
 Gly127Asn + Pro129Gln + Gly131Asp + Ala133Gly
 Leu126Pro + Gly127Ser + Gly128Gln + Ser130Glu
 Leu126Ala + Gly127Gln + Pro129Asn + Ser130Glu
 Leu126Asn + Gly127Ser + Ser130Glu + Ala133Thr
 Gly128Gln + Pro129Gln + Ser130Asp + Gly131Ser
 Leu126His + Gly128Ser + Gly131Ser + Ser132Asp
 Leu126Gln + Pro129Ser + Ser130Asp + Ala133His
 Leu126Val + Gly128Pro + Pro129Asn + Ala133Asp
 Leu126Val + Pro129Gly + Ser130Glu + Ala133Thr
 Leu126Thr + Gly127Pro + Ser132Glu + Ala133Thr
 Gly128Asp + Pro129Gly + Gly131Pro + Ala133Ser
 Leu126Asn + Gly128Glu + Pro129Gln + Gly131Pro
 Leu126Pro + Gly127Pro + Pro129Ser + Ser130Asp
 Gly127Pro + Gly128Gln + Gly131Glu + Ser132Glu
 Leu126Ile + Gly127Gln + Gly131Asp + Ser132Glu
 Leu126Val + Gly131Asp + Ser132Asp + Ala133Pro
 Gly128Asp + Pro129Asp + Gly131Asn + Ala133Pro
 Pro129Asn + Gly131Ser + Ser132Asp + Ala133Asp
 Leu126Gln + Gly131Pro + Ser132Asp + Ala133Asp
 Gly127Pro + Ser130Glu + Gly131Glu + Ala133His
 Leu126Gln + Pro129Gln + Ser130Asp + Gly131Glu
 Gly127Ser + Ser130Asp + Gly131Glu + Ala133Gln
 Leu126Ser + Gly127Pro + Pro129Glu + Ser130Glu
 Ser130Glu + Gly131Glu + Ser132Glu + Ala133Ser
 Gly127Gln + Ser130Glu + Gly131Asp + Ser132Asp

Gly128Gln + Ser130Glu + Gly131Asp + Ser132Asp
 Gly127Asn + Ser130Glu + Gly131Asp + Ser132Asp
 Gly127Ser + Pro129Asp + Ser130Glu + Gly131Glu
 Gly127Asn + Pro129Asp + Ser130Asp + Gly131Asp
 Gly128Asn + Pro129Glu + Ser130Glu + Gly131Asp
 Leu126Ser + Gly128Asp + Ser130Glu + Ala133Pro
 Gly127Asn + Gly128Asp + Ser130Glu + Ala133Pro
 Gly128Glu + Ser130Glu + Gly131Pro + Ala133His
 Leu126Val + Ser130Asp + Ser132Asp + Ala133Asn
 Pro129Ser + Ser130Glu + Ser132Asp + Ala133Gly
 Leu126His + Ser130Glu + Ser132Asp + Ala133His
 Leu126Ala + Ser130Glu + Ser132Glu + Ala133Asn
 Gly127Pro + Gly128Gln + Ser130Asp + Ser132Glu
 Leu126Ser + Ser130Asp + Gly131Pro + Ser132Asp
 Ser130Glu + Gly131Pro + Ser132Glu + Ala133Ser
 Gly128Gln + Ser130Asp + Gly131Ser + Ser132Glu
 Leu126Ala + Pro129Asn + Ser130Asp + Ser132Glu
 Gly127Gln + Gly128Pro + Pro129Glu + Gly131Asp
 Gly128Gln + Pro129Asp + Gly131Glu + Ala133Asn
 Leu126Asn + Pro129Glu + Gly131Asp + Ala133Ser
 Leu126Met + Pro129Glu + Gly131Glu + Ala133Thr
 Gly127Asp + Gly128Gln + Pro129Asp + Ala133Gln
 Leu126His + Pro129Gly + Gly131Glu + Ala133Glu
 Gly128Glu + Pro129Gly + Gly131Asp + Ala133Asn
 Pro129Gly + Ser130Glu + Ser132Asp + Ala133Glu
 Leu126Gln + Ser130Glu + Ser132Glu + Ala133Glu
 Leu126Gly + Pro129Asp + Ser130Glu + Ser132Glu
 Pro129Asp + Ser130Glu + Gly131Ser + Ser132Asp

Tabulka 14

Smyčka 4 - varianty s jedinou mutací

Gly154Asn
 Gly154Asp
 Gly154Gln
 Gly154Glu
 Gly154Pro
 Gly154Ser
 Asn155Asp
 Asn155Gln
 Asn155Glu
 Asn155Ser
 Glu156Asp
 Gly157Asn
 Gly157Asp
 Gly157Gln
 Gly157Glu
 Gly157Pro
 Gly157Ser
 Thr158Asn

Thr158Asp
Thr158Gln
Thr158Glu
Thr158Gly
Thr158Pro
Thr158Ser
Ser159Asp
Ser159Glu
Gly160Asn
Gly160Asp
Gly160Gln
Gly160Glu
Gly160Pro
Gly160Ser
Ser161Asp
Ser161Glu
Ser162Asp
Ser162Glu
Ser163Asp
Ser163Glu
Thr164Asn
Thr164Asp
Thr164Gln
Thr164Glu
Thr164Gly
Thr164Pro
Thr164Ser
Val165Ala
Val165Asn
Val165Asp
Val165Cys
Val165Gln
Val165Glu
Val165Gly
Val165His
Val165Met
Val165Pro
Val165Ser
Val165Thr
Gly166Asn
Gly166Asp
Gly166Gln
Gly166Glu
Gly166Pro
Gly166Ser
Tyr167Ala
Tyr167Asn
Tyr167Asp
Tyr167Cys
Tyr167Gln

Tyr167Glu
 Tyr167Gly
 Tyr167His
 Tyr167Ile
 Tyr167Leu
 Tyr167Met
 Tyr167Pro
 Tyr167Ser
 Tyr167Thr
 Tyr167Val

Tabulka 15

Smyčka 4 - varianty s dvojitou mutací

Asn155Ser + Glu156Asp
 Gly154Ser + Tyr167Gln
 Gly154Glu + Val165Ala
 Asn155Glu + Thr164Pro
 Gly157Pro + Ser159Asp
 Gly154Ser + Ser161Asp
 Ser161Glu + Val165Pro
 Gly154Gln + Ser161Glu
 Asn155Asp + Thr158Pro
 Thr164Asn + Gly166Gln
 Asn155Glu + Tyr167His
 Glu156Asp + Thr158Gly
 Gly154Pro + Gly157Glu
 Asn155Ser + Tyr167Asp
 Thr158Pro + Gly166Asp
 Thr164Gln + Tyr167Glu
 Gly157Gln + Thr158Glu
 Thr158Asn + Ser162Asp
 Gly154Asn + Tyr167Glu
 Gly157Gln + Ser161Asp
 Thr164Asp + Tyr167Ala
 Gly160Asp + Val165His
 Gly154Glu + Gly157Ser
 Glu156Asp + Tyr167Ile
 Asn155Ser + Thr158Asp
 Gly157Gln + Thr164Pro
 Thr164Ser + Tyr167Ile
 Ser159Glu + Tyr167Thr
 Thr164Glu + Val165Gln
 Thr158Gly + Gly160Ser
 Ser161Asp + Gly166Pro
 Gly154Glu + Gly166Ser
 Gly160Asp + Val165Asn
 Ser162Glu + Val165Gln
 Gly157Asn + Ser159Glu
 Ser161Asp + Val165Asn

Asn155Asp + Val165Pro
 Glu156Asp + Gly166Ser
 Gly154Pro + Ser159Asp
 Gly154Ser + Tyr167Cys
 Gly160Pro + Thr164Asp
 Ser161Glu + Val165Gly
 Ser162Glu + Tyr167Asn
 Gly154Asn + Gly166Glu
 Ser161Glu + Tyr167Ala
 Gly160Gln + Val165Pro
 Gly154Glu + Val165Gly
 Gly160Ser + Ser163Asp
 Gly157Glu + Thr158Asn
 Gly160Asp + Val165Pro
 Gly160Asn + Ser162Asp
 Thr164Gln + Gly166Gln
 Asn155Ser + Thr158Gln
 Ser161Glu + Tyr167Gly
 Ser162Asp + Gly166Ser
 Gly154Glu + Thr158Gly
 Gly154Ser + Thr158Ser
 Gly157Asp + Gly160Pro
 Ser163Glu + Val165His
 Gly154Pro + Gly166Asp

Tabulka 16

Smyčka 4 - varianty s trojitou mutací

Gly154Gln + Asn155Ser + Glu156Asp
 Gly154Ser + Gly160Asp + Tyr167Gln
 Asn155Glu + Gly157Ser + Thr164Pro
 Gly157Asn + Ser159Asp + Gly160Ser
 Glu156Asp + Gly160Ser + Val165Thr
 Gly160Pro + Ser162Glu + Thr164Asn
 Gly154Ser + Glu156Asp + Thr158Gln
 Gly160Asn + Ser162Glu + Gly166Ser
 Gly160Ser + Val165Gly + Gly166Gln
 Thr158Gln + Ser162Asp + Tyr167Val
 Gly157Gln + Ser162Glu + Tyr167Leu
 Ser162Glu + Thr164Gln + Val165Cys
 Gly157Ser + Val165Met + Gly166Glu
 Gly154Ser + Glu156Asp + Gly166Pro
 Thr158Ser + Ser161Asp + Thr164Gly
 Glu156Asp + Gly157Ser + Gly160Asn
 Gly154Gln + Asn155Asp + Gly166Ser
 Ser163Glu + Val165Thr + Tyr167Pro
 Gly157Asp + Thr158Gln + Val165Ser
 Gly157Asn + Ser159Asp + Gly166Ser
 Gly160Gln + Ser163Glu + Val165Met
 Gly154Asn + Asn155Asp + Gly157Pro

Glu156Asp + Thr158Asn + Val165Cys
 Thr158Asn + Gly160Glu + Thr164Pro
 Gly154Asn + Gly157Pro + Thr158Gln
 Asn155Glu + Gly157Ser + Thr158Gln
 Thr158Glu + Gly160Ser + Tyr167Val
 Asn155Gln + Glu156Asp + Thr164Ser
 Asn155Ser + Ser162Glu + Val165Met
 Gly154Gln + Thr158Gly + Gly166Asp
 Ser163Glu + Val165Ala + Gly166Asn
 Asn155Ser + Gly160Glu + Thr164Gln
 Gly157Asp + Thr164Ser + Gly166Pro
 Ser163Asp + Thr164Glu + Tyr167Met
 Ser163Asp + Thr164Asp + Val165Met
 Glu156Asp + Gly157Asp + Thr164Gln
 Gly157Gln + Gly166Asp + Tyr167Glu
 Ser161Asp + Ser162Glu + Tyr167His
 Gly154Asn + Ser159Glu + Ser162Glu
 Ser159Asp + Ser162Glu + Val165Cys
 Ser159Glu + Gly160Ser + Ser161Asp
 Thr158Asp + Ser161Glu + Ser162Glu
 Ser161Glu + Ser163Asp + Thr164Ser
 Ser161Glu + Ser163Glu + Val165His
 Asn155Glu + Glu156Asp + Thr158Glu
 Gly157Glu + Thr164Glu + Val165Gly
 Ser161Asp + Ser163Glu + Thr164Glu
 Gly157Glu + Thr158Gln + Ser159Glu
 Gly157Glu + Ser159Asp + Tyr167Cys
 Gly157Asp + Ser163Glu + Thr164Glu
 Ser159Glu + Ser163Asp + Thr164Gly
 Ser159Asp + Ser163Asp + Thr164Asn
 Thr158Asp + Ser161Asp + Ser163Glu
 Thr158Glu + Ser162Asp + Thr164Asn
 Thr158Glu + Ser162Asp + Val165Thr
 Gly157Ser + Thr158Asp + Ser162Glu
 Thr158Asp + Ser163Glu + Thr164Asn
 Thr158Glu + Ser163Asp + Tyr167Gly
 Glu156Asp + Gly166Glu + Tyr167Ile
 Asn155Glu + Gly157Pro + Thr164Asp

Tabulka 17

Smyčka 4 - varianty se čtyřnásobnou mutací

Ser159Glu + Thr164Ser + Val165Thr + Gly166Pro
 Asn155Ser + Gly157Pro + Val165Ser + Gly166Glu
 Gly157Asn + Val165Pro + Gly166Glu + Tyr167Val
 Thr158Ser + Gly160Gln + Val165His + Gly166Asp
 Gly154Ser + Gly157Pro + Ser163Glu + Thr164Ser
 Gly157Gln + Gly160Asp + Thr164Ser + Val165Asn
 Gly157Asn + Gly160Asp + Val165Cys + Tyr167Leu
 Glu156Asp + Thr158Ser + Val165Asn + Gly166Pro

Glu156Asp + Thr158Pro + Thr164Gln + Val165Pro
 Asn155Gln + Glu156Asp + Thr164Gly + Val165Thr
 Thr158Gly + Gly160Ser + Ser163Asp + Tyr167Asn
 Ser159Asp + Gly160Gln + Gly166Ser + Tyr167Pro
 Gly154Pro + Thr164Gln + Val165Gly + Gly166Asp
 Gly154Asn + Gly160Pro + Ser161Glu + Gly166Pro
 Asn155Ser + Gly157Asn + Thr164Gln + Tyr167Asp
 Gly157Asn + Thr158Asn + Ser163Glu + Val165Gln
 Gly160Glu + Ser161Asp + Val165Met + Tyr167Pro
 Asn155Glu + Glu156Asp + Thr158Gln + Gly166Pro
 Asn155Asp + Glu156Asp + Val165Asn + Gly166Asn
 Asn155Asp + Glu156Asp + Gly160Ser + Thr164Asn
 Gly154Ser + Thr158Gln + Ser162Glu + Ser163Glu
 Gly154Asn + Asn155Gln + Ser163Glu + Thr164Glu
 Glu156Asp + Gly157Glu + Gly160Gln + Thr164Gly
 Glu156Asp + Gly157Glu + Thr158Ser + Val165Cys
 Gly154Pro + Gly157Pro + Thr158Asp + Ser159Asp
 Gly154Ser + Gly157Asn + Thr158Glu + Ser159Glu
 Gly157Pro + Gly160Pro + Gly166Asp + Tyr167Glu
 Gly154Asn + Ser161Glu + Ser162Glu + Tyr167Asn
 Gly154Asp + Asn155Asp + Thr164Gln + Gly166Asn
 Gly154Gln + Ser159Glu + Gly160Glu + Ser161Asp
 Thr158Ser + Ser159Asp + Gly160Asp + Ser161Asp
 Asn155Ser + Glu156Asp + Gly157Asp + Thr158Glu
 Gly157Asn + Ser159Asp + Ser161Glu + Ser162Glu
 Gly154Asn + Glu156Asp + Gly157Glu + Thr164Glu
 Gly157Gln + Gly160Asp + Ser162Asp + Val165Thr
 Gly160Glu + Ser162Asp + Thr164Asn + Gly166Gln
 Gly154Asp + Asn155Ser + Glu156Asp + Thr164Ser
 Gly154Asp + Glu156Asp + Gly157Glu + Thr158Gly
 Gly154Gln + Gly157Pro + Ser159Asp + Ser161Asp
 Ser159Glu + Ser161Asp + Gly166Ser + Tyr167His
 Ser159Asp + Ser161Asp + Gly166Pro + Tyr167Ser
 Glu156Asp + Thr158Glu + Val165Ala + Gly166Gln
 Glu156Asp + Thr158Asp + Gly166Pro + Tyr167Ala
 Asn155Gln + Thr158Asp + Thr164Asp + Tyr167Val
 Ser163Glu + Thr164Asp + Val165Met + Gly166Glu
 Ser161Asp + Ser163Asp + Val165Thr + Tyr167His
 Ser161Asp + Ser163Glu + Thr164Gln + Gly166Asn
 Gly157Pro + Ser159Glu + Ser161Asp + Ser163Glu
 Gly154Pro + Glu156Asp + Ser163Asp + Thr164Glu
 Asn155Asp + Glu156Asp + Thr158Asp + Thr164Asn
 Glu156Asp + Ser159Asp + Thr164Asp + Val165Ala
 Thr158Gln + Ser159Asp + Ser163Glu + Val165Cys
 Gly154Gln + Ser159Asp + Ser163Asp + Gly166Pro
 Asn155Ser + Gly160Asp + Ser162Glu + Thr164Asp
 Gly154Gln + Gly160Asp + Ser162Glu + Thr164Glu
 Glu156Asp + Gly160Pro + Val165Pro + Gly166Glu
 Gly160Glu + Ser163Asp + Thr164Gly + Tyr167Leu
 Gly160Glu + Ser163Glu + Thr164Pro + Gly166Gln

Asn155Asp + Thr158Pro + Ser163Glu + Thr164Asp
 Asn155Ser + Glu156Asp + Ser163Asp + Gly166Glu

Tabulka 18

Smyčka 5 - varianty s jedinou mutací

Ala187Asn
 Ala187Asp
 Ala187Gln
 Ala187Glu
 Ala187Gly
 Ala187His
 Ala187Pro
 Ala187Ser
 Ala187Thr
 Ser188Asp
 Ser188Glu
 Phe189Ala
 Phe189Asn
 Phe189Asp
 Phe189Cys
 Phe189Gln
 Phe189Glu
 Phe189Gly
 Phe189His
 Phe189Ile
 Phe189Leu
 Phe189Met
 Phe189Pro
 Phe189Ser
 Phe189Thr
 Phe189Tyr
 Phe189Val
 Ser190Asp
 Ser190Glu
 Ser191Asp
 Ser191Glu

Tabulka 19

Smyčka 5 - varianty s dvojitou mutací

Ala187Asp + Phe189Gln
 Ala187Ser + Ser188Asp
 Ser188Glu + Phe189Pro
 Ala187Asp + Phe189His
 Ala187Asn + Ser191Glu
 Ala187Gln + Ser191Asp
 Ala187Glu + Phe189Pro
 Ala187Pro + Phe189Asp

Ser188Asp + Phe189Cys
Phe189His + Ser191Asp
Ser188Glu + Phe189Ala
Ala187His + Ser188Asp
Ala187Asn + Ser188Glu
Ser188Glu + Phe189Gln
Ala187Asp + Phe189Ser
Ser188Asp + Phe189Val
Ala187Gln + Ser188Glu
Ala187Ser + Ser188Glu
Ala187Pro + Ser191Asp
Ser188Glu + Phe189Val
Phe189Ser + Ser191Glu
Ala187Gly + Ser191Glu
Ala187Asn + Ser191Asp
Ala187Thr + Ser191Asp
Ala187His + Ser188Glu
Ser188Glu + Phe189Gly
Ala187Ser + Phe189Ile
Ser188Glu + Phe189Met
Phe189Asn + Ser191Asp
Ala187Gln + Phe189Tyr
Ala187Gln + Ser191Glu
Ala187Ser + Phe189Ala
Phe189Val + Ser191Asp
Ser188Glu + Phe189Leu
Ala187Pro + Ser188Glu
Phe189Asn + Ser191Glu
Phe189Ile + Ser191Asp
Ala187Glu + Phe189Met
Ala187His + Ser191Glu
Ser188Asp + Phe189Tyr
Ala187Gly + Phe189Val
Ser188Asp + Phe189Gln
Ala187Gly + Phe189Tyr
Ala187Gln + Phe189Asp
Phe189Tyr + Ser191Glu
Ala187Ser + Ser191Asp
Ala187Thr + Ser188Glu
Ala187Asn + Ser188Asp
Ala187Gly + Ser188Asp
Ala187Gly + Phe189Cys
Phe189Cys + Ser191Glu
Ala187Asp + Phe189Gly
Ser188Asp + Phe189Leu
Ser188Asp + Phe189Gly
Ala187Asn + Phe189Asp
Ala187Pro + Ser191Glu
Phe189Met + Ser191Asp
Ala187Thr + Ser188Asp

Phe189Ala + Ser191Glu
Phe189Leu + Ser191Glu

Tabulka 20

Smyčka 5 - varianty s trojitou mutací

Ala187Pro + Phe189Cys + Ser191Glu
Ala187Thr + Phe189Tyr + Ser191Glu
Ala187Ser + Ser188Glu + Phe189Ser
Ala187Gln + Phe189Asn + Ser191Glu
Ala187Gln + Ser188Asp + Phe189His
Ala187Gln + Ser188Glu + Phe189His
Ala187Gly + Ser188Asp + Phe189Met
Ala187Gly + Ser188Asp + Phe189Cys
Ala187Pro + Phe189His + Ser191Glu
Ala187Pro + Phe189Gln + Ser191Glu
Ala187Asn + Ser188Asp + Phe189Asn
Ala187Gly + Ser188Glu + Phe189Ser
Ala187Gln + Phe189Met + Ser191Asp
Ala187Gly + Ser188Asp + Phe189Pro
Ala187Thr + Phe189His + Ser191Asp
Ala187Asn + Ser188Glu + Phe189Cys
Ala187Gln + Phe189Val + Ser191Glu
Ala187Pro + Phe189Met + Ser191Glu
Ala187Ser + Ser188Glu + Phe189His
Ala187Ser + Phe189Gln + Ser191Asp
Ala187Gln + Ser188Asp + Phe189Pro
Ala187Gly + Ser188Asp + Phe189Gly
Ala187His + Phe189Gln + Ser191Glu
Ala187Thr + Ser188Glu + Phe189Ile
Ala187Pro + Phe189Gly + Ser191Glu
Ala187Thr + Phe189Met + Ser191Glu
Ala187Gly + Phe189Thr + Ser191Glu
Ala187Gln + Phe189Leu + Ser191Glu
Ala187Thr + Phe189Thr + Ser191Asp
Ala187Gln + Ser188Asp + Phe189Met
Ala187Pro + Phe189Ser + Ser191Glu
Ala187Asp + Ser188Glu + Phe189Val
Ala187Glu + Ser188Glu + Phe189Ser
Ala187Asp + Ser188Glu + Phe189Met
Ala187Asp + Ser188Asp + Phe189Gln
Ala187Asp + Ser188Glu + Phe189Cys
Ala187Asp + Ser188Glu + Phe189Tyr
Ala187Glu + Ser188Glu + Phe189Tyr
Ala187Asp + Ser188Asp + Phe189Gly
Ala187Glu + Ser188Glu + Phe189Leu
Ala187Asp + Ser188Glu + Phe189Ser
Ala187Glu + Ser188Asp + Phe189Gly
Ala187Asp + Ser188Asp + Phe189Pro
Ala187Asp + Ser188Glu + Phe189His
Ala187Glu + Ser188Glu + Phe189Thr

Ala187Glu + Ser188Asp + Phe189Ile
 Ala187Glu + Ser188Asp + Phe189Asn
 Ala187Ser + Ser188Glu + Phe189Glu
 Ala187Gly + Ser188Asp + Phe189Glu
 Ala187Gly + Ser188Glu + Phe189Asp
 Ala187Pro + Ser188Glu + Phe189Asp
 Ala187Asp + Ser188Glu + Phe189Glu
 Ala187Glu + Ser188Asp + Phe189Asp
 Ala187Asp + Ser188Glu + Phe189Asp
 Ala187Glu + Ser188Glu + Phe189Glu
 Ala187Gly + Phe189Glu + Ser191Asp
 Ala187Gly + Phe189Glu + Ser191Glu
 Ala187Thr + Phe189Glu + Ser191Glu
 Ser188Glu + Phe189Glu + Ser191Glu
 Ser188Glu + Phe189Glu + Ser191Asp

Tabulka 21

Smyčka 5 - varianty se čtyřnásobnou mutací

Ala187Ser + Ser188Glu + Phe189Asp + Ser191Asp
 Ala187Pro + Ser188Glu + Phe189Glu + Ser191Glu
 Ala187His + Ser188Glu + Phe189Asp + Ser191Glu
 Ala187Gly + Ser188Asp + Phe189Asp + Ser191Glu
 Ala187His + Ser188Glu + Phe189Glu + Ser191Asp
 Ala187Thr + Ser188Asp + Phe189Asp + Ser191Glu
 Ala187Asn + Ser188Glu + Phe189Glu + Ser191Glu
 Ala187Pro + Ser188Asp + Phe189Glu + Ser191Glu
 Ala187Pro + Ser188Asp + Phe189Asp + Ser191Asp
 Ala187Ser + Ser188Glu + Phe189Asp + Ser191Glu
 Ala187His + Ser188Asp + Phe189Glu + Ser191Asp
 Ala187Thr + Ser188Glu + Phe189Asp + Ser191Asp
 Ala187Asn + Ser188Asp + Phe189Glu + Ser191Glu
 Ala187Gln + Ser188Glu + Phe189Asp + Ser191Glu
 Ala187Gly + Ser188Asp + Phe189Glu + Ser191Glu
 Ala187Glu + Ser188Asp + Phe189Gly + Ser191Asp
 Ala187Glu + Ser188Glu + Phe189Met + Ser191Asp
 Ala187Asp + Ser188Asp + Phe189Ile + Ser191Glu
 Ala187Asp + Ser188Glu + Phe189Leu + Ser191Asp
 Ala187Asp + Ser188Glu + Phe189Thr + Ser191Asp
 Ala187Glu + Ser188Glu + Phe189Leu + Ser191Asp
 Ala187Glu + Ser188Asp + Phe189Tyr + Ser191Asp
 Ala187Glu + Ser188Glu + Phe189Gln + Ser191Asp
 Ala187Glu + Ser188Glu + Phe189Cys + Ser191Glu
 Ala187Glu + Ser188Glu + Phe189Gln + Ser191Glu
 Ala187Glu + Ser188Glu + Phe189Pro + Ser191Glu
 Ala187Asp + Ser188Glu + Phe189Ser + Ser191Glu
 Ala187Glu + Ser188Glu + Phe189Cys + Ser191Asp
 Ala187Asp + Ser188Asp + Phe189Leu + Ser191Asp
 Ala187Glu + Ser188Asp + Phe189Ile + Ser191Asp
 Ala187Asp + Ser188Asp + Phe189His + Ser191Glu

Ala187Glu + Ser188Asp + Phe189His + Ser191Asp
 Ala187Glu + Ser188Asp + Phe189Val + Ser191Asp
 Ala187Asp + Ser188Glu + Phe189Gly + Ser191Glu
 Ala187Asp + Ser188Asp + Phe189Cys + Ser191Asp
 Ala187Glu + Ser188Glu + Phe189Asn + Ser191Glu
 Ala187Asp + Ser188Asp + Phe189Thr + Ser191Glu
 Ala187Asp + Ser188Asp + Phe189Ile + Ser191Asp
 Ala187Asp + Ser188Asp + Phe189Ala + Ser191Glu
 Ala187Asp + Ser188Asp + Phe189Val + Ser191Glu
 Ala187Glu + Ser188Glu + Phe189Ala + Ser191Glu
 Ala187Asp + Ser188Asp + Phe189Ser + Ser191Asp
 Ala187Glu + Ser188Asp + Phe189Asn + Ser191Asp
 Ala187Asp + Ser188Asp + Phe189Cys + Ser191Glu
 Ala187Asp + Ser188Glu + Phe189Cys + Ser191Asp
 Ala187Glu + Ser188Asp + Phe189Ser + Ser191Glu
 Ala187Asp + Ser188Glu + Phe189Tyr + Ser191Glu
 Ala187Asp + Ser188Glu + Phe189Ala + Ser191Asp
 Ala187Gly + Ser188Glu + Phe189Thr + Ser191Asp
 Ala187His + Ser188Asp + Phe189Met + Ser191Glu
 Ala187Thr + Ser188Asp + Phe189Ser + Ser191Asp
 Ala187Ser + Ser188Glu + Phe189Met + Ser191Asp
 Ala187Ser + Ser188Asp + Phe189Ser + Ser191Asp
 Ala187Thr + Ser188Asp + Phe189Tyr + Ser191Glu
 Ala187Ser + Ser188Glu + Phe189Ala + Ser191Asp
 Ala187Asn + Ser188Glu + Phe189Gly + Ser191Asp
 Ala187Gln + Ser188Asp + Phe189Asn + Ser191Glu
 Ala187Asn + Ser188Asp + Phe189His + Ser191Glu
 Ala187Gly + Ser188Asp + Phe189Ser + Ser191Glu
 Ala187His + Ser188Asp + Phe189Val + Ser191Asp

Tabulka 22

Vícesmyčkové varianty s dvojitou mutací

Leu 96Gly + Ser204Glu
 Gln 59Ser + Asn 62Ser
 Val 95Gln + Asn218Asp
 Tyr104Cys + Lys213Glu
 Gly127Gln + Ala216Pro
 Ser188Glu + Gly215Asn
 Gly 97Gln + Ile107Ala
 Gln206Asp + Tyr217Thr
 Asp 60Glu + Gln206Asn
 Thr158Asp + Gln206Ser
 Pro210Gln + Gly215Asn
 Tyr104Glu + Ile107Leu
 Tyr167Pro + Gly211Glu
 Ile107Leu + Ala187Asp
 Gly 97Glu + Thr164Pro
 Thr 66Pro + Val203Cys
 Ala133Gly + Tyr217Ser

Ser105Glu + Phe189Val
Tyr167Asp + Ala187Thr
Ser161Glu + Ala216Thr
Ser 63Asp + Gln103Ser
Leu 96Gln + Pro129Glu
Ala 98Gly + Tyr214Glu
Leu 96Asn + Asn212Ser
Ser 63Asp + Phe189Leu
Thr158Gln + Lys213Glu
Leu126Gln + Gly160Asp
Ser159Asp + Tyr217Gln
Ser101Asp + Val203Ala
Gly100Asn + Gly215Glu
Gln 59Asp + Gly131Gln
Gly157Glu + Leu209Pro
Trp106Pro + Tyr217Ile
Ala216Ser + Gly219Asp
Thr 66Gln + Leu126Asn
Gly102Gln + Gly219Asp
Asn212Ser + Lys213Asp
Gln206Ser + Lys213Glu
Tyr104Glu + Asn155Gln
Val 95Asp + Leu126Ser
Tyr104Asp + Gly166Gln
Thr 66Pro + Ser204Glu
Asn 61Glu + Phe189Pro
Asp 60Glu + Tyr167Ala
Pro129Gln + Gln206Asp
Gly160Asp + Ala216Asn
Ser161Glu + Gly166Asn
Leu 96Pro + Gly100Asp
Trp106Asn + Val203Asn
Ser101Asp + Gly127Ser
Ala133Gln + Val203Asp
Ser101Asp + Gly202Ser
Ile107Ala + Gly160Asn
Ala133Thr + Tyr214Ile
Phe189Ser + Ser204Asp
Gly 97Asp + Trp106Phe
Gln 59Asn + Glu156Asp
Pro201Ser + Lys213Glu
Ser162Glu + Gly202Gln
Gly 65Ser + Gln206Asp
Lys213Asp + Ala216Pro
Val203Ala + Lys213Asp
Ala216Thr + Tyr217Pro
Gly131Asn + Asn218Glu
Tyr104Glu + Gly131Pro
Gly127Ser + Thr158Asp
Trp106Gly + Ser132Asp

Asn 62Ser + Ala187Ser
Ser163Asp + Phe189Ser
Pro201Gln + Gly215Glu
Gly100Gln + Tyr217Thr
Ser130Glu + Gly154Asn
Asp 60Glu + Tyr214Thr
Asn155Glu + Tyr217Gln
Ala 98Gln + Gly102Asn
Pro201Asn + Gly219Asp
Thr 66Ser + Gly127Gln
Leu126Glu + Ala216Thr
Asn 61Ser + Asn155Glu
Thr 66Ser + Gly157Asp
Pro129Ser + Thr164Gln
Ala216Asp + Tyr217Val
Ser130Glu + Tyr217Leu
Asn 62Asp + Tyr214Leu
Val 95Ser + Phe189Val
Gly100Pro + Ser159Asp
Asn155Gln + Ser204Glu
Pro129Asp + Val203Ser
Ser101Glu + Thr158Asn
Ala187Pro + Asn218Asp
Val 95Gly + Ser161Asp
Gly202Pro + Ala216Gln
Gly 97Ser + Gly215Asp
Tyr167Asp + Gln206Ser
Thr 66Ser + Asn212Glu
Ala216Thr + Tyr217Gln
Ala200Asn + Tyr217Ala
Asp 60Glu + Val203Pro
Val 95Thr + Tyr217Met
Val203Asn + Lys213Glu
Gly102Asp + Val203Gly
Ser130Asp + Ala133Thr
Tyr104Ala + Gly166Ser
Leu 96Met + Tyr217Asp
Ser101Asp + Gly102Pro
Ser101Asp + Thr220Pro
Val 95Asn + Ala216Pro
Tyr104Asn + Pro129Asp
Gly202Asn + Gln206Asp
Gln 59Glu + Ile107Cys
Thr 66Glu + Tyr104Pro
Val 95Met + Asp 99Glu
Ser204Glu + Gly211Pro
Pro210Glu + Gly219Ser
Leu126Pro + Ser204Glu
Pro129Asp + Ala200His
Ile107Gly + Gly215Pro

Thr 66Glu + Gln206Asn
Asn155Asp + Leu209His
Gly211Asp + Tyr217Val
Ala216Asp + Thr220Gln
Thr158Gly + Ser204Asp
Gly100Glu + Ile107Ser
Ala 98Ser + Gly154Asn
Gln103Asn + Ala216Glu
Gly154Gln + Pro210Gln
Leu126Pro + Ala216His
Ala216His + Tyr217Leu
Gly154Glu + Tyr217Ser
Gly 97Ser + Tyr167Thr
Trp106Ile + Ala216Gly
Gly102Ser + Phe189Gly
Gly154Glu + Gly219Asn
Lys213Glu + Ala216Pro
Asn 62Asp + Leu126Ser
Thr 66Gly + Gln206Glu
Gly157Pro + Val203Cys
Gln 59Asp + Tyr214Ser
Leu 96Met + Gly100Ser
Ala 98Gly + Lys213Asp
Asn 62Gln + Leu 96Asp
Gly127Asn + Gln206Glu
Gly160Pro + Gly219Asn
Leu 96Thr + Tyr217Ala
Trp106Phe + Tyr217Thr
Gly131Pro + Lys213Glu
Gly 65Gln + Asp 99Glu
Gly127Asn + Gly128Gln
Ala133Asn + Gly154Asn
Ser204Glu + Gly215Ser
Glu156Asp + Pro210Ser
Asp 60Glu + Gln206Ser
Asn 61Gln + Ala216Asn
Pro210Asn + Asn212Asp
Ala133Asp + Val203Asn
Gly219Ser + Thr220Gly
Ser191Asp + Val203Thr
Gly160Glu + Ala216Thr
Ser162Glu + Ala216Gln
Ala 98Gln + Tyr217Asn
Val 95Asp + Gln206Asn
Tyr104Ser + Ser204Asp
Gly100Pro + Phe189Gln
Gly 97Asp + Tyr217His
Gln206Ser + Gly211Asn
Ala187Asn + Ser188Asp
Ala 98Gly + Asp 99Glu

Thr164Asn + Phe189Cys
Val203Gln + Gln206Ser
Trp106Cys + Gly157Ser
Thr158Ser + Gly160Ser
Ser188Asp + Tyr217Gly
Gly157Asn + Phe189Met
Ser188Asp + Ala216Asn
Gly128Asn + Gly166Ser
Leu126Asn + Ala216Ser
Gly127Asp + Gln206Asn
Gln 59Glu + Leu 96His
Ser132Asp + Tyr217Ala
Gly166Ser + Gly219Glu
Ser163Glu + Val203Met
Ala 98His + Tyr217Met
Ala 98Pro + Ser130Asp
Gly160Asn + Ser204Glu
Gln206Asn + Gly215Asp
Gln103Ser + Ser130Asp
Ala133Gly + Thr220Gly
Ser132Glu + Ala216Gln
Asn 61Gln + Ile107His
Leu126Ala + Gly131Glu
Gln206Asp + Thr220Gly
Gln206Glu + Tyr217Cys
Gly157Ser + Pro210Asp
Gly166Glu + Tyr214Gln
Ser188Glu + Ala216His
Thr 66Glu + Gly166Gln
Gly102Pro + Gly166Glu
Val 95Gln + Tyr104Ile
Ser191Glu + Gly219Ser
Asp 99Glu + Asn218Gln
Gly100Asn + Ser105Glu
Gly166Pro + Pro210Asn
Gln 59Asn + Thr164Ser
Leu126His + Tyr214Ala
Thr 66Pro + Lys213Asp
Trp106His + Gly211Ser
Tyr167Leu + Ser204Glu
Val 95Thr + Ala133Gly
Ile107Ser + Gln206Glu
Phe189Tyr + Lys213Asp
Gly 65Asn + Asn218Asp
Tyr167Val + Lys213Glu
Gly 97Gln + Ser132Glu
Asp 99Glu + Gly102Pro
Leu126Cys + Ala216Asp
Leu126Cys + Gly127Ser
Ser191Asp + Ala216Asn

Gly100Gln + Gly154Asp
Asn 61Asp + Gly211Ser
Ser161Asp + Phe189Leu
Ile205Gln + Ala216Glu
Asn 62Gln + Tyr217Leu
Ile107Met + Ser161Asp
Leu126Ile + Tyr217Ser
Ala 98His + Ser162Asp
Asn 61Asp + Gly128Ser
Asn155Glu + Gly215Gln
Asn155Gln + Ser204Asp
Asn155Glu + Thr220Gln
Lys213Asp + Tyr217His
Gly127Pro + Ser204Glu
Ser204Asp + Tyr217Ala
Glu156Asp + Val203Gly
Gly127Glu + Ala133His
Gly100Asn + Gly131Ser
Gly211Gln + Lys213Asp
Ala187Asp + Phe189Leu
Ala216Glu + Tyr217Cys
Ser204Asp + Ala216Thr
Gly131Ser + Thr158Asp
Gly100Asn + Gln206Asn
Ser105Asp + Gly131Gln
Ser204Asp + Tyr214Val
Tyr214Met + Tyr217Ile
Ser 63Glu + Thr164Asn
Ile107Cys + Ala216Pro
Trp106Gly + Gln206Asp
Gly102Asp + Thr164Pro
Asp 99Glu + Ala216Gln
Lys213Glu + Ala216Gln
Ala133Ser + Pro210Glu
Asp 60Glu + Tyr104Asn
Asn 62Gln + Ile107Cys
Tyr167Ala + Gly211Asp
Glu156Asp + Tyr217Ile
Gly131Pro + Leu209Pro
Lys213Glu + Asn218Gln
Gly160Ser + Val203Glu
Asn155Ser + Tyr167Ala
Asp 60Glu + Phe189Gly
Thr164Gln + Gly219Ser
Ser162Asp + Gln206Asn
Gly100Glu + Tyr104Asn
Gly160Pro + Gln206Ser
Thr 66Gly + Ala216Gly
Tyr104Ile + Gly215Pro
Pro201Gln + Ala216Thr

Gln103Glu + Ala133Asn
Ser163Glu + Phe189His
Gly127Ser + Tyr217Ser
Gln206Asn + Leu209His
Pro210Glu + Ala216Gln
Asn 62Ser + Gln206Asn
Ser161Glu + Gly219Asn
Val203Gly + Asn212Glu
Ala 98Glu + Leu126Met
Val165Gln + Ser204Asp
Gly154Ser + Ala216His
Pro201Gly + Gly211Glu
Ser161Asp + Gly219Gln
Asn155Glu + Thr220Asn
Leu 96Glu + Ile107Leu
Thr158Ser + Gly215Ser
Ser 63Glu + Pro129Ser
Val 95Asn + Ser163Glu
Gly102Asn + Leu126Glu
Thr 66Gly + Ala216Pro
Gly157Ser + Thr158Glu
Ala 98Asp + Ala187Ser
Asp 99Glu + Thr164Gln
Thr 66Ser + Ser105Glu
Gln103Asp + Gly154Pro
Thr 66Glu + Tyr217His
Gly127Gln + Ser204Glu
Phe189Ile + Tyr217Thr
Ala133Gln + Lys213Asp
Ser130Asp + Tyr217Thr
Leu126Ile + Asn212Ser
Gly154Asn + Gln206Asp
Thr 66Pro + Glu156Asp
Gln103Asn + Lys213Asp
Phe189Met + Gln206Asp
Leu126Asn + Gly154Gln
Pro210Gly + Gly215Glu
Leu126Val + Ala216Pro
Gln206Ser + Tyr217His
Leu 96Asn + Lys213Asp
Leu126Pro + Ala216Ser
Val203His + Gly211Asp
Tyr167Ala + Tyr217Asp
Trp106Asn + Gln206Asn
Gly127Ser + Ser161Glu
Lys213Glu + Gly219Asn
Val 95Thr + Thr208Gly
Thr158Gly + Ser204Glu
Gly 97Pro + Trp106Tyr
Phe189Ile + Val203His

Leu 96Gln + Lys213Glu
 Gln206Glu + Ala216Thr
 Gly154Ser + Asn155Glu
 Ser132Asp + Tyr214Asn
 Pro129Gln + Ala133Pro
 Ala 98Asn + Gly127Asp
 Gly211Gln + Asn218Asp
 Trp106Cys + Ser163Asp
 Leu 96His + Ala216Gly
 Gly 97Asn + Ser204Asp
 Asn 61Ser + Gly157Asp
 Pro210Asn + Tyr217His
 Asp 60Glu + Tyr104Ala
 Thr164Asn + Ala200Gly
 Tyr214Val + Ala216Asp
 Leu126His + Ala216Ser
 Gly128Gln + Asn212Asp
 Ser162Glu + Gln206Ser
 Gln206Glu + Ala216Ser
 Thr164Pro + Thr220Asp
 Val203Ser + Gly219Asp
 Gln206Asn + Gly219Asp
 Ser 63Asp + Ile107Gln
 Gly102Gln + Val203Ala
 Ser101Glu + Val165Gln
 Gln 59Ser + Gly166Glu
 Ser101Glu + Tyr217Ser
 Gly131Asn + Ala187Glu
 Gly102Ser + Tyr214Gly
 Thr158Ser + Thr220Glu
 Asp 99Glu + Gly215Gln
 Val 95Gly + Thr220Asp
 Ala200Ser + Tyr214Val
 Ser188Glu + Ala216Asn
 Tyr214His + Ala216Asp
 Thr158Glu + Phe189Asn
 Asn155Gln + Ser191Asp
 Thr 66Ser + Leu126Ser
 Thr 66Gly + Gln206Asp
 Ser105Asp + Tyr214Thr
 Gly102Pro + Thr164Gln
 Trp106Gly + Pro210Gly
 Asn155Asp + Thr220Gln

Tabulka 23

Vícesmyčkové varianty s trojitou mutací

Gln 59Ser + Leu 96Gly + Ser204Glu
 Asn 62Ser + Val 95Gln + Asn218Asp
 Tyr104Cys + Gly127Gln + Lys213Glu

Ser188Glu + Gly215Asn + Ala216Pro
 Gly 97Gln + Ile107Ala + Gly157Glu
 Ser162Glu + Pro210Gln + Gly215Asn
 Thr 66Pro + Val203Cys + Tyr217Ser
 Ser105Glu + Ala133Gly + Phe189Val
 Leu 96Asn + Asn212Ser + Tyr214Glu
 Gln 59Asp + Gly131Gln + Leu209Pro
 Trp106Pro + Gly157Glu + Tyr217Ile
 Thr 66Gln + Leu126Asn + Ser188Glu
 Asn212Ser + Lys213Asp + Gly219Gln
 Val 95Asp + Leu126Ser + Asn155Gln
 Asn 61Glu + Thr 66Pro + Phe189Pro
 Gly160Asp + Gly166Asn + Ala216Asn
 Trp106Asn + Gly127Ser + Val203Asn
 Ser101Asp + Ile107Ala + Gly202Ser
 Ala133Thr + Phe189Ser + Tyr214Ile
 Gln 59Asn + Gly 97Asp + Trp106Phe
 Gly157Pro + Pro210Gly + Ala216Glu
 Gly160Ser + Asn212Ser + Tyr217Thr
 Asn 62Gln + Gln206Asn + Ala216Ser
 Pro129Ser + Gly215Glu + Tyr217Pro
 Ala 98Asn + Tyr217His + Thr220Gly
 Val203Gly + Gly211Glu + Ala216Asn
 Gly127Glu + Tyr214Asn + Ala216His
 Trp106Pro + Ala133Pro + Gln206Asp
 Val 95Ser + Gly128Glu + Tyr217Cys
 Ser159Asp + Gly166Gln + Gly219Gln
 Leu 96Val + Glu156Asp + Gly157Pro
 Ala133Gly + Thr208Pro + Tyr214Pro
 Trp106Asn + Gly128Pro + Val203Met
 Gly 65Ser + Gly102Asn + Ala187His
 Ala200Gln + Gln206Glu + Tyr217His
 Gln103Ser + Glu156Asp + Ala216Ser
 Gln 59Asn + Ala216Thr + Gly219Pro
 Gly102Ser + Pro210Asp + Tyr217Ile
 Gly100Glu + Ile107Ser + Thr158Gly
 Ala 98Glu + Gly154Gln + Pro210Gln
 Gln103Glu + Leu126Pro + Ala216His
 Lys213Glu + Ala216His + Tyr217Leu
 Gly154Glu + Tyr167Thr + Tyr217Ser
 Gly 97Ser + Trp106Ile + Ala216Gly
 Gly102Ser + Phe189Gly + Gly219Asn
 Gly157Pro + Gly160Asp + Val203Cys
 Leu 96Met + Ala 98Gly + Gly100Ser
 Gly127Asn + Gly160Pro + Gln206Glu
 Leu 96Thr + Tyr217Ala + Gly219Asn
 Trp106Phe + Lys213Glu + Tyr217Thr
 Gly102Glu + Gly127Asn + Gly128Gln
 Ala133Asn + Gly154Asn + Ser161Asp
 Asn 61Gln + Gln206Ser + Ala216Asn

Ser204Asp + Gly219Ser + Thr220Gly
 Ala 98Gln + Ser159Glu + Tyr217Asn
 Gly 97Asp + Gly100Pro + Phe189Gln
 Gln206Ser + Gly211Asn + Tyr217His
 Ala 98Gly + Ala187Asn + Ser188Asp
 Asp 99Glu + Thr164Asn + Phe189Cys
 Trp106Cys + Gly157Ser + Gln206Ser
 Gly157Asn + Ser188Asp + Tyr217Gly
 Gly166Ser + Ser188Asp + Ala216Asn
 Leu126Asn + Gly128Asn + Ala216Ser
 Leu 96His + Ser132Asp + Tyr217Ala
 Ala 98His + Lys213Glu + Tyr217Met
 Ala 98Pro + Ser130Asp + Gly160Asn
 Ser130Asp + Ala133Gly + Thr220Gly
 Asn 61Gln + Ile107His + Asn218Glu
 Gln206Glu + Tyr217Cys + Thr220Gly
 Gly157Ser + Pro210Asp + Tyr214Gln
 Val 95Gln + Gly102Pro + Gly166Glu
 Tyr104Ile + Ser191Glu + Gly219Ser
 Asp 99Glu + Gly100Asn + Asn218Gln
 Gly131Glu + Gly166Pro + Pro210Asn
 Leu126His + Thr164Ser + Tyr214Ala
 Thr 66Pro + Gly211Ser + Lys213Asp
 Trp106His + Tyr167Leu + Ser204Glu
 Val 95Thr + Ala133Gly + Gln206Glu
 Gly 97Gln + Gly102Pro + Ser132Glu
 Leu126Cys + Ser191Asp + Ala216Asn
 Gly100Gln + Gly154Asp + Gly211Ser
 Asn 62Gln + Ala216Glu + Tyr217Leu
 Leu126Ile + Ser161Asp + Tyr217Ser
 Pro129Glu + Asn155Gln + Thr158Gln
 Gly127Glu + Ala133His + Val203Gly
 Gly131Ser + Gly211Gln + Lys213Asp
 Gly131Ser + Thr158Asp + Ala216Thr
 Gly100Asn + Ser105Asp + Gln206Asn
 Gly 97Glu + Gly160Gln + Thr164Asn
 Ile107Cys + Lys213Asp + Ala216Pro
 Trp106Gly + Gln206Asp + Ala216His
 Ala133Ser + Lys213Glu + Ala216Gln
 Asn 62Gln + Ile107Cys + Thr164Asp
 Gly131Pro + Leu209Pro + Tyr217Ile
 Asn155Ser + Tyr167Ala + Phe189Gly
 Asp 60Glu + Thr164Gln + Gly219Ser
 Gly160Pro + Ser204Glu + Gln206Ser
 Thr 66Gly + Gly100Asp + Ala216Gly
 Tyr104Ile + Gly215Pro + Ala216Thr
 Gly127Ser + Lys213Asp + Tyr217Ser
 Ser188Glu + Gln206Asn + Leu209His
 Asn 62Ser + Gln206Asn + Pro210Glu
 Ala 98Glu + Leu126Met + Val203Gly

Gly154Ser + Ser161Glu + Ala216His
 Pro201Gly + Gly211Glu + Ala216Thr
 Ser161Asp + Gly219Gln + Thr220Asn
 Asn 62Glu + Thr158Ser + Gly215Ser
 Gly102Asn + Leu126Glu + Ala216Pro
 Gly127Gln + Ser204Glu + Tyr217Thr
 Ala133Gln + Phe189Ile + Lys213Asp
 Ser130Asp + Asn212Ser + Tyr217Thr
 Leu126Ile + Gly154Asn + Gln206Asp
 Thr 66Pro + Gln103Asn + Lys213Asp
 Leu126Asn + Gly154Gln + Pro210Gly
 Leu126Val + Gly215Glu + Ala216Pro
 Gln206Ser + Lys213Asp + Tyr217His
 Leu 96Asn + Leu126Pro + Ala216Ser
 Ser 63Asp + Trp106Asn + Gln206Asn
 Gly127Ser + Ser161Glu + Gly219Asn
 Val 95Thr + Thr208Gly + Lys213Glu
 Gly 97Pro + Trp106Tyr + Asn218Glu
 Leu 96Gln + Phe189Ile + Val203His
 Ser132Asp + Ala133Pro + Tyr214Asn
 Ala 98Asn + Gly127Asp + Gly211Gln
 Leu 96His + Gly 97Asn + Ala216Gly
 Pro210Asn + Gly215Glu + Tyr217His
 Asp 60Glu + Trp106Tyr + Pro129Gln
 Gly157Asn + Phe189Val + Asn218Asp
 Gly100Asp + Thr164Asn + Ala200Gly
 Leu126His + Gln206Asp + Ala216Ser
 Ser 63Asp + Ile107Gln + Val203Ala
 Ser101Glu + Gly102Gln + Val165Gln
 Asp 99Glu + Thr158Ser + Gly215Gln
 Ala200Ser + Ser204Glu + Tyr214Val
 Asn155Gln + Thr158Glu + Phe189Asn
 Thr 66Gly + Ser105Asp + Tyr214Thr
 Gly102Pro + Thr164Gln + Pro210Gly
 Trp106Gly + Asn155Asp + Thr220Gln
 Thr158Gly + Ala187Gln + Ser204Glu
 Gly154Gln + Tyr167Cys + Ser204Glu
 Asp 60Glu + Ala 98His + Gly102Pro
 Gly131Ser + Ile205Val + Ala216Asp
 Gly128Gln + Val165Cys + Gly211Gln
 Gly 97Asn + Ile107Gln + Gly166Gln
 Gly160Asp + Gly166Pro + Tyr214Ile
 Gln 59Asp + Gly154Ser + Asn218Gln
 Gly154Ser + Val165His + Ser204Glu
 Ser 63Glu + Pro129Ser + Tyr217Gly
 Gly157Pro + Thr158Ser + Lys213Glu
 Thr164Glu + Gly215Ser + Ala216Asn
 Thr 66Pro + Asp 99Glu + Tyr217Cys
 Trp106Met + Ala187Ser + Tyr217Ile
 Ile107Thr + Glu156Asp + Tyr217Cys

Leu126Pro + Gly131Asn + Tyr217Leu
 Tyr167His + Gly219Pro + Thr220Glu
 Val 95Pro + Trp106Ile + Tyr217Gly
 Val 95His + Gln206Asn + Lys213Glu
 Val 95Ala + Ala187Ser + Tyr217Glu
 Asp 60Glu + Asn 62Gln + Tyr167Ile
 Gly160Asn + Ala187Gly + Gln206Ser
 Gly102Gln + Trp106His + Ser163Glu
 Asn 62Gln + Ser188Glu + Pro210Gln
 Gly100Pro + Gly202Gln + Ala216Ser
 Ser105Glu + Ile107Thr + Gly131Pro
 Thr 66Gly + Gly131Asp + Phe189Ser
 Gln103Asn + Ala187Ser + Ser204Glu
 Asp 60Glu + Thr164Pro + Ala216Ser
 Gln 59Glu + Asn212Ser + Tyr217Ser
 Asn 61Glu + Gly166Gln + Gly215Pro
 Asn 62Gln + Gly160Gln + Gly219Ser
 Ser105Glu + Tyr167Ala + Tyr217Ser
 Gly100Ser + Asn155Ser + Tyr217Asn
 Gly 97Pro + Leu126Ala + Gly157Gln
 Gly100Ser + Gly131Gln + Phe189Glu
 Ser132Asp + Ala187Pro + Gln206Asn
 Gln 59Asp + Gln206Asn + Tyr217Ile
 Gln103Asn + Ile107Asn + Ala133Ser
 Gly128Gln + Pro129Asn + Ala216Asp
 Thr 66Glu + Trp106Ala + Ala187Ser
 Asp 60Glu + Gly 65Asn + Tyr214Ser
 Ser132Asp + Gly157Asn + Ala216Ser
 Asn 62Asp + Ile205Thr + Gln206Ser
 Gln 59Asn + Gly 65Pro + Val 95Asp
 Val 95Ser + Gly102Ser + Lys213Asp
 Ala216Pro + Tyr217Pro + Asn218Ser
 Ser 63Asp + Gly127Ser + Thr220Asn
 Gly 97Asn + Gly154Gln + Ala216Asn
 Ala 98His + Trp106Val + Ala216Gln
 Gly102Asn + Ile107Gln + Ser162Asp
 Ile107Val + Lys213Glu + Ala216Ser
 Tyr104Leu + Gln206Glu + Thr220Asn
 Pro201Asn + Pro210Asn + Gly211Gln
 Gly166Asn + Ile205Asn + Ala216Thr
 Ala 98Ser + Gln206Ser + Gly215Ser
 Ala133His + Ser188Asp + Tyr217Gly
 Ala 98Glu + Gly131Pro + Gly157Pro
 Leu 96Ile + Ser188Asp + Val203His
 Tyr167Thr + Gln206Ser + Tyr217His
 Leu 96Gln + Ser161Glu + Ala216Thr
 Gly127Glu + Thr158Pro + Pro201Gly
 Gly160Ser + Lys213Glu + Ala216Ser
 Tyr104Ser + Leu126His + Tyr214His
 Asn 62Ser + Gly160Glu + Ala216His

Leu 96Cys + Thr164Ser + Ser204Asp
 Gly131Gln + Phe189Ile + Val203Asp
 Asp 60Glu + Gly 65Gln + Thr 66Asn
 Gly102Glu + Gly128Ser + Ala216Gln
 Asn 62Gln + Val 95Gly + Gln206Asn
 Gly 97Pro + Gly154Asp + Asn218Gln
 Thr 66Pro + Leu 96Val + Ala216Pro
 Gly 97Asn + Asn155Glu + Tyr214Val
 Tyr104Ala + Tyr167Glu + Ala216Pro
 Gly157Asn + Asn218Glu + Thr220Gly
 Ala133His + Thr164Gln + Gly166Ser
 Leu126Gln + Ser159Glu + Gly160Asp
 Asn 61Asp + Asn 62Asp + Gly128Ser
 Thr 66Pro + Gly100Glu + Ser101Glu
 Ser204Glu + Ile205Gln + Ala216Glu
 Ser204Asp + Ala216Glu + Tyr217Cys
 Ser204Asp + Ala216Asp + Thr220Gln
 Gln103Asn + Ser204Glu + Ala216Glu
 Gly202Gln + Ser204Glu + Asn218Asp
 Ser204Glu + Gln206Asp + Ala216Asp
 Ser204Asp + Gln206Glu + Ala216Asp
 Tyr167Ala + Ser204Asp + Tyr217Asp
 Gly211Asp + Lys213Glu + Ala216Thr
 Gly211Asp + Lys213Glu + Tyr217Pro
 Tyr167Val + Gly211Asp + Lys213Glu
 Asp 60Glu + Asn 62Asp + Tyr217Leu
 Gly160Glu + Ser162Glu + Ala216Thr
 Ser204Glu + Gln206Asp + Tyr217Leu
 Ser204Glu + Gln206Glu + Ala216Thr
 Ile107Cys + Ser204Glu + Gln206Glu
 Ser204Glu + Gln206Glu + Gly215Asn
 Ser161Asp + Ser163Asp + Ala216His
 Thr164Pro + Gln206Glu + Tyr217Asp
 Asp 60Glu + Gln206Asn + Pro210Asp
 Asp 60Glu + Tyr104Asn + Pro210Glu
 Ala187Glu + Val203Glu + Asn218Glu
 Ser130Glu + Gly166Glu + Phe189Tyr
 Thr158Asp + Ser162Glu + Gln206Ser
 Gly154Asp + Val203Ser + Gly219Asp
 Ser188Glu + Ser191Asp + Ala216Asn
 Asp 60Glu + Gly 97Glu + Asp 99Glu
 Thr164Pro + Ser204Glu + Gly219Glu
 Asp 99Glu + Gly102Asp + Ala216Gln
 Ser204Glu + Gln206Asn + Gly215Asp
 Ser204Asp + Gln206Asp + Tyr214Asp
 Thr 66Asp + Gly211Glu + Lys213Asp
 Ser101Glu + Leu126Glu + Tyr214His
 Asn 61Glu + Leu 96Glu + Ile107Leu
 Asp 60Glu + Leu 96Glu + Gly166Pro
 Ser101Glu + Gly127Glu + Ala187Gln

Ser 63Glu + Gly131Asn + Lys213Glu
Ser 63Asp + Phe189Leu + Lys213Glu
Ser105Glu + Ser132Glu + Tyr167Gly
Ser204Asp + Ala216Glu + Thr220Glu
Ser204Glu + Lys213Asp + Gly215Asp
Asp 99Glu + Ser101Asp + Tyr104Asp
Ser 63Asp + Pro210Glu + Tyr217Glu
Thr158Gln + Gln206Asp + Lys213Asp
Gln206Glu + Lys213Glu + Ala216His
Gly157Asp + Tyr214Gly + Thr220Asp
Ser 63Glu + Gly100Ser + Tyr217Asp
Gly100Glu + Gln103Asp + Gln206Asn
Gly154Glu + Ser163Asp + Val203Met
Val 95Gly + Lys213Asp + Ala216Glu
Gln 59Asn + Leu126Glu + Pro129Glu
Ser204Glu + Gln206Asp + Lys213Glu
Ala187Asp + Ser204Glu + Gln206Glu
Ser 63Glu + Ser204Glu + Ala216Asp
Asn 61Asp + Ser 63Asp + Ala216Glu
Pro129Glu + Asn155Glu + Ser163Asp
Ser 63Asp + Ile107Leu + Asn212Asp
Gln206Asp + Pro210Asp + Asn212Asp
Glu156Asp + Ser163Glu + Gly219Asp
Ile107Glu + Gly131Ser + Ser132Asp
Gly100Asn + Gly211Asp + Gly215Glu
Gln103Asp + Gly127Glu + Ala216Gln
Ser130Asp + Gly131Asp + Lys213Glu
Gly100Asp + Ser101Glu + Ser163Asp
Pro129Asp + Ser130Asp + Tyr217Glu
Val203Asp + Ser204Glu + Lys213Glu
Ser132Asp + Ala216Glu + Tyr217Glu
Ser101Glu + Ala187Glu + Ser188Glu
Ala 98Asp + Asp 99Glu + Ser204Asp
Ser204Asp + Gln206Asp + Asn212Asp
Gln103Asp + Glu156Asp + Ser191Glu
Ser132Asp + Ser204Glu + Ala216Asp
Ala 98Glu + Ser204Glu + Ala216Glu
Ser204Asp + Lys213Asp + Asn218Glu
Ser204Glu + Gly211Asp + Tyr217Asp
Ser162Asp + Gly166Asp + Asn212Ser
Gly128Glu + Gly166Glu + Gln206Glu
Asp 60Glu + Asn 62Glu + Ser204Asp
Asp 99Glu + Ser101Asp + Gly154Glu
Gln103Ser + Gln206Glu + Gly219Asp
Phe189Asp + Pro210Asp + Lys213Glu
Asn 61Asp + Ser101Glu + Gly128Asp
Thr 66Glu + Gly166Gln + Ala216Glu
Ser101Glu + Ser204Glu + Gln206Asp
Gly157Glu + Ser204Glu + Gln206Glu
Asp 99Glu + Ser204Asp + Gln206Glu

Gly 97Glu + Ser204Glu + Gln206Asp
 Ser101Asp + Gly102Ser + Ser105Asp
 Ser161Glu + Ser163Asp + Gln206Asp
 Ser130Asp + Ser132Glu + Asn212Glu
 Ser130Glu + Ser132Glu + Gly160Asp
 Pro129Glu + Gly131Glu + Gly215Glu
 Asn 62Gln + Thr158Asp + Gly166Glu
 Ser132Glu + Gln206Glu + Tyr217Asp
 Asp 60Glu + Phe189His + Asn212Glu
 Gly131Glu + Lys213Asp + Gly215Glu
 Ser159Glu + Ser163Glu + Ser204Glu
 Thr158Glu + Ser162Asp + Gly219Asp
 Tyr104Glu + Ser132Glu + Asn212Asp
 Asp 99Glu + Glu156Asp + Ser159Glu
 Ser 63Glu + Ser188Asp + Ser191Asp
 Ser188Asp + Ser191Glu + Ala216Asp
 Gln 59Glu + Ser188Asp + Ser191Asp
 Ser204Glu + Lys213Glu + Gly219Glu
 Asp 60Glu + Ser204Asp + Gly219Asp
 Leu126Asp + Gly166Asp + Ser204Asp
 Thr164Glu + Ser188Glu + Gln206Ser
 Asp 60Glu + Gln206Glu + Lys213Asp
 Ser105Asp + Leu126Glu + Thr220Asp
 Asp 99Glu + Glu156Asp + Ser188Asp
 Gln 59Glu + Asn 62Asp + Ala187Glu
 Gly166Glu + Val203Asp + Gln206Glu
 Asn155Glu + Ala187Glu + Lys213Asp
 Thr 66Asp + Ser204Glu + Lys213Asp
 Ser 63Asp + Ser188Glu + Asn218Glu
 Ser 63Asp + Ser105Asp + Lys213Asp
 Ser105Asp + Ser132Glu + Gln206Glu
 Ser 63Asp + Gly 97Asp + Asn155Asp
 Ser 63Glu + Ser101Asp + Ser105Asp
 Thr164Glu + Gln206Glu + Lys213Glu
 Leu126Glu + Gln206Asp + Lys213Asp
 Gly131Glu + Gln206Asp + Lys213Asp
 Ser 63Asp + Trp106Asp + Tyr217Glu
 Gly160Glu + Lys213Glu + Ala216Glu
 Ala133Glu + Lys213Asp + Ala216Asp
 Ser 63Glu + Gln206Asp + Gly215Gln
 Lys213Asp + Ala216Asn + Tyr217Glu
 Ser130Asp + Ala187Asp + Ser204Glu
 Asp 99Glu + Ser188Glu + Asn218Asp
 Asn 61Asp + Ser188Glu + Asn218Glu
 Gly102Asp + Ser204Glu + Thr220Glu
 Gly127Asp + Ser191Glu + Lys213Asp
 Thr 66Glu + Gly 97Glu + Tyr217Cys
 Gly154Asp + Ala187Glu + Gly215Asp
 Gly102Asp + Gly154Glu + Ser188Glu
 Gln103Asp + Ser132Asp + Gln206Glu

Tyr167His + Ser191Glu + Asn218Asp
 Asp 60Glu + Glu156Asp + Gly160Glu
 Gln103Glu + Gly154Glu + Asn218Asp
 Asp 60Glu + Asn155Glu + Ser159Asp
 Gln103Glu + Ser161Glu + Ser191Asp
 Ala 98Asp + Ser132Asp + Gly166Glu
 Ser188Asp + Ser204Asp + Tyr214Val

Tabulka 24

Vícesmyčkové varianty s čtyřnásobnou mutací

Gln 59Ser + Asn 62Ser + Leu 96Gly + Ser204Glu
 Gly127Gln + Ser188Glu + Gly215Asn + Ala216Pro
 Asn 62Gln + Ile107Ala + Gln206Asp + Tyr217Thr
 Asn 61Ser + Leu 96His + Gly157Pro + Ala216Gly
 Leu 96Gln + Gly127Gln + Glu156Asp + Thr220Asn
 Thr158Glu + Gly202Ser + Gln206Ser + Thr220Ser
 Gly 97Asn + Ser105Asp + Gly215Ser + Ala216Ser
 Leu126Thr + Gly211Gln + Lys213Asp + Ala216Ser
 Gly100Asp + Trp106Asn + Gly127Ser + Val203Asn
 Ile107Ala + Gly160Asn + Gly166Asp + Gly202Ser
 Ala133Thr + Phe189Ser + Tyr214Ile + Ala216Glu
 Asn 62Ser + Ser163Asp + Phe189Ser + Pro201Gln
 Ala 98Gln + Gly102Asn + Pro201Asn + Gly219Asp
 Thr 66Ser + Leu126Glu + Gly127Gln + Ala216Thr
 Pro129Ser + Thr164Gln + Ala216Asp + Tyr217Val
 Gly128Gln + Thr158Gln + Gln206Asn + Asn212Asp
 Gly157Ser + Gln206Glu + Tyr217Cys + Thr220Gly
 Val 95Gln + Tyr104Ile + Ser191Glu + Gly219Ser
 Gln 59Asn + Gly 97Asn + Gly154Pro + Asn218Ser
 Pro129Gly + Thr158Asn + Gln206Asn + Gly211Pro
 Ala 98His + Trp106His + Gln206Asn + Lys213Asp
 Leu126Ile + Ser204Glu + Gln206Asn + Tyr217Thr
 Gln 59Glu + Asn 62Gln + Phe189Leu + Val203Ala
 Pro129Gln + Gly154Pro + Ala187Thr + Lys213Glu
 Ser 63Glu + Thr164Asn + Gln206Ser + Pro210Asn
 Leu 96Met + Gln103Asn + Ala133Ser + Ser204Glu
 Trp106Ala + Gly154Pro + Ala187Asn + Gly219Pro
 Asn 62Glu + Gly102Pro + Gly160Asn + Asn218Ser
 Thr 66Gly + Gly100Asp + Tyr104Ile + Ala216Gly
 Gly102Asp + Pro201Gln + Gly215Pro + Ala216Thr
 Leu126Met + Val203Gly + Asn212Glu + Gly219Asn
 Leu 96Glu + Ile107Leu + Thr158Ser + Gly215Ser
 Ser130Asp + Ala133Gln + Asn212Ser + Tyr217Thr
 Thr 66Gly + Gly100Ser + Leu126Gly + Ala216Glu
 Gln103Asp + Tyr104Ile + Gly128Gln + Tyr217Cys
 Leu126Pro + Ser204Asp + Gln206Asn + Thr208Asn
 Pro129Ser + Gly157Asn + Thr164Glu + Ala200Ser
 Gly128Gln + Val165Cys + Gly211Gln + Lys213Glu
 Gly160Asp + Gly166Pro + Gly211Ser + Tyr214Ile

Gln103Ser + Gly166Asn + Tyr214Ile + Gly215Pro
 Asn 61Asp + Tyr104Ser + Leu126His + Tyr214His
 Gly 65Gln + Gly131Gln + Phe189Ile + Val203Asp
 Asn 62Gln + Thr 66Asp + Val 95Gly + Gln206Asn
 Thr 66Pro + Gly 97Pro + Gly154Asp + Ala216Pro
 Val 95Pro + Tyr104Gly + Gly127Ser + Gly215Asp
 Asp 99Glu + Trp106Ala + Pro201Gln + Ala216Gly
 Asn 61Gln + Val 95Asp + Gly102Asn + Ala187Asn
 Ile107Gln + Val203Ser + Ser204Asp + Gly215Ser
 Val 95Thr + Gly202Gln + Ser204Asp + Ala216Asn
 Thr158Pro + Val203Gly + Lys213Glu + Tyr217Ser
 Trp106Pro + Asn155Asp + Gln206Ser + Tyr214Ala
 Gly102Asn + Gly157Ser + Tyr167Ala + Ala216Asn
 Gly160Asn + Val203Thr + Pro210Glu + Asn218Gln
 Ile107Ser + Gly128Asn + Asn155Glu + Ala216Gly
 Gln103Asn + Pro129Gly + Gly166Gln + Thr220Gly
 Asn 61Ser + Ser 63Asp + Thr 66Gly + Gly154Ser
 Tyr104Gly + Pro129Ser + Gln206Ser + Gly219Ser
 Gly102Pro + Gly131Asp + Asn155Ser + Tyr217His
 Asn 61Ser + Val 95Gln + Ser204Asp + Ala216Gln
 Thr158Asn + Ala187Gly + Tyr217Ala + Gly219Asp
 Gly 65Gln + Gly 97Pro + Ser130Glu + Pro210Asn
 Gly128Asn + Ser159Glu + Pro201Ser + Tyr217Val
 Leu126Asn + Asn155Gln + Gly202Gln + Asn212Ser
 Thr 66Ser + Tyr104Val + Gly154Glu + Gly215Asn
 Gly102Asn + Gly128Gln + Ser161Glu + Tyr217Met
 Ser132Glu + Thr158Gln + Thr164Asn + Gln206Asn
 Asn 62Glu + Leu 96Ile + Gly211Ser + Gly219Ser
 Thr208Pro + Pro210Gly + Ala216Thr + Tyr217Met
 Gly100Gln + Gly160Asn + Pro201Gly + Asn212Asp
 Tyr104Asp + Gly154Pro + Ala187Asn + Val203Ser
 Leu 96Gln + Leu126Thr + Ser162Glu + Tyr217Val
 Gly128Asn + Ala187Pro + Pro201Gly + Ser204Glu
 Gln103Ser + Gly157Glu + Thr158Gln + Ala216Gln
 Leu126Ser + Thr164Glu + Val203Pro + Gly211Gln
 Thr164Gly + Val203Met + Ala216Asp + Tyr217Gln
 Ser159Asp + Val203Asn + Ile205Asn + Pro210Ser
 Gly 65Asn + Gln206Asp + Ala216Gly + Tyr217His
 Gln103Asn + Ile107Cys + Thr164Asp + Val203Thr
 Gly128Glu + Asn155Gln + Thr158Ser + Gly160Ser
 Ala 98His + Ser162Glu + Gln206Asn + Tyr217Gly
 Gly128Ser + Thr164Asn + Ser204Glu + Tyr217Gly
 Gly127Gln + Gly157Ser + Ser159Asp + Tyr217Val
 Gly157Asn + Gln206Asn + Tyr217Val + Gly219Pro
 Thr 66Ser + Ala133Thr + Ser163Asp + Thr208Gln
 Leu 96Thr + Gly131Asp + Gln206Asn + Ala216Gly
 Asn 61Ser + Ser132Glu + Gly211Ser + Asn218Gln
 Gly100Ser + Tyr104Ala + Ser204Asp + Gly211Gln
 Leu 96His + Ala 98Glu + Pro129Gln + Ala133Asn
 Asn 62Glu + Gly128Gln + Ala187Asn + Gly215Ser

Leu 96Ile + Gly157Ser + Val203Ala + Ala216Ser
 Asn 61Gln + Val 95Thr + Gly160Asp + Ala216His
 Leu 96Cys + Gly128Pro + Ser191Glu + Thr208Asn
 Trp106Ala + Gly131Gln + Val203Ala + Tyr214Gln
 Asn 61Ser + Ala216Gln + Tyr217Leu + Gly219Asn
 Tyr104Gly + Ser105Glu + Thr158Ser + Leu209Thr
 Ala133Ser + Phe189Thr + Asn212Glu + Tyr217Thr
 Tyr104Ser + Thr158Gly + Thr164Glu + Ala216Pro
 Gln 59Asn + Thr 66Asn + Thr164Gly + Ala187Pro
 Ile107His + Gly157Ser + Lys213Glu + Tyr217Asn
 Gly127Ser + Gln206Asp + Gly215Gln + Tyr217Leu
 Leu126Gly + Gly131Glu + Tyr167Met + Thr220Gln
 Thr158Gln + Lys213Glu + Gly215Ser + Tyr217Gly
 Asn 61Gln + Leu126Gly + Thr164Ser + Asn218Asp
 Asn 62Asp + Pro129Gly + Gln206Ser + Ala216His
 Asp 60Glu + Val 95Gln + Leu126Pro + Val203Thr
 Gln103Glu + Ile107Val + Phe189Asn + Ala216Thr
 Ile107Thr + Pro129Gln + Lys213Glu + Tyr217Thr
 Tyr104His + Gly154Gln + Gly157Asp + Tyr217Ser
 Gln 59Asn + Trp106Cys + Ala200Thr + Ala216Gln
 Thr 66Gln + Gly 97Ser + Gly127Pro + Tyr217Asp
 Gly100Asn + Ser204Asp + Pro210Ser + Tyr214Gly
 Asn 62Ser + Ile107Gly + Leu126Cys + Thr220Gly
 Leu126His + Gly154Asp + Asn218Gln + Thr220Asn
 Ser101Glu + Gly157Gln + Tyr214Pro + Ala216His
 Asn 62Gln + Ser162Glu + Val203Ser + Ala216Thr
 Tyr104Gln + Trp106Gly + Leu126Asp + Asn212Gln
 Gln 59Ser + Val 95Pro + Gly202Asn + Tyr217Ser
 Leu 96Pro + Gly160Asp + Ser161Glu + Gly166Asn
 Ser159Glu + Gly160Asp + Tyr167Gly + Phe189Val
 Asn212Glu + Lys213Glu + Ala216Ser + Tyr217Gln
 Thr158Asp + Ser159Asp + Gly215Asn + Ala216Thr
 Ala 98Asp + Asp 99Glu + Thr164Gln + Ala187Ser
 Gly 97Pro + Gly131Pro + Gly154Asp + Asn155Asp
 Gly102Ser + Trp106Gln + Gly157Glu + Phe189Asp
 Gly100Gln + Ser204Glu + Tyr214Ile + Ala216Glu
 Val 95Pro + Ser204Glu + Ala216Gly + Asn218Glu
 Ser204Glu + Ile205Gln + Pro210Gly + Asn218Asp
 Gly 97Ser + Gly154Asn + Gln206Asp + Gly215Asp
 Gly 97Asp + Ala 98Gln + Asp 99Glu + Gly154Ser
 Thr158Gln + Val165Met + Gly211Glu + Lys213Glu
 Gly160Glu + Ser162Asp + Tyr167Ile + Gly219Ser
 Asn 61Ser + Thr 66Ser + Asn155Glu + Gly157Asp
 Thr158Asp + Ser159Asp + Thr164Asp + Gly211Asn
 Val 95Asp + Gly102Glu + Ala187Pro + Tyr217Pro
 Asn 62Glu + Gly100Asp + Thr208Asn + Tyr217His
 Ser204Asp + Gln206Glu + Gly211Gln + Ala216His
 Gly154Asn + Ser204Glu + Gln206Asp + Tyr217Thr
 Thr 66Gln + Ser130Glu + Ser132Asp + Thr158Pro
 Asp 60Glu + Gly 65Asn + Thr 66Glu + Tyr214Ser

Asp 60Glu + Gln206Ser + Pro210Glu + Gly219Ser
 Thr158Asp + Ser163Glu + Ser191Glu + Ile205Gly
 Ser204Asp + Gly215Gln + Ala216Glu + Gly219Asp
 Thr158Asp + Ala187Asp + Phe189Glu + Tyr217Met
 Gly128Gln + Pro129Asn + Val203Asp + Ala216Asp
 Gly 97Asn + Ile107Gln + Ser204Glu + Gly219Glu
 Trp106Asn + Gly157Gln + Ser204Asp + Gly219Asp
 Gly127Asp + Gly128Asn + Ser130Asp + Gly219Gln
 Val 95Ser + Pro129Gly + Asn155Glu + Ser188Glu
 Asn155Asp + Ser188Asp + Phe189Asn + Ala216Gly
 Trp106Phe + Ser204Asp + Gln206Asp + Tyr214Asp---
 Asn 62Asp + Gly 97Gln + Pro210Asp + Gly211Glu
 Val 95Asp + Tyr104Asp + Leu126Ser + Asn155Gln
 Gly100Asn + Gln206Asp + Lys213Glu + Ala216Asp
 Gln206Asp + Lys213Asp + Ala216Glu + Tyr217Asn
 Gly102Gln + Asn155Glu + Val203Glu + Asn218Asp
 Gln 59Glu + Thr 66Glu + Gly102Pro + Gly166Gln
 Leu126Cys + Gly157Asp + Ser163Asp + Ala216His
 Thr 66Asp + Gln206Asp + Ala216Asp + Gly219Pro
 Asn 62Asp + Ser 63Glu + Gly131Asn + Lys213Glu
 Leu126Asn + Pro129Asn + Ser191Asp + Gly219Glu
 Thr 66Asp + Gly100Asn + Gly127Ser + Lys213Glu
 Ile107Val + Phe189Asp + Val203Glu + Ala216Gln
 Ser 63Asp + Val 95Ser + Lys213Asp + Ala216Ser
 Ile107His + Val203Cys + Tyr214Glu + Tyr217Asp
 Asn 62Ser + Ser105Asp + Trp106Gly + Ser132Asp
 Ser 63Glu + Leu 96Cys + Pro210Glu + Ala216Glu
 Ala187Gly + Gly215Asp + Tyr217Thr + Asn218Glu
 Gly160Ser + Gln206Glu + Lys213Glu + Ala216Ser
 Gly131Pro + Phe189Leu + Gln206Glu + Lys213Glu
 Pro129Asn + Ala133Gln + Gln206Glu + Lys213Glu
 Ala 98His + Gly154Glu + Ser163Asp + Tyr217Met
 Val203His + Gln206Glu + Gly211Glu + Lys213Asp
 Leu126Ala + Ser204Glu + Gln206Asp + Lys213Glu
 Ile107Leu + Gly157Glu + Val203His + Gly219Glu
 Ala 98Glu + Gly102Asp + Ser105Glu + Leu209Thr
 Thr 66Gln + Lys213Glu + Ala216Glu + Asn218Glu
 Ser204Glu + Gln206Asn + Pro210Glu + Gly215Asp
 Gly127Asp + Ser132Asp + Gly154Asp + Val165Gln
 Ser 63Glu + Val203His + Asn212Glu + Tyr217Leu
 Gln206Glu + Lys213Glu + Tyr217Ala + Asn218Glu
 Gln206Asp + Lys213Glu + Ala216Asn + Asn218Asp
 Gly157Pro + Ser188Glu + Ser204Glu + Ala216Asp
 Gln 59Glu + Thr 66Asp + Gly100Gln + Gly215Glu
 Trp106Ser + Ala187Asp + Gln206Glu + Tyr217Asp
 Ser159Glu + Asn212Gln + Gly215Asp + Ala216Glu
 Gly160Asp + Ser161Asp + Gln206Asp + Tyr214Asn
 Thr 66Glu + Tyr167Gln + Gln206Glu + Gly211Pro
 Pro129Asn + Ser163Glu + Tyr217Glu + Asn218Glu
 Asn155Glu + Glu156Asp + Ser204Glu + Tyr214Thr

Gln 59Asp + Ser162Asp + Ser163Glu + Ala216Thr
 Leu126Pro + Ser162Glu + Ser163Glu + Tyr217Glu
 Gly100Glu + Val203Cys + Asn212Asp + Lys213Glu
 Ser105Glu + Ala187Ser + Val203Glu + Ser204Asp
 Gln103Asp + Ser163Glu + Thr164Glu + Pro201Gln
 Val 95Gln + Glul56Asp + Gly157Asp + Lys213Glu
 Ser162Glu + Thr164Gln + Ala216Asp + Tyr217Glu
 Asp 99Glu + Gly100Glu + Ser159Glu + Ala216Thr
 Ala 98Glu + Asp 99Glu + Trp106Gly + Gly154Asp
 Asn 62Glu + Ser 63Glu + Pro129Ser + Asn155Asp
 Asn 61Glu + Gln206Glu + Ala216Glu + Tyr217Cys
 Thr 66Pro + Gln103Asp + Glul56Asp + Ser191Asp
 Asp 60Glu + Ser204Asp + Ala216Asp + Tyr217Ile
 Ser105Asp + Ser204Asp + Gln206Ser + Ala216Glu
 Thr158Asn + Ser162Asp + Ser204Asp + Asn218Asp
 Gln 59Asp + Gly157Ser + Ser204Asp + Asn218Asp
 Gly 97Ser + Gly128Glu + Gln206Glu + Gly215Asp
 Trp106Asp + Val203Cys + Ser204Glu + Tyr217Glu
 Ser105Glu + Ala187Thr + Ser204Glu + Tyr217Glu
 Gly 97Asn + Asn155Glu + Ser163Glu + Tyr214Val
 Val 95Asp + Trp106Glu + Ala187Pro + Val203Asp
 Gln103Asp + Trp106Glu + Gly128Asn + Ser162Asp
 Gly128Glu + Ser130Asp + Ser188Glu + Ala216Gln
 Gln103Asp + Ser105Glu + Gly154Glu + Ala216Thr
 Ser159Glu + Gly211Glu + Lys213Asp + Tyr217Gly
 Gln 59Asn + Ser188Asp + Gly211Glu + Lys213Glu
 Ile107Glu + Gly211Glu + Lys213Asp + Tyr217Gln
 Ser159Asp + Ser162Glu + Pro210Glu + Ala216Asn
 Asp 60Glu + Asn 62Asp + Ser191Asp + Tyr217Leu
 Asp 60Glu + Ser 63Asp + Ile107Asn + Phe189Glu
 Leu 96Cys + Gly166Asp + Pro210Asp + Lys213Asp
 Val 95Glu + Ala 98Asn + Gly102Glu + Ser162Glu
 Ser 63Asp + Tyr167His + Ala216Glu + Gly219Glu
 Tyr104Asp + Thr158Asp + Ser191Glu + Asn218Ser
 Gly154Pro + Ser159Glu + Ser204Asp + Gln206Asp
 Gly102Glu + Ser204Asp + Gln206Glu + Tyr217His
 Asn155Gln + Ser163Asp + Ser204Glu + Gln206Glu
 Gly131Asp + Thr158Gln + Ser204Asp + Gln206Asp
 Tyr167Asp + Ser204Glu + Gln206Glu + Tyr217Asn
 Gly 97Asp + Ala133Gly + Ser204Asp + Gln206Asp
 Gly127Asp + Ser204Glu + Gln206Glu + Tyr21Asn
 Gly102Glu + Gly127Gln + Asn155Asp + Thr220Asp
 Gly 97Glu + Ser130Glu + Tyr167Asp + Tyr217Val
 Asn 62Glu + Ala187Gly + Pro210Asp + Ala216Glu
 Ser101Asp + Ser105Asp + Ala216His + Tyr217His
 Ser130Asp + Ser132Glu + Asn212Glu + Ala216Gln
 Ser130Glu + Ser132Glu + Gly160Asp + Thr220Gly
 Gly100Glu + Tyr104Thr + Ser130Asp + Ser132Asp
 Gln 59Ser + Gly160Asp + Gln206Glu + Tyr217Asp
 Gly127Asp + Pro129Glu + Ser188Asp + Gln206Asn

Ser159Asp + Thr164Glu + Phe189His + Lys213Glu
 Asn 61Asp + Gly 97Asp + Ser159Glu + Thr220Ser
 Ser159Glu + Ser163Glu + Ser204Glu + Tyr217Ser
 Thr158Asp + Ser162Glu + Ala187Pro + Ala216Glu
 Leu 96Val + Thr158Glu + Ser162Asp + Gly219Asp
 Asp 99Glu + Thr158Asp + Ser162Asp + Val203Met
 Val 95Asp + Gly131Asn + Ser163Asp + Ser191Glu
 Asn 61Glu + Asp 99Glu + Ser204Asp + Tyr217Gly
 Asn 62Asp + Gly166Ser + Ser204Asp + Gly215Glu
 Gly102Asp + Ser105Asp + Tyr167Ala + Gly211Glu
 Ser188Asp + Ser191Glu + Ala216Gly + Tyr217Glu
 Asp 60Glu + Gly 97Asp + Trp106Asn + Ser159Glu
 Thr 66Asp + Leu 96Glu + Phe189Gly + Gly215Asp
 Asn 62Glu + Thr 66Asp + Tyr104Pro + Gly166Asp
 Asn 61Ser + Ala 98Asp + Asn155Asp + Ser188Glu
 Gly100Glu + Tyr104Glu + Ser130Glu + Asn155Gln
 Asp 60Glu + Leu126Asn + Gln206Glu + Lys213Asp
 Ala 98Glu + Gly154Pro + Glul56Asp + Ser188Glu
 Gly128Gln + Ala133Glu + Ala187Glu + Ser191Asp
 Ser101Glu + Gly154Asn + Gly211Glu + Tyr214Glu
 Ser132Asp + Asn155Asp + Thr158Glu + Ala216Thr
 Asn 61Glu + Asn155Asp + Ala187Asp + Asn212Gln
 Gln103Glu + Gly160Asn + Gln206Glu + Asn218Glu
 Gln 59Glu + Gly100Glu + Thr164Pro + Gly211Asp
 Ser 63Glu + Ser101Asp + Gly131Ser + Val203Pro
 Gln 59Asp + Thr 66Asp + Tyr104Val + Ala133Asp
 Ser 63Glu + Ser101Glu + Ala133His + Ala216Glu
 Asp 60Glu + Val 95Ala + Lys213Glu + Tyr217Ala
 Trp106Met + Ser191Glu + Lys213Glu + Gly219Glu
 Ser 63Asp + Gly160Asp + Lys213Asp + Ala216His
 Gly102Asp + Gly157Asn + Ser162Glu + Ser191Glu
 Gln 59Ser + Ser105Asp + Ser162Asp + Ser191Asp
 Gly127Pro + Ser162Glu + Ser191Glu + Asn212Asp
 Ser 63Asp + Ser105Asp + Ser132Asp + Ala216His
 Thr 66Gln + Gly128Glu + Glul56Asp + Ala216Asp
 Gly128Asp + Gly157Asn + Pro210Gln + Thr220Glu
 Glul56Asp + Gln206Glu + Lys213Glu + Ala216Asn
 Asp 99Glu + Gly157Pro + Gln206Asp + Lys213Glu
 Ser163Asp + Gln206Asp + Lys213Glu + Tyr217Ala
 Gly154Glu + Ser163Glu + Pro210Gln + Tyr217Asp
 Gly154Asp + Gly157Asn + Ser163Asp + Ser204Glu
 Gly154Ser + Gly157Asp + Lys213Glu + Ala216Glu
 Gly157Ser + Thr158Glu + Lys213Asp + Ala216Asp
 Ser101Glu + Gly154Pro + Lys213Asp + Ala216Glu
 Gly100Asp + Lys213Glu + Ala216Asp + Tyr217Leu
 Asn 62Ser + Thr158Glu + Ser204Asp + Thr220Asp
 Thr 66Asn + Ile107Val + Lys213Asp + Tyr217Asp
 Gly157Asn + Pro201Gln + Lys213Glu + Tyr217Asp
 Gly127Glu + Thr158Pro + Ala187Asp + Ser204Glu
 Asp 99Glu + Ala133Gly + Ser188Glu + Thr220Glu

Asp 60Glu + Ser188Glu + Gln206Ser + Asn218Glu
 Gln 59Asp + Leu 96Glu + Gly131Gln + Ser132Asp
 Ser101Glu + Pro129Asp + Thr158Asn + Val203Ser
 Ser 63Glu + Ser163Asp + Ala216Asp + Tyr217Gln
 Gly102Gln + Gly160Glu + Ser191Glu + Lys213Glu
 Val 95Glu + Asp 99Glu + Gly215Glu + Asn218Gln
 Ser105Glu + Ala133Glu + Val203Glu + Asn218Gln
 Gln103Asp + Ser132Glu + Ser162Glu + Gln206Ser
 Asp 60Glu + Ser101Asp + Thr164Gly + Lys213Asp
 Gln 59Asp + Asp 99Glu + Gln103Asn + Ala187Pro
 Asp 60Glu + Ser159Asp + Tyr167Leu + Ser188Asp
 Asn 62Glu + Ser163Glu + Gly211Glu + Ala216His
 Asn 62Glu + Ser132Asp + Pro210Gly + Gly211Glu
 Gly102Asn + Ser162Asp + Gln206Asp + Gly219Asp
 Ser188Asp + Ser204Asp + Tyr217Leu + Thr220Gln
 Ser 63Glu + Gly166Gln + Ala216Thr + Asn218Glu
 Gln103Glu + Gly131Glu + Tyr217Thr + Thr220Glu
 Asp 60Glu + Phe189His + Asn212Glu + Ala216Asp
 Asn155Gln + Gly215Glu + Tyr217Pro + Gly219Asp
 Gly102Asn + Leu126Glu + Ser130Glu + Lys213Asp
 Ala 98Asp + Gly166Glu + Pro210Asp + Tyr214Gln
 Asn 62Glu + Asn155Ser + Lys213Asp + Tyr217Leu
 Asp 60Glu + Ser105Glu + Lys213Glu + Thr220Gln
 Asp 60Glu + Gln206Ser + Lys213Asp + Asn218Asp
 Ser 63Glu + Gly 97Gln + Gln103Asp + Gln206Asp
 Ser 63Glu + Val 95Ala + Ser130Asp + Gln206Asp
 Ser 63Asp + Ile107Met + Ser191Asp + Gln206Asp
 Pro129Asn + Ser130Asp + Lys213Glu + Tyr217Glu
 Pro129Asn + Ser191Glu + Lys213Asp + Tyr217Glu
 Gly 97Gln + Gly102Asp + Pro129Glu + Phe189Gln
 Gln 59Asn + Ser162Glu + Phe189Asp + Ser204Asp
 Gly127Pro + Gly128Glu + Phe189Glu + Ser204Asp
 Leu 96Pro + Ser105Asp + Ser130Glu + Ala133Gly
 Tyr167His + Ser191Glu + Asn212Glu + Asn218Asp
 Asn 61Glu + Thr158Gln + Lys213Asp + Tyr217Asn
 Gln 59Asp + Gly157Asp + Gln206Ser + Asn218Asp
 Gly154Ser + Ser163Glu + Ser188Glu + Ser204Asp
 Leu 96Asn + Ser130Asp + Ser188Asp + Ser204Glu
 Ile107Asp + Ser188Asp + Ser204Asp + Gln206Asn
 Gln206Glu + Ala216Gly + Tyr217Leu + Thr220Asp
 Gly102Glu + Leu126Cys + Ser130Glu + Tyr214Asp
 Asn 62Glu + Gly160Asp + Lys213Glu + Ala216Gly
 Ser101Asp + Trp106Met + Gly154Asp + Ser162Asp
 Asp 60Glu + Gly102Glu + Gln206Asn + Ala216Asp
 Glu156Asp + Gln206Ser + Pro210Asp + Tyr217Asp
 Pro129Glu + Ser159Asp + Gln206Glu + Tyr217Pro
 Pro129Asp + Ser159Glu + Lys213Asp + Tyr217His
 Ser105Glu + Trp106Leu + Gly127Glu + Ser163Glu
 Ser101Asp + Ala133Gln + Ser191Asp + Val203Asp
 Ser 63Glu + Ser130Asp + Tyr217Gln + Gly219Asp

Gly131Asp + Ser163Asp + Gly166Asn + Ser204Asp
 Ile107Asp + Gln206Ser + Asn212Glu + Ala216Asp
 Leu126Gly + Ser130Asp + Gly154Asn + Asn218Asp
 Gln 59Asp + Ser105Asp + Gly166Gln + Ser204Asp
 Asn 61Asp + Ser105Glu + Ala187Gln + Ala216Gly
 Ser105Asp + Phe189Ile + Lys213Glu + Gly219Gln
 Ser 63Glu + Gly131Gln + Ser204Glu + Gly219Asn
 Gly157Pro + Thr164Glu + Gln206Asn + Lys213Asp
 Leu 96Ile + Ser101Asp + Gln206Glu + Tyr214Ala
 Thr 66Gln + Leu 96Met + Tyr167Glu + Ser188Glu
 Tyr104Cys + Gly160Asp + Ile205Pro + Ala216Glu
 Asp 60Glu + Ser130Asp + Pro201Gln + Ala216Gly
 Ile107Asp + Ser191Asp + Gln206Asp + Ala216Thr
 Gln 59Asp + Val 95Asn + Ser101Glu + Ser163Glu
 Val 95Gln + Tyr104Cys + Lys213Glu + Asn218Asp
 Asn 62Asp + Gly 97Asn + Ala 98Ser + Ser162Glu
 Gln103Glu + Ser204Asp + Gln206Asn + Ala216Pro
 Ser101Asp + Ser162Asp + Gly166Ser + Tyr217Thr
 Leu126Ile + Gly128Asp + Pro210Ser + Asn218Glu
 Gly100Glu + Gly160Ser + Gly166Glu + Ala216Thr
 Gln103Asn + Ser132Asp + Ser163Glu + Ser188Asp

Tabulka 25

 Vícesmyčkové varianty s pětinasobnou mutací

Val 95Gln + Tyr104Cys + Gly127Gln + Lys213Glu + Ala216Pro
 Asn 61Ser + Leu 96His + Gly157Pro + Val203Asp + Ala216Gly
 Leu 96Gln + Gly127Gln + Glu156Asp + Tyr214Ala + Thr220Asn
 Gly100Gln + Tyr167Cys + Ser188Glu + Val203Gln + Ala216His
 Asn 62Ser + Trp106Gly + Ser132Asp + Ala187Ser + Phe189Ser
 Thr 66Ser + Gly127Gln + Pro201Asn + Ala216Thr + Gly219Asp
 Gly 97Asn + Gly154Pro + Gln206Asn + Pro210Glu + Gly211Pro
 Pro129Gly + Ser132Glu + Thr158Asn + Val165Thr + Gln206Asn
 Gly 65Ser + Gly 97Gln + Gly128Ser + Lys213Asp + Gly219Gln
 Leu 96Met + Gln103Asn + Ala133Ser + Gly154Pro + Gly219Pro
 Asn 61Gln + Trp106Ala + Gly211Pro + Asn218Asp + Gly219Asn
 Thr 66Gly + Tyr104Ile + Gly211Glu + Gly215Pro + Ala216Gly
 Leu126Ile + Ser130Asp + Gly154Asn + Asn212Ser + Tyr217Thr
 Leu126Val + Gln206Ser + Pro210Gly + Gly215Glu + Ala216Pro
 Leu 96Asn + Leu126Pro + Lys213Asp + Ala216Ser + Tyr217His
 Trp106Asn + Gly127Ser + Ser161Glu + Gln206Asn + Gly219Asn
 Ser101Glu + Gly102Gln + Ile107Gln + Val165Gln + Val203Ala
 Asp 60Glu + Ala 98Gly + Ile107Ser + Gly157Ser + Thr164Ser
 Pro129Glu + Gly160Pro + Gly166Asn + Ala187Pro + Gly202Ser
 Leu 96Ile + Tyr167Thr + Ser188Asp + Val203His + Gln206Ser
 Asn 61Gln + Val 95Asp + Gly102Asn + Gly131Asn + Ala187Asn
 Gly160Asn + Val203Thr + Pro210Glu + Asn218Gln + Thr220Gln
 Gly128Asn + Asn155Glu + Gly166Gln + Ala216Gly + Thr220Gly
 Gly 65Ser + Val 95Met + Gly100Asn + Gly131Asp + Tyr214Gly
 Tyr104Gly + Pro129Ser + Ser163Glu + Gln206Ser + Gly219Ser

Asn 61Ser + Val 95Gln + Ser204Asp + Pro210Gly + Ala216Gln
 Gly 65Gln + Gly 97Pro + Ser130Glu + Gly154Ser + Pro210Asn
 Trp106Ser + Gly128Asn + Ser159Glu + Pro201Ser + Tyr217Val
 Leu 96Met + Leu126Asn + Asn155Gln + Ser188Glu + Gly202Gln
 Gly100Glu + Thr158Gln + Thr164Asn + Gln206Asn + Ala216Thr
 Asn 62Glu + Leu 96Ile + Gly 97Ser + Gly211Ser + Gly219Ser
 Gly102Asp + Tyr167Ala + Pro210Gly + Ala216Thr + Tyr217Met
 Ser132Glu + Thr158Pro + Phe189Thr + Ala200Gln + Tyr214Ala
 Ala 98Pro + Trp106Pro + Gly160Pro + Ala216Asn + Tyr217Asp
 Gly127Pro + Ala133Asn + Thr164Glu + Gly211Gln + Tyr214Thr
 Gly100Asn + Trp106Pro + Gly127Ser + Lys213Glu + Tyr214Ala
 Gly157Asn + Ser204Asp + Gln206Asn + Tyr217Val + Gly219Pro
 Leu 96Thr + Gly131Asp + Ala133Thr + Gln206Asn + Ala216Gly
 Gly100Ser + Tyr104Ala + Thr164Asp + Gly211Gln + Thr220Ser
 Ser101Asp + Pro129Ser + Phe189Val + Pro201Asn + Ala216Ser
 Thr 66Gly + Gly102Asn + Tyr104His + Trp106Thr + Ala187Asn
 Thr 66Asn + Gly102Glu + Trp106Gly + Gly166Ser + Ala216Thr
 Gly128Gln + Gly154Asn + Tyr167Gly + Tyr217Leu + Asn218Glu
 Ala133Ser + Gly157Ser + Phe189Thr + Gly202Asn + Asn212Glu
 Tyr104Ser + Thr158Gly + Thr164Glu + Gln206Asn + Ala216Pro
 Gln 59Asn + Gln103Asn + Thr164Gly + Ala187Pro + Thr220Asp
 Gly 97Gln + Gly102Asp + Gly127Ser + Phe189Gln + Tyr217Leu
 Thr 66Asn + Gln206Glu + Tyr214Ile + Ala216Thr + Tyr217Cys
 Asp 60Glu + Thr 66Gly + Leu 96Gly + Ala216His + Tyr217Asn
 Ile107Asp + Gly160Asn + Val203Pro + Gly211Pro + Gly219Asn
 Val 95Ser + Trp106Cys + Val165Gln + Pro210Gln + Tyr217Glu
 Trp106Thr + Thr158Ser + Thr164Pro + Ser204Glu + Thr220Pro
 Gly128Pro + Ala187Ser + Gln206Asn + Asn212Ser + Gly215Asp
 Trp106Gln + Leu126Gly + Thr164Ser + Val203Gln + Asn218Asp
 Asp 60Glu + Val 95Gln + Leu126Pro + Gly157Asn + Val203Thr
 Gln 59Asn + Trp106Cys + Ala200Thr + Gly211Gln + Ala216Gln
 Asn 62Ser + Ile107Gly + Leu126Cys + Pro210Glu + Thr220Gly
 Asn 62Gln + Thr158Glu + Val203Ser + Gly215Ser + Ala216Thr
 Gln 59Asn + Asp 60Glu + Trp106Phe + Gly154Gln + Thr208Pro
 Thr 66Ser + Asn155Gln + Val203Gln + Gln206Glu + Tyr217His
 Gly128Pro + Phe189Met + Val203Gly + Ser204Glu + Ala216Glu
 Gln 59Ser + Asn 62Ser + Leu 96Gly + Ser204Glu + Asn218Asp
 Gln103Ser + Gly128Gln + Ser204Glu + Gly211Asn + Asn218Glu
 Gly 97Pro + Pro129Gln + Gly157Asn + Ser204Asp + Asn218Glu
 Leu126Asn + Thr158Gln + Val165Met + Gly211Glu + Lys213Glu
 Gly157Ser + Ser204Glu + Gln206Asp + Tyr217Cys + Thr220Gly
 Ala133Thr + Phe189Ser + Ser204Asp + Gln206Asp + Tyr214Ile
 Gly100Gln + Gly154Asn + Ser204Glu + Gln206Asp + Tyr217Thr
 Gly127Asp + Gly128Glu + Gly154Glu + Gly157Asn + Phe189Ser
 Gly100Gln + Trp106Thr + Ser130Asp + Tyr167Glu + Tyr217Thr
 Glu156Asp + Thr158Asp + Tyr167Gly + Pro201Gln + Gly215Ser
 Gly157Gln + Val203Asp + Ser204Asp + Ala216Pro + Gly219Asp
 Leu126Gly + Pro129Glu + Gly131Glu + Tyr167Met + Thr220Gln
 Leu 96Ser + Ser130Asp + Gly166Glu + Ala216Gln + Tyr217Ile
 Asn155Glu + Gly160Asn + Gly166Glu + Tyr217Cys + Thr220Asp

Asn 62Asp + Gly 97Gln + Trp106Gly + Pro210Asp + Asn212Gln
 Val 95Asp + Tyr104Glu + Leu126Ser + Asn155Gln + Gln206Ser
 Gly154Glu + Thr158Asp + Phe189Glu + Gly215Asn + Tyr217Met
 Ile107Leu + Gly154Asp + Gly157Glu + Val203His + Gly219Glu
 Trp106Ile + Asn155Ser + Ser159Asp + Ser191Glu + Ala216Thr
 Gly100Asp + Leu126Asp + Gly127Ser + Pro129Gln + Thr220Ser
 Ala133Pro + Gln206Glu + Tyr214Ala + Asn218Glu + Gly219Ser
 Thr 66Gly + Ser101Glu + Gly102Asn + Leu126Glu + Ala216Pro
 Gly100Glu + Gly102Glu + Tyr104Glu + Asn155Gln + Val203Ala
 Leu126His + Ala187Glu + Val203Glu + Gln206Asp + Asn218Glu
 Asp 60Glu + Leu 96Asn + Pro129Gln + Gly211Glu + Tyr217Met
 Leu 96Cys + Ile107Ala + Ala133Pro + Gly157Asp + Gly160Asp
 Ser 63Asp + Thr158Gly + Gln206Asp + Tyr214Asp + Tyr217Asp
 Gln 59Asp + Asn 62Asp + Gly100Glu + Phe189Tyr + Tyr214Met
 Ser101Glu + Gly127Glu + Ala187Gln + Gln206Asn + Tyr217Ile
 Asn 62Asp + Ser 63Glu + Gly100Asp + Gly131Asn + Lys213Glu
 Asp 60Glu + Gly 97Asp + Ala 98Glu + Phe189His + Gly211Glu
 Asp 60Glu + Val 95Glu + Asp 99Glu + Ser101Asp + Val165Thr
 Gly102Gln + Gly154Glu + Asn155Glu + Ser191Asp + Gln206Asp
 Asn 61Ser + Thr 66Ser + Leu126Glu + Asn155Glu + Gly157Asp
 Pro129Asn + Ala133Gln + Phe189Ile + Gln206Glu + Lys213Glu
 Asn 61Ser + Gln206Asp + Lys213Glu + Tyr217Ala + Gly219Asn
 Gln 59Asn + Gly128Asn + Ala200Thr + Gln206Glu + Lys213Glu
 Phe189Gln + Val203Gly + Gln206Asp + Lys213Asp + Tyr217Pro
 Ala 98His + Gly154Glu + Ser163Asp + Val203Met + Tyr217Met
 Leu 96Met + Pro129Gly + Gly154Glu + Ser163Glu + Tyr217Ser
 Gly 97Pro + Ser204Glu + Lys213Asp + Ala216Glu + Gly219Ser
 Val165Ser + Lys213Glu + Tyr214Cys + Ala216Glu + Tyr217Pro
 Ser191Glu + Ser204Glu + Gln206Asp + Tyr214His + Ala216Asp
 Gly102Pro + Asn155Asp + Ala216Glu + Tyr217His + Asn218Glu
 Asn155Asp + Gly215Pro + Ala216Glu + Tyr217Ser + Asn218Glu
 Gly160Ser + Ser204Glu + Gln206Glu + Lys213Glu + Ala216Ser
 Ala 98Thr + Ala187Ser + Ser204Glu + Gln206Glu + Lys213Asp
 Gly127Pro + Ser204Glu + Gln206Glu + Lys213Glu + Tyr217Ala
 Leu126Met + Pro129Glu + Ser163Glu + Phe189Thr + Asn218Ser
 Ser101Asp + Ser204Asp + Gln206Glu + Ala216Asn + Tyr217Glu
 Val 95Ala + Tyr167Asp + Ser204Glu + Gln206Glu + Tyr217Glu
 Asn155Glu + Glul56Asp + Thr164Asp + Ser204Glu + Tyr214Thr
 Trp106Pro + Gly127Asp + Ser130Asp + Asn155Asp + Gly219Gln
 Pro129Ser + Ser204Asp + Gln206Glu + Pro210Asp + Asn218Glu
 Tyr104Val + Leu126Asp + Gly157Asp + Ser163Asp + Thr164Asp
 Leu 96Asp + Gly 97Asp + Gln103Asp + Tyr217Cys + Gly219Asp
 Ser159Glu + Asn212Gln + Lys213Glu + Gly215Asp + Ala216Glu
 Gln 59Asp + Asn 62Glu + Ser 63Glu + Pro129Ser + Asn155Asp
 Gln103Ser + Tyr104Ala + Val203Asp + Gln206Asp + Lys213Glu
 Val 95Glu + Glul56Asp + Gly157Asp + Tyr214Gly + Thr220Asp
 Val 95Glu + Gly215Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu + Gly219Ser
 Ser 63Asp + Gly160Asp + Ser161Glu + Val203Ser + Tyr217Cys
 Gly160Asp + Ser161Asp + Tyr167Met + Ser204Asp + Tyr217Ala
 Leu 96His + Trp106Asp + Gln206Asn + Asn218Asp + Gly219Asp

Gly100Glu + Ser101Asp + Trp106Met + Ser162Asp + Thr164Pro
 Ser105Glu + Ala187Ser + Val203Glu + Ser204Asp + Ala216Gly
 Asp 60Glu + Trp106Asn + Val203Glu + Ser204Glu + Ala216Gln
 Gln103Asp + Ser163Glu + Thr164Glu + Pro201Gln + Ala216Pro
 Val 95Gln + Gly100Asn + Glul56Asp + Gly157Asp + Lys213Glu
 Thr158Asp + Ser159Asp + Ser204Glu + Gly215Asn + Tyr217Cys
 Ser105Asp + Trp106Glu + Thr164Asn + Ala216Asp + Gly219Ser
 Gln 59Glu + Asp 60Glu + Tyr104Asn + Ser191Glu + Pro201Gln
 Gln103Asp + Ser161Glu + Ser162Asp + Gln206Ser + Tyr217His
 Ala 98Asp + Asp 99Glu + Ser105Glu + Thr164Gln + Ala187Ser
 Gly154Asp + Asn155Asp + Ser204Glu + Ala216Gln + Tyr217Ala
 Asn 61Glu + Tyr104Ser + Gln206Glu + Ala216Glu + Tyr217Cys
 Gly157Ser + Thr158Glu + Gln206Asp + Lys213Asp + Ala216Asp
 Val 95Thr + Gly157Glu + Ser188Glu + Ser204Glu + Ala216Asp
 Tyr104His + Asn155Glu + Gly157Asn + Tyr167Glu + Gly202Ser
 Gly128Asp + Gly157Asn + Pro210Gln + Asn218Glu + Thr220Glu
 Asn 62Glu + Val 95Ala + Gly100Asp + Lys213Glu + Tyr217His
 Gly166Asp + Gln206Ser + Gly215Pro + Tyr217Asp + Gly219Asp
 Ser130Asp + Ser163Asp + Tyr167Ser + Ser191Asp + Tyr217Met
 Gly 97Pro + Ser132Asp + Thr158Gly + Ser204Glu + Ala216Asp
 Gly154Asp + Ser191Asp + Lys213Asp + Tyr214Ala + Tyr217Asn
 Asn 61Gln + Ile107His + Ser204Glu + Lys213Glu + Asn218Glu
 Gln 59Asp + Ala 98Glu + Gly102Asp + Ser105Glu + Leu209Thr
 Ala133Gly + Gly154Asp + Gln206Glu + Gly215Glu + Thr220Gln
 Gly154Asn + Gly160Ser + Gly166Glu + Gln206Asp + Gly215Asp
 Leu 96Glu + Ala 98Asn + Tyr167Asn + Gln206Glu + Gly215Glu
 Ser162Glu + Thr164Glu + Thr208Gln + Ala216Asp + Tyr217Glu
 Val 95Asp + Ile107Asp + Tyr167His + Ser188Glu + Thr220Asn
 Gly154Glu + Gly166Asp + Lys213Asp + Ala216Ser + Tyr217Cys
 Gly 97Glu + Asp 99Glu + Glul56Asp + Tyr167Ala + Ala216Pro
 Thr 66Gly + Gln103Asp + Trp106Glu + Gly128Asn + Ser162Asp
 Gln103Glu + Ser105Glu + Thr158Ser + Leu209Thr + Lys213Glu
 Thr 66Gln + Thr164Asp + Val203His + Gly211Glu + Lys213Glu
 Pro129Asn + Gly131Gln + Thr164Glu + Gly211Glu + Lys213Asp
 Ser159Asp + Ser162Glu + Gln206Ser + Pro210Glu + Tyr214Ala
 Asp 99Glu + Ser101Asp + Gly131Asn + Lys213Glu + Gly215Ser
 Gln103Glu + Tyr104Gly + Thr164Pro + Pro210Asp + Asn212Glu
 Asn 62Ser + Ser132Asp + Gly160Glu + Ser162Glu + Ala216His
 Gly160Glu + Ser162Asp + Tyr167Ile + Ser204Glu + Gly219Ser
 Asp 60Glu + Ser 63Asp + Ser130Glu + Gly202Gln + Gly215Ser
 Gly154Glu + Glul56Asp + Pro210Glu + Lys213Asp + Asn218Gln
 Ser105Asp + Trp106Gly + Gly127Asp + Gly154Asp + Val165Gln
 Asn 62Glu + Gly100Glu + Gly157Asn + Gly166Glu + Tyr217Leu
 Asn 62Asp + Pro129Gly + Ala133Gly + Ser204Asp + Gln206Asp
 Asp 60Glu + Gly100Asn + Ser204Asp + Gln206Glu + Pro210Ser
 Ser162Glu + Thr164Glu + Val203Thr + Ser204Asp + Asn212Ser
 Gly 97Glu + Ser130Glu + Tyr167Asp + Tyr217Val + Gly219Ser
 Gly128Glu + Ser163Glu + Gly166Glu + Gln206Glu + Ala216Ser
 Asp 60Glu + Asn 61Glu + Ala187Gly + Lys213Glu + Ala216Glu
 Gly 97Asp + Ser101Asp + Tyr104Glu + Ser161Glu + Tyr217Val

Ser 63Glu + Ile107Gln + Gln206Asp + Ala216Asp + Thr220Glu
 Ser130Glu + Ser132Glu + Gly160Asp + Ala216Gln + Thr220Gly
 Val 95Glu + Ser130Asp + Ser132Glu + Ala200Gly + Tyr217His
 Thr 66Gly + Gly100Glu + Gln103Asp + Ser132Asp + Tyr217Asn
 Asp 60Glu + Gly128Glu + Gln206Asn + Pro210Glu + Ala216Gln
 Leu126Val + Thr158Glu + Val203Met + Lys213Asp + Gly215Glu
 Asp 99Glu + Ser159Glu + Thr164Glu + Tyr167Leu + Gln206Ser
 Val 95Asp + Pro129Asn + Thr164Gln + Ala216Glu + Asn218Glu
 Gly154Asp + Ala187Gly + Gly215Asp + Tyr217Thr + Asn218Glu
 Asn 62Glu + Gly 97Asp + Gly100Asn + Ser204Glu + Tyr217Cys
 Asn 62Glu + Gly 97Asp + Glu156Asp + Val203Cys + Ala216Gly
 Asn 62Asp + Gly 97Asp + Ser204Asp + Tyr214Leu + Tyr217Leu
 Glu156Asp + Ser163Asp + Gln206Ser + Gly215Asp + Ala216Asp
 Ser159Glu + Ser163Glu + Phe189His + Ser204Glu + Tyr217Ser
 Gly100Pro + Asn155Gln + Ser159Asp + Ser163Asp + Ser204Glu
 Gly102Asp + Ala187Asp + Ser188Asp + Val203His + Ser204Asp
 Asp 99Glu + Thr158Asp + Ser162Asp + Val203Met + Ala216Thr
 Val 95Cys + Gly 97Pro + Ser163Glu + Ser191Asp + Ser204Asp
 Leu 96Glu + Asp 99Glu + Ser159Glu + Gln206Asn + Ala216Thr
 Gly127Pro + Ser162Glu + Ser191Glu + Gly211Glu + Asn212Asp
 Ser 63Glu + Ser191Asp + Gln206Asp + Ala216Asp + Tyr217Gln
 Ser 63Glu + Phe189Ile + Val203Met + Gln206Asp + Gly211Glu
 Trp106Tyr + Phe189Asp + Pro210Asp + Lys213Glu + Asn218Glu
 Ser191Glu + Gln206Glu + Ala216Gly + Tyr217Leu + Thr220Asp
 Val 95Gly + Thr158Asp + Ser161Asp + Ala187Pro + Asn218Asp
 Thr 66Glu + Gly166Glu + Phe189Val + Ser191Glu + Gly219Ser
 Asp 60Glu + Asp 99Glu + Gln206Glu + Gly211Pro + Ala216Glu
 Asn 61Asp + Ser 63Asp + Gln103Glu + Lys213Asp + Tyr217Pro
 Tyr104Glu + Gly128Gln + Ser132Glu + Asn212Asp + Ala216Ser
 Asn 62Asp + Ser204Asp + Gly215Glu + Ala216Gln + Tyr217Leu
 Asn 61Asp + Gly100Asp + Trp106Ala + Asn212Gln + Lys213Asp
 Gly127Glu + Gly157Gln + Ser204Asp + Lys213Asp + Ala216Glu
 Leu 96Glu + Gly 97Ser + Gly100Glu + Gln206Asp + Lys213Asp
 Asp 60Glu + Leu 96Cys + Gly 97Glu + Ser204Glu + Gly215Asn
 Tyr167Pro + Ser204Asp + Lys213Glu + Ala216His + Gly219Glu
 Gly 97Ser + Ser105Asp + Asn155Glu + Gly166Asp + Val203Asn
 Gly102Asn + Gly160Asn + Thr164Glu + Gln206Asn + Thr220Asp
 Asn 61Ser + Ala 98Asp + Asn155Asp + Ser188Glu + Val203Ser
 Glu156Asp + Ser204Asp + Gln206Glu + Lys213Glu + Ala216Pro
 Asp 99Glu + Gly157Pro + Ser204Glu + Gln206Asp + Lys213Glu
 Ser130Asp + Gly160Asn + Ser204Glu + Gln206Asn + Gly215Asp
 Gly127Glu + Glu156Asp + Ser204Glu + Gln206Asp + Tyr214Pro
 Ala 98Glu + Asp 99Glu + Trp106Gly + Gly154Asp + Asn218Glu
 Gln 59Ser + Val 95Glu + Ala 98Asn + Ser105Glu + Gln206Glu
 Gly 97Pro + Gly128Glu + Lys213Asp + Ala216Glu + Asn218Glu
 Gln103Asp + Ile107Asp + Gly157Pro + Tyr167Glu + Ala216Glu
 Asp 60Glu + Gln206Glu + Lys213Asp + Gly215Pro + Asn218Glu
 Ser130Glu + Thr164Glu + Val203Met + Ser204Asp + Gln206Asp
 Asp 60Glu + Ser 63Glu + Gly154Asp + Gly166Ser + Ser188Asp
 Leu 96His + Ser130Glu + Glu156Asp + Tyr167Glu + Lys213Glu

Gln 59Ser + Glu156Asp + Gly160Glu + Gly211Glu + Lys213Glu
 Gly127Glu + Asn155Asp + Ala187His + Ala216Glu + Tyr217His
 Gln103Glu + Gly160Asn + Gln206Glu + Tyr214Gly + Asn218Glu
 Ser 63Asp + Gly202Pro + Lys213Asp + Gly215Gln + Asn218Asp
 Asp 60Glu + Leu 96Glu + Thr158Gln + Gly166Pro + Gln206Asp
 Gly 97Asp + Gln103Asp + Phe189Ala + Gln206Ser + Lys213Asp
 Asn 62Asp + Thr 66Glu + Tyr104Pro + Ser132Asp + Asn212Asp
 Ala 98Pro + Pro129Asp + Ser130Asp + Lys213Glu + Tyr217Glu
 Ser 63Asp + Glu156Asp + Gln206Glu + Lys213Glu + Ala216Pro
 Asp 60Glu + Gly102Gln + Ser105Glu + Thr164Gln + Gly211Glu
 Asp 60Glu + Thr158Gln + Lys213Glu + Ala216Gln + Tyr217Val
 Ile107Asp + Gly131Asp + Ala216Asp + Tyr217His + Asn218Asp
 Ser 63Asp + Gly100Glu + Gln103Asp + Gln206Asn + Gly219Asp
 Asn155Glu + Gly157Glu + Gln206Asn + Pro210Asp + Ala216Glu
 Ser 63Asp + Ile107Met + Pro129Asn + Ser191Asp + Gly219Glu
 Ser 63Asp + Val 95Ala + Asp 99Glu + Leu126Thr + Ser163Asp
 Thr 66Glu + Gly100Gln + Gln103Asp + Lys213Asp + Ala216Asn
 Thr158Asp + Ser161Asp + Gln206Asp + Tyr217Cys + Gly219Asp
 Ser 63Glu + Ser162Asp + Ala187Gln + Gly211Asn + Lys213Asp
 Gly 97Ser + Ser101Asp + Val203Cys + Tyr214Glu + Tyr217Asp
 Val 95Glu + Asp 99Glu + Ser204Asp + Gly215Glu + Asn218Gln
 Gln 59Glu + Thr 66Asp + Ser163Asp + Pro201Gln + Gly215Glu
 Ala 98His + Ser101Glu + Gly166Gln + Ser188Asp + Val203Asp
 Ser 63Asp + Gly160Asp + Val203Ala + Ser204Asp + Gln206Glu
 Gly127Glu + Ser162Glu + Ser163Glu + Lys213Asp + Ala216His
 Ser162Asp + Ala187Glu + Pro201Gln + Gln206Asp + Tyr217Glu
 Gly157Glu + Phe189Tyr + Val203Glu + Ser204Glu + Lys213Glu
 Gly160Glu + Ser161Asp + Tyr167Glu + Gly202Asn + Gln206Glu
 Asp 60Glu + Ser159Asp + Thr164Glu + Phe189His + Lys213Glu
 Tyr104Cys + Ser162Glu + Lys213Glu + Asn218Asp + Gly219Glu
 Tyr104Asp + Gly128Asn + Ser130Asp + Gly157Ser + Ser204Glu
 Ser132Glu + Gly157Ser + Ser163Asp + Asn212Asp + Lys213Glu
 Gly 97Asp + Ala 98Asp + Pro129Glu + Tyr167Leu + Gln206Asp
 Ser101Glu + Thr158Gln + Ala187Glu + Ser188Glu + Gln206Glu
 Asp 99Glu + Gly100Asp + Asn155Asp + Gly166Gln + Ser204Glu
 Ser130Glu + Ser161Glu + Ser162Asp + Thr164Asn + Gly211Asp
 Gln 59Asn + Tyr104Asp + Thr158Asp + Ser191Glu + Asn218Glu
 Asp 60Glu + Ser101Glu + Ser204Glu + Gln206Ser + Pro210Asp
 Ser130Asp + Ser159Asp + Ser163Glu + Pro210Gln + Tyr217Asp
 Asn 61Asp + Gly100Asp + Trp106Pro + Gly128Glu + Tyr217Asp
 Gly102Pro + Gly131Asp + Ser188Asp + Ser204Glu + Gln206Glu
 Glu156Asp + Ser204Asp + Gln206Asp + Asn212Asp + Ala216His
 Thr 66Pro + Gln103Asp + Glu156Asp + Ser191Glu + Gln206Asp
 Gly131Pro + Phe189Leu + Ser191Glu + Gln206Glu + Lys213Glu
 Ala 98Glu + Gly157Ser + Gln206Asp + Lys213Asp + Gly215Gln
 Tyr104Leu + Thr158Glu + Gly202Ser + Gln206Glu + Lys213Glu
 Ser 63Glu + Ala 98Gln + Gly102Asn + Ser130Asp + Tyr217Glu
 Thr158Glu + Gly166Asn + Pro210Glu + Lys213Glu + Thr220Glu
 Trp106Thr + Gly154Ser + Gly157Asp + Lys213Glu + Ala216Glu
 Ala 98Ser + Ala187Glu + Lys213Asp + Gly215Gln + Ala216Asp

Tyr104Pro + Ser159Asp + Gly202Asn + Lys213Glu + Ala216Asp
 Leu126Asn + Asn155Glu + Thr164Asn + Lys213Asp + Ala216Glu
 Ser161Asp + Val203His + Ser204Asp + Gly211Asp + Tyr217Asp
 Asn 61Asp + Ser163Asp + Val203His + Ser204Glu + Tyr217Asp
 Val 95Asp + Trp106Glu + Ser161Glu + Ala187Pro + Ser204Asp
 Leu 96Glu + Gly100Asp + Trp106Cys + Ser188Glu + Gln206Asp
 Ser101Glu + Ser204Asp + Gly211Glu + Lys213Asp + Gly215Asn
 Asp 99Glu + Ser159Glu + Ser162Glu + Ser204Asp + Gly219Asn
 Leu 96Ala + Gln103Asp + Leu126Val + Gly128Asp + Ser204Asp
 Ala 98Glu + Ser105Glu + Gly154Glu + Glu156Asp + Phe189Pro
 Asn 61Glu + Ser159Glu + Gln206Ser + Pro210Glu + Ala216Glu
 Gly 97Asp + Ser101Asp + Ala133Glu + Gln206Glu + Gly219Pro
 Leu126Ala + Gly131Glu + Ser204Glu + Pro210Asp + Lys213Glu
 Val 95Glu + Ala 98Asn + Gly102Glu + Ser162Asp + Ser204Glu
 Asn 61Glu + Gly100Asn + Pro129Asp + Ser163Glu + Asn218Ser
 Gly102Asp + Gly127Ser + Thr158Asp + Gly160Glu + Lys213Glu
 Ser130Asp + Asn155Gln + Thr158Glu + Ser191Asp + Gly215Glu
 Ala133Asp + Ser159Glu + Ser161Asp + Ser204Asp + Ala216Gln
 Ser132Glu + Thr164Asp + Ser204Asp + Gln206Glu + Tyr217Pro
 Gly157Glu + Tyr167Asp + Ser204Glu + Gln206Glu + Ala216Asn
 Thr 66Ser + Ser130Glu + Thr158Glu + Ser204Glu + Gln206Glu
 Asp 99Glu + Ser159Glu + Ser204Glu + Gln206Glu + Tyr217Pro
 Thr 66Ser + Ser105Asp + Ser159Glu + Ser204Glu + Gln206Asp
 Asp 60Glu + Gly127Asp + Ser204Glu + Gln206Glu + Tyr214Asn
 Ser 63Glu + Ser130Asp + Gln206Asp + Ala216Gly + Asn218Asp
 Pro129Gly + Ser159Glu + Ser188Glu + Phe189Cys + Ser204Asp
 Gly131Asp + Glu156Asp + Ser162Glu + Ala187Pro + Tyr214Gly
 Gly102Asp + Trp106Glu + Ser159Glu + Pro210Gln + Thr220Asp
 Gly131Asp + Ser161Asp + Ser163Asp + Gly166Asn + Ser204Asp
 Gln 59Asn + Ser188Asp + Gln206Asp + Gly211Glu + Tyr217Glu
 Ala 98Glu + Gly157Asp + Thr164Asp + Phe189Thr + Lys213Asp
 Gln103Asp + Trp106Tyr + Gly160Asp + Lys213Glu + Gly215Asp
 Val 95Asp + Gly131Gln + Ser159Asp + Ala216Asp + Asn218Asp
 Ser101Asp + Gln103Glu + Ser161Glu + Gln206Glu + Ala216His
 Thr 66Glu + Gly128Pro + Gly154Asp + Thr164Asp + Ser204Glu
 Val 95Asp + Gly131Glu + Ser163Asp + Ser191Glu + Gln206Asn
 Val 95Ser + Ala 98Glu + Ser101Asp + Gly131Asp + Phe189Asp
 Asn 62Asp + Leu126His + Gly131Pro + Lys213Glu + Tyr217Asp
 Ser 63Asp + Ser130Glu + Thr158Pro + Ala216Glu + Tyr217Ile
 Gln 59Asp + Gly157Asp + Gln206Glu + Tyr214Val + Asn218Asp
 Val 95Glu + Asp 99Glu + Gly215Asp + Ala216Asn + Tyr217Ile
 Ser132Glu + Gly154Gln + Gly157Glu + Ser161Asp + Tyr214Ser
 Ser101Asp + Gly131Pro + Ser188Asp + Ser191Glu + Gln206Glu
 Thr 66Asp + Leu 96Glu + Glu156Asp + Val203His + Gly215Asp
 Asn 62Glu + Gly166Gln + Ser188Glu + Gly211Glu + Ala216His
 Ile107Asp + Ala187Asp + Ser191Asp + Gln206Asp + Ala216Thr
 Ser105Asp + Ser159Glu + Ser191Asp + Lys213Asp + Ala216Thr
 Asn155Asp + Ser163Asp + Val165Asn + Gln206Ser + Lys213Glu
 Ser101Glu + Gly131Asn + Asn155Glu + Ala187Glu + Lys213Asp
 Gln 59Glu + Gly160Asp + Ser188Asp + Val203Glu + Tyr217Ile

Ala133Asp + Ser161Glu + Thr164Asp + Ser204Asp + Asn218Ser
 Gln103Glu + Tyr104Cys + Ser161Glu + Thr164Asp + Lys213Glu
 Ser 63Glu + Gly160Asp + Tyr167Met + Lys213Asp + Asn218Asp
 Ser101Glu + Leu126Glu + Ser188Glu + Lys213Asp + Ala216Asn
 Asp 60Glu + Leu 96Glu + Gly128Asn + Ser130Glu + Gln206Glu
 Gln103Ser + Ser130Asp + Ala133Gly + Gln206Glu + Gly219Asp
 Gly102Asn + Ser162Asp + Gln206Asp + Tyr217Gly + Gly219Asp
 Thr 66Gln + Asp 99Glu + Gln103Glu + Val203Ser + Tyr217Asp
 Asp 99Glu + Gln103Asp + Gly157Asn + Lys213Asp + Ala216Gln
 Thr 66Asp + Pro129Asp + Ser159Glu + Lys213Asp + Tyr217His
 Ser 63Asp + Gly 97Asp + Tyr167Ala + Ser188Asp + Ser204Glu
 Gly102Pro + Tyr104Ala + Glu156Asp + Tyr167Glu + Ser204Glu
 Gln 59Glu + Asn 62Gln + Gln103Glu + Gly131Glu + Phe189Leu
 Asp 60Glu + Ser162Glu + Ala200Gln + Val203Glu + Gly211Asp
 Asp 60Glu + Ile107Glu + Gly157Asp + Gly160Glu + Phe189Ser
 Ser101Asp + Gly102Ser + Tyr104Glu + Phe189Asp + Lys213Glu
 Ser101Asp + Ser105Asp + Val203Asp + Ala216His + Tyr217His
 Ser132Asp + Asn155Glu + Gly211Pro + Lys213Glu + Asn218Asp
 Gln103Asp + Gly128Asp + Ser163Asp + Ala187Glu + Tyr217Ile
 Leu 96Ile + Gly128Asp + Ser191Glu + Gly202Asn + Gln206Glu
 Thr 66Glu + Gln103Asp + Ser204Glu + Lys213Asp + Gly219Ser
 Ala 98Asp + Ser132Asp + Gly166Glu + Pro210Asp + Tyr214Gln
 Ser 63Glu + Pro129Glu + Val203Met + Lys213Glu + Gly219Asp
 Gln 59Glu + Gly 97Asp + Gly128Asp + Ser159Glu + Ala216Ser
 Ser 63Glu + Gln103Glu + Ile107Ser + Glu156Asp + Lys213Asp
 Gly102Asp + Gly157Asn + Ser162Glu + Ser191Glu + Ser204Glu
 Ser105Asp + Ser162Asp + Ser191Asp + Pro210Gly + Gly211Glu
 Asp 60Glu + Val 95Glu + Trp106Gly + Pro129Glu + Ser159Asp
 Ser101Glu + Trp106Asp + Thr164Glu + Ser204Asp + Pro210Ser
 Gln 59Glu + Gly100Gln + Gly157Asp + Gly211Asp + Tyr217Glu
 Gly 97Asp + Ser130Asp + Gln206Asp + Lys213Asp + Ala216Asn
 Tyr104Asp + Gly154Asp + Gly160Asn + Ser163Asp + Ser204Glu
 Ser132Glu + Gly154Glu + Ser163Glu + Pro210Gly + Asn212Asp
 Leu 96Thr + Ala133Glu + Asn155Glu + Lys213Asp + Ala216Asp
 Asp 60Glu + Asp 99Glu + Leu126Gly + Ser130Asp + Ser162Glu

Příklady 7-12

Tekuté čisticí prostředky na pevné povrchy

Složka	Příklad č.					
	7	8	9	10	11	12
Ser105Glu	0,05	0,50	0,02	0,03	0,10	0,03
Gly127Gln+Ala216Pro	-	-	-	-	0,20	0,02
Na ₂ DIDA*						
EDTA**	-	-	2,90	2,90	-	-
citrát sodný	-	-	-	-	2,90	2,90
NaC ₁₂ alkylbenzen sulfonát	1,95	-	1,95	-	1,95	-
NaC ₁₂ alkylsulfát	-	2,20	-	2,20	-	2,20
NaC ₁₂ (ethoxy)*** sulfát	-	2,20	-	2,20	-	2,20
C ₁₂ dimethylamin oxid	-	0,50	-	0,50	-	0,50
Na kumensulfonát	1,30	-	1,30	-	1,30	-
hexyl karbitol****	6,30	6,30	6,30	6,30	6,30	6,30
voda*****	k vyrovnání do 100%					

*N-dietylglykol-N,N-iminodiacetát dvojsodný

**Na₄ etylendiamin dioctová kyselina

***dietylglykol monohexyl éter

****pH všech látek upraveno na 7

V příkladech 7-10 je Ser105Glu, mezi jiným, nahrazen variantami BPN' vyjmenovanými v tabulkách 2-25, v podstatě se stejnými výsledky.

V příkladech 11-12 jsou Gly127Gln + Ala216Pro, mezi jiným, nahrazeny kteroukoli kombinací variant BPN' vyjmenovaných v tabulkách 2-25, v podstatě se stejnými výsledky.

Příklady 13-18

Sprejové prostředky pro čištění pevných povrchů
a odstraňování domácích plesnivých skvrn

Složka	Příklad č.					
	13	14	15	16	17	18
Tyr104Ile+Gly215Pro	0,50	0,05	0,60	0,30	0,20	0,30
Asp99Glu	-	-	-	-	0,30	0,10
octylsulfát sodný	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
dodecylsulfát sodný	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
hydroxid sodný	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80
silikát (Na)	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
parfém	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
voda	k vyrovnání do 100%					

pH produktu je 7.

V příkladech 13-16 jsou Tyr104Ile + Gly215Pro, mezi jiným, nahrazeny variantami BPN' vyjmenovanými v tabulkách 2-25, v podstatě se stejnými výsledky.

V příkladech 17-18 jsou Tyr104Ile + Gly215Pro a Asp99Glu, mezi jiným, nahrazeny kteroukoli kombinací variant BPN' vyjmenovaných v tabulkách 2-25, v podstatě se stejnými výsledky.

Příklady 19-24

Prostředky do myček na nádobí

Složka	Příklad č.					
	19	20	21	22	23	24
Gln59Ser+Leu96Gly						
+Ser204Glu	0,05	0,50	0,02	0,40	0,10	0,03
Lys96Gly+Ser204Glu	-	-	-	-	0,40	0,02
C ₁₂ -C ₁₄ N-metyl						
glukamid	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90
C ₁₂ etoxy(1)sulfát	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00
kyselina 2-metyl						
undekanová	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50
C ₁₂ etoxy(2)karboxylát	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50
C ₁₂ alkoholetoxylát(4)	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
C ₁₂ aminoxid	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Na kumensulfonát	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
etanol	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Mg ⁺⁺ (jako MgCl ₂)	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Ca ⁺⁺ (jako CaCl ₂)	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
voda	k vyrovnání do 100%					

pH produktu je upraveno na 7.

V příkladech 19-22 jsou Gln59Ser + Leu96Gly + Ser204Glu, mezi jiným, nahrazeny variantami BPN' vyjmenovanými v tabulkách 2-25, v podstatě se stejnými výsledky.

V příkladech 23-24 jsou Gln59Ser + Leu96Gly + Ser204Glu a Lys96Gly + Ser204Glu, mezi jiným, nahrazeny kteroukoli kombinací variant BPN' vyjmenovaných v tabulkách 2-25, v podstatě se stejnými výsledky.

Příklady 25-28

Práškový prací prostředek

Složka	Příklad č.			
	25	26	27	28
Ser101Asp	0,10	0,20	0,03	0,05
Thr66Glu	-	-	0,02	0,05
C ₁₃ lineární alkylbenzen				
sulfonát	22,00	22,00	22,00	22,00
fosfát (natrium				
tripolyfosfáty)	23,00	23,00	23,00	23,00
uhličitan sodný	23,00	23,00	23,00	23,00
křemičitan sodný	14,00	14,00	14,00	14,00
zeolit	8,20	8,20	8,20	8,20
chelát (kyselina dietylen-				
triaminpentaoctová)	0,40	0,40	0,40	0,40
síran sodný	5,50	5,50	5,50	5,50
voda	k vyrovnání do 100%			

V příkladech 25-26 je Ser101Asp, mezi jiným, nahrazen variantami BPN' vyjmenovanými v tabulkách 2-25, v podstatě se stejnými výsledky.

V příkladech 27-28 jsou Ser101Asp a Thr66Glu, mezi jiným, nahrazeny kteroukoli kombinací variant BPN' vyjmenovaných v tabulkách 2-25, v podstatě se stejnými výsledky.

Příklady 29-32

Práškový prací prostředek

Složka	Příklad č.			
	29	30	31	32
Val95Asp+Leu126Ser+Asn155Gln	0,10	0,20	0,03	0,05
Gly65Ser+Gly102Asn+Val203Glu	-	-	0,02	0,05
C ₁₂ alkylbenzen sulfonát	12,00	12,00	12,00	12,00
zeolit A (1-10 mikrometr)	26,00	26,00	26,00	26,00
kyselina 2-butylkaprylová	4,00	4,00	4,00	4,00
C ₁₂ -C ₁₄ sekundární (2,3) alkyl sulfát, sodná sůl	5,00	5,00	5,00	5,00
citrát sodný	5,00	5,00	5,00	5,00
optický zjasňovač	0,10	0,10	0,10	0,10
síran sodný	17,00	17,00	17,00	17,00
voda a menšinové složky	k vyrovnání do 100%			

V příkladech 29-30 jsou Val95Asp + Leu126Ser + Asn155Gln, mezi jiným, nahrazeny variantami BPN' vyjmenovanými v tabulkách 2-25, v podstatě se stejnými výsledky.

V příkladech 31-32 jsou Val95Asp + Leu126Ser + Asn155Gln a Gly65Ser + Gly102Asn + Val203Glu, mezi jiným, nahrazeny kteroukoli kombinací variant BPN' vyjmenovaných v tabulkách 2-25, v podstatě se stejnými výsledky.

Příklady 33-36

Práškový prací prostředek

Složka	Příklad č.			
	33	34	35	36
Ser63Glu	0,10	0,20	0,03	0,05
Leu96Asn+Lys213Asp	-	-	0,02	0,05
C ₁₃ lineární alkylbenzen				
sulfonát	22,00	22,00	22,00	22,00
fosfát (natrium				
tripolyfosfáty)	23,00	23,00	23,00	23,00
uhličitan sodný	23,00	23,00	23,00	23,00
křemičitan sodný	14,00	14,00	14,00	14,00
zeolit	8,20	8,20	8,20	8,20
chelát (kyselina dietylen-				
triaminpentaoctová)	0,40	0,40	0,40	0,40
síran sodný	5,50	5,50	5,50	5,50
voda	k vyrovnání do 100%			

V příkladech 33-34 je Ser63Glu, mezi jiným, nahrazen variantami BPN' vyjmenovanými v tabulkách 2-25, v podstatě se stejnými výsledky.

V příkladech 35-36 jsou Ser63Glu a Leu96Asn + Lys213Asp, mezi jiným, nahrazeny kteroukoli kombinací variant BPN' vyjmenovaných v tabulkách 2-25, v podstatě se stejnými výsledky.

Příklady 37-40

Práškový prací prostředek

Složka	Příklad č.			
	37	38	39	40
Asn62Ser+Ser163Asp+Phe189Ser				
+Ala216Glu	0,10	0,20	0,03	0,05
Gly97Ser+Trp106Ile+Tyr217Leu	-	-	0,02	0,05
C ₁₂ alkylbenzen sulfonát	12,00	12,00	12,00	12,00
zeolit A (1-10 mikrometr)	26,00	26,00	26,00	26,00
kyselina 2-butylnaprylová	4,00	4,00	4,00	4,00
C ₁₂ -C ₁₄ sekundární (2,3) alkyl				
sulfát, sodná sůl	5,00	5,00	5,00	5,00
citrát sodný	5,00	5,00	5,00	5,00
optický zjasňovač	0,10	0,10	0,10	0,10
síran sodný	17,00	17,00	17,00	17,00
voda a menšinové složky	k vyrovnání do 100%			

V příkladech 37-38 jsou Asn62Ser + Ser163Asp + Phe189Ser + Ala216Glu, mezi jiným, nahrazeny variantami BPN' vyjmenovanými v tabulkách 2-25, v podstatě se stejnými výsledky.

V příkladech 39-40 jsou Asn62Ser + Ser163Asp + Phe189Ser + Ala216Glu a Gly97Ser + Trp106Ile + Tyr217Leu, mezi jiným, nahrazeny kteroukoli kombinací variant BPN' vyjmenovaných v tabulkách 2-25, v podstatě se stejnými výsledky.

Příklady 41-42

Práškový prací prostředek

Složka	Příklad č.	
	41	42
lineární alkylbenzen sulfonát	11,40	10,70
lojovitý alkyl sulfát	1,80	2,40
C ₁₄₋₁₅ alkyl sulfát	3,00	3,10
C ₁₄₋₁₅ alkohol 7x ethoxylovaný	4,00	4,00
lojovitý alkohol 11x ethoxylovaný	1,80	1,80
dispergovadlo	0,07	0,10
silikonová kapalina	0,80	0,80
citrát trojsodný	14,00	15,00
kyselina citrónová	3,00	2,50
zeolit	32,50	32,10
kopolymer kyselin maleinové a akrylové	5,00	5,00
kyselina dietylentriaminpenta- metylenfosfonová	1,00	0,20
Ala98Asp+Ala187Ser	0,30	0,30
lipáza	0,36	0,40
amyláza	0,30	0,30
křemičitan sodný	2,00	2,50
síran sodný	3,50	5,20
polyvinylpyrolidon	0,30	0,50
perborát	0,50	1,00
fenol sulfonát	0,10	0,20
peroxidáza	0,10	0,10
menšinové složky	do 100	do 100

Příklady 43-44

Práškový prací prostředek

Složka	Příklad č.	
	43	44
lineární C ₁₂ alkylbenzen		
sulfonát sodný	6,5	8,0
síran sodný	15,0	18,0
zeolit A	26,0	22,0
sodium nitrilotriacetát	5,0	5,0
polyvinylpyrolidon	0,5	0,7
tetraacetyletyldiamin	3,0	3,0
kyselina boritá	4,0	-
perborát	0,5	1,0
fenol sulfonát	0,1	0,2
Gln59Ser+Asn62Ser+Leu96Gly		
+Ser204Gln	0,4	0,4
plnidla (např. silikáty, karbonáty, parfémy, voda)	do 100	do 100

Příklad 45

Kompaktní zrnitý prací prostředek

Složka	váhové %
alkyl sulfát	8,0
alkyl ethoxysulfát	2,0
směs alkoholů C ₂₅ a C ₄₅ 3 a 7x	
ethoxylovaných	6,0
amid polyhydroxymastné kyseliny	2,5
zeolit	17,0
vrstvený silikát/citrát	16,0

uhličitan	7,0
kopolymer kyselin maleinové a akrylové	5,0
polymer uvolňující nečistoty	0,4
karboxymetyl celulóza	0,4
poly(4-vinylpyridin)-N-oxid	0,1
kopolymer vinylimidazolu a vinylpyrolidonu	0,1
PEG2000	0,2
Val95Gln+Tyr104Glu+Gly127Gln+Lys213Glu +Ala216Asp	0,5
lipáza	0,2
celuláza	0,2
tetraacetyletylendiamin	6,0
perkarbonát	22,0
kyselina etylendiamindijantarová	0,3
potlačovač pění	3,5
4,4'-bis(2-morfolin-4-anilin-s-triazin -6-ylamino)stilben-2,2'-disulfonát dvojsodný	0,25
4,4'-bis(2-sulfostyryl)bifenyl dvojsodný	0,05
voda, parfém a menšinové složky	do 100

Příklad 46

Práškový prací prostředek

Složka	váhové %
lineární alkylbenzen sulfonát	7,6
C ₁₆ -18 alkyl sulfát	1,3
C ₁₄ -15 alkohol 7x ethoxylovaný	4,0
koko-alkyl-dimetyl hydroxyetyl amonium chlorid	1,4
dispergovadlo	0,07
silikonová kapalina	0,8

citrát trojsodný	5,0
zeolit 4A	15,0
kopolymer kyselin maleinové a akrylové	4,0
kyselina dietylentriaminpenta- metylenfosfonová	0,4
perborát	15,0
tetraacetyletylendiamin	5,0
smektit (valchářská hlína)	10,0
poly(oxy etylen)(m.v. 300 000)	0,3
Ser63Glu+Thr104Asn+Gln206Ser+Tyr217Thr	0,4
lipáza	0,2
amyláza	0,3
celulóza	0,2
křemičitan sodný	3,0
uhličitan sodný	10,0
karboxymetyl celulóza	0,2
zjasňovače	0,2
voda, parfém a menšinové složky	do 100

Příklad 47

Práškový prací prostředek

Složka	váhové %
lineární alkylbenzen sulfonát	6,92
lojovitý alkyl sulfát	2,05
C ₁₄₋₁₅ alkohol 7x ethoxylovaný	4,4
C ₁₂₋₁₅ alkyl ethoxy sulfát - 3x ethoxylovaný	0,16
zeolit	20,2
citrát	5,5
uhličitan	15,4
křemičitan	3,0
kopolymer kyselin maleinové a	

akrylové	4,0
karboxymetyl celulóza	0,31
polymer uvolňující nečistoty	0,30
Asn62Ser+Trp106Gly+Ser132Asp+Ala187Ser +Phe189Ser	0,2
lipáza	0,36
celuláza	0,13
perborát tetrahydrát	11,64
perborát monohydrát	8,7
tetraacetyletylendiamin	5,0
kyselina dietylentriaminpenta- metylenfosfonová	0,38
síran hořečnatý	0,40
zjasňovač	0,19
parfém, silikon, potlačovače pění	0,85
menšinové složky	do 100

Příklady 48-52

Tekuté prací prostředky

Složka	Příklad č.				
	48	49	50	51	52
Ser161Glu+Gly219Asn	0,05	0,03	0,30	0,03	0,10
Asn62Ser+Ile107Ala+Glu206Asp +Tyr217Thr	-	-	-	0,01	0,20
C ₁₂ -C ₁₄ alkyl sulfát sodný	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
kyselina 2-butylnaprylová	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
citrát sodný	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
C ₁₀ alkohol ethoxylát (3)	13,00	13,00	13,00	13,00	13,00
monetanolamin	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
voda/propylenglykol/ etanol (100:1:1)	k vyrovnání do 100%				

V příkladech 48-50 jsou Ser161Glu + Gly219Asn, mezi jiným, nahrazeny variantami BPN' vyjmenovanými v tabulkách 2-25, v podstatě se stejnými výsledky.

V příkladech 51-52 jsou Ser161Glu + Gly219Asn a Asn62Ser + Ile107Ala + Glu206Asp + Tyr217Thr, mezi jiným, nahrazeny kteroukoli kombinací variant BPN' vyjmenovaných v tabulkách 2-25, v podstatě se stejnými výsledky.

Příklady 53-57

Tekuté prací prostředky

Složka	Příklad č.				
	53	54	55	56	57
Ser101Asp+Ile107Ala					
+Gly202Ser	0,05	0,03	0,30	0,03	0,10
Val95Thr+Thr208Gly	-	-	-	0,01	0,20
C ₁₂ -C ₁₄ alkyl sulfát sodný	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
kyselina 2-butylnaprylová	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
citrát sodný	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
C ₁₀ alkohol ethoxylát (3)	13,00	13,00	13,00	13,00	13,00
monoetanolamin	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
voda/propylenglykol/ etanol (100:1:1)					
	k vyrovnání do 100%				

V příkladech 53-55 jsou Ser101Asp + Ile107Ala + Gly202Ser, mezi jiným, nahrazeny variantami BPN' vyjmenovanými v tabulkách 2-25, v podstatě se stejnými výsledky.

V příkladech 56-57 jsou Ser101Asp + Ile107Ala + Gly202Ser a Val95Thr + Thr208Gly, mezi jiným, nahrazeny

kteroukoli kombinací variant BPN' vyjmenovaných v tabulkách 2-25, v podstatě se stejnými výsledky.

Příklady 58-59

Práškový prací prostředek

Složka	Příklad č.	
	58	59
kyselina C ₁₂ -14 alkenyl jantarová	3,0	8,0
monohydrát kyseliny citrónové	10,0	15,0
natrium C ₁₂ -15 alkylsulfát	8,0	8,0
natrium sulfát C ₁₂ -15 alkoholu		
2x ethoxylovaného	-	3,0
C ₁₂ -15 alkohol 7x ethoxylovaný	-	8,0
C ₁₂ -15 alkohol 5x ethoxylovaný	8,0	-
kyselina dietylentriaminpenta-		
metylenfosfonová	0,2	-
kyselina olejová	1,8	-
etanol	4,0	4,0
propandiol	2,0	2,0
Asp60Glu+Gln206Asn	0,2	0,2
polyvinylpyrolidon	1,0	2,0
potlačovač pění	0,15	0,15
NaOH	až do pH 7,5	
perborát	0,5	1,0
fenol sulfát	0,1	0,2
peroxidáza	0,4	0,1
voda a menšinové složky	do 100 částí	

V každém příkladu 58 a 59 jsou Asp60Glu + Gln206Asn, mezi jiným, nahrazeny variantami BPN' vyjmenovanými v tabulkách 2-25, v podstatě se stejnými výsledky.

Příklady 60-62

Tekuté prací prostředky

Složka	Příklad č.		
	60	61	62
kyselina citrónová	7,10	3,00	3,00
mastná kyselina	2,00	-	2,00
etanol	1,93	3,20	3,20
kyselina boritá	2,22	3,50	3,50
monoetanolamin	0,71	1,09	1,09
1,2 propandiol	7,89	8,00	8,00
Na kumensulfonát	1,80	3,00	3,00
formitá sodný	0,08	0,08	0,08
NaOH	6,70	3,80	3,80
silikonové protipěnové činidlo	1,16	1,18	1,18
Asn61Glu	0,0145	-	-
Gly97Glu+Thr164Pro	-	0,0145	-
Asn62Glu+Thr158Ser+Gly215Ser	-	-	0,0145
lipáza	0,20	0,20	0,20
celuláza	-	7,50	7,50
polymer uvolňující nečistoty	0,29	0,15	0,15
protipěnová činidla	0,06	0,085	0,085
zjasňovač 36	0,095	-	-
zjasňovač 3	-	0,05	0,05
kyselina C ₁₂ alkylbenzensulfonová	9,86	-	-
C ₁₂ -15 alkylpolyethoxylát(2,5) sulfát	13,80	18,00	18,00
C ₁₂ glukózoamid	-	5,00	5,00
C ₁₂ -13 alkylpolyethoxylát(9)	2,00	2,00	2,00
voda, parfém a menšinové složky	k vyrovnání do 100%		

Příklady 63-66

Prací prostředky v pevné formě

Složka	Příklad č.			
	63	64	65	66
Gly97Glu+Thr164Pro	0,3	-	0,1	0,02
Ala98Ser+Gly154Asn	-	-	0,4	0,03
C ₁₂ -C ₁₆ alkylsulfát sodný	20,0	20,0	20,0	20,0
C ₁₂ -C ₁₄ N-metylglukamid	5,0	5,0	5,0	5,0
C ₁₁ -C ₁₃ alkylbenzensulfonát sodný	10,0	10,0	10,0	10,0
uhličitan sodný	25,0	25,0	25,0	25,0
natrium pyrofosfát	7,0	7,0	7,0	7,0
natrium tripolyfosfát	7,0	7,0	7,0	7,0
zeolit A (0,1-10 μ)	5,0	5,0	5,0	5,0
karboxymethylcelulóza	0,2	0,2	0,2	0,2
polyakrylát (m.h. 1400)	0,2	0,2	0,2	0,2
kokosový monoetanolamin	5,0	5,0	5,0	5,0
zjasňovač, parfém	0,2	0,2	0,2	0,2
CaSO ₄	1,0	1,0	1,0	1,0
MgSO ₄	1,0	1,0	1,0	1,0
voda	4,0	4,0	4,0	4,0
plnidlo*	k vyrovnání do 100%			

*Může být vybráno z příhodných materiálů jako jsou CaCO₃, talek, jíl, silikáty a pod.

V příkladech 63-64 jsou Gly97Glu + Thr164Pro, mezi jiným, nahrazeny variantami BPN' vyjmenovanými v tabulkách 2-25, v podstatě se stejnými výsledky.

V příkladech 65-66 jsou Gly97Glu + Thr164Pro a Ala98Ser + Gly154Asn, mezi jiným, nahrazeny kteroukoli kombinací variant BPN' vyjmenovaných v tabulkách 2-25, v podstatě se stejnými výsledky.

Příklady 67-70

Prací prostředky v pevné formě

Složka	Příklad č.			
	67	68	69	70
Val203Glu	0,3	-	0,1	0,02
Gly100Glu+Ile107Ser	-	0,3	0,4	0,03
C ₁₂ -C ₁₆ alkylsulfát, Na	20,0	20,0	20,0	20,0
C ₁₂ -C ₁₄ N-metylglukamid	5,0	5,0	5,0	5,0
C ₁₁ -C ₁₃ alkylbenzensulfonát, Na	10,0	10,0	10,0	10,0
uhličitan sodný	25,0	25,0	25,0	25,0
natrium pyrofosfát	7,0	7,0	7,0	7,0
natrium tripolyfosfát	7,0	7,0	7,0	7,0
zeolit A (0,1-10 μ)	5,0	5,0	5,0	5,0
karboxymethylcelulóza	0,2	0,2	0,2	0,2
polyakrylát (m.h. 1400)	0,2	0,2	0,2	0,2
kokosový monoetanolamin	5,0	5,0	5,0	5,0
zjasňovač, parfém	0,2	0,2	0,2	0,2
CaSO ₄	1,0	1,0	1,0	1,0
MgSO ₄	1,0	1,0	1,0	1,0
voda	4,0	4,0	4,0	4,0
plnidlo*	k vyrovnání do 100%			

*Může být vybráno z příhodných materiálů jako jsou CaCO₃, talek, jíl, silikáty a pod.

V příkladu 67 je Val203Glu, mezi jiným, nahrazen variantami BPN' vyjmenovanými v tabulkách 2-25, v podstatě se stejnými výsledky.

V příkladu 68 jsou Gly100Glu + Ile107Ser, mezi jiným, nahrazeny variantami BPN' vyjmenovanými v tabulkách 2-25, v podstatě se stejnými výsledky.

V příkladech 69-70 jsou Val203Glu a Gly100Glu +

Ile107Ser, mezi jiným, nahrazeny kteroukoli kombinací variant BPN' vyjmenovaných v tabulkách 2-25, v podstatě se stejnými výsledky.

Příklady 71-74

Prostředek na čištění zubů

Složka	Příklad č.			
	71	72	73	74
Gln59Asp+Ala98Glu+Gly102Asp				
+Ser105Glu+Leu109Thr	2,000	3,500	1,500	2,000
sorbit (70% vodný roztok)	35,000	35,000	35,000	35,000
PEG-6*	1,000	1,000	1,000	1,000
zubní křemenný brusný				
prostředek**	20,000	20,000	20,000	20,000
fluorid sodný	0,243	0,243	0,243	0,243
kysličník titaničitý	0,500	0,500	0,500	0,500
glukaran sodný	0,286	0,286	0,286	0,286
sodium alkyl sulfát (27,9%				
vodný roztok)	4,000	4,000	4,000	4,000
příchuť	1,040	1,040	1,040	1,040
polymer karboxyvinylu	0,300	0,300	0,300	0,300
Carrageenan****	0,800	0,800	0,800	0,800
voda	k vyrovnání do 100%			

*PEG-6 = polyethylenglykol mající molekulární váhu 600.

**Srážení křemen totožný se Zeodentem 119 poskytnutým J.M. Huberem.

***Carbopol poskytnutý B.F. Goodrich Chemical Company.

****Jota Carrageenan poskytnutý Hercules Chemical Company.

V příkladech 71-74 jsou Gln59Asp + Ala98Glu + Gly102Asp + Ser105Glu + Leu109Thr, mezi jiným, nahrazeny

kteroukoli kombinací variant BPN' vyjmenovaných v tabulkách 2-25, v podstatě se stejnými výsledky.

Příklady 75-78

Ústní voda

Složka	Příklad č.			
	75	76	77	78
Leu96Thr+Gly128Asp+Ala133Glu +Asn155Glu+Lys213Asp +Ala216Asp	3,00	7,50	1,00	5,00
alkohol SDA 40	8,00	8,00	8,00	8,00
příchuť	0,08	0,08	0,08	0,08
emulgátor	0,08	0,08	0,08	0,08
fluorid sodný	0,05	0,05	0,05	0,05
glycerin	10,00	10,00	10,00	10,00
sladidlo	0,02	0,02	0,02	0,02
kyselina benzoová	0,05	0,05	0,05	0,05
hydroxid sodný	0,20	0,20	0,20	0,20
barva	0,04	0,04	0,04	0,04
voda	k vyrovnání do 100%			

V příkladech 75-78 jsou Leu96Thr + Gly128Asp + Ala133Glu + Asn155Glu + Lys213Asp + Ala216Asp, mezi jiným, nahrazeny kteroukoli kombinací variant BPN' vyjmenovaných v tabulkách 2-25, v podstatě se stejnými výsledky.

Příklady 79-82

Zdravotní pastilky

Složka	Příklad č.			
	79	80	81	82
Ser132Asp+Tyr217Leu	0,01	0,03	0,10	0,02
sorbit	17,50	17,50	17,50	17,50
mannit	17,50	17,50	17,50	17,50
škrob	13,60	13,60	13,60	13,60
sladidlo	1,20	1,20	1,20	1,20
příchuť	11,70	11,70	11,70	11,70
barva	0,10	0,10	0,10	0,10
kukuřičný sirup	k vyrovnání do 100%			

V příkladech 79-82 jsou Ser132Asp + Tyr217Leu, mezi jiným, nahrazeny kteroukoli kombinací variant BPN' vyjmenovaných v tabulkách 2-25. v podstatě se stejnými výsledky.

Příklady 83-86

Žvýkáci guma

Složka	Příklad č.			
	83	84	85	86
Thr66Pro+Gln103Asn+Lys213Asp	0,03	0,02	0,10	0,05
krystaly sorbitu	38,44	38,40	38,40	38,40
gumová báze Pajola-T*	20,00	20,00	20,00	20,00
sorbit (70% vodný roztok)	22,00	22,00	22,00	22,00
mannit	10,00	10,00	10,00	10,00
glycerin	7,56	7,56	7,56	7,56
příchuť	1,00	1,00	1,00	1,00

*Dodáno L.A. Dreyfus Company.

V příkladech 83-86 jsou Thr66Pro + Gln103Asn + Lys213Asp, mezi jiným, nahrazeny kteroukoli kombinací variant BPN' vyjmenovaných v tabulkách 2-25, v podstatě se stejnými výsledky.

Příklady 87-90

Dvouvrstevná šumivá čisticí tableta na umělý chrup

Složka	Příklad č.			
	87	88	89	90
<u>Kyselá vrstva</u>				
Gln59Glu+Ser63Glu+Val95Met				
+Gly97Pro+Tyr217Ala	1,00	1,50	0,01	0,05
kyselina vinná	24,00	24,00	24,00	24,00
uhličitan sodný	4,00	4,00	4,00	4,00
kyselina sulfaminová	10,00	10,00	10,00	10,00
PEG 20 000	4,00	4,00	4,00	4,00
natrium bikarbonát	24,50	24,50	24,50	24,50
kalium persulfát	15,00	15,00	15,00	15,00
kyselý pyrofosfát sodný	7,00	7,00	7,00	7,00
pyrogenní křemen	2,00	2,00	2,00	2,00
TAED*	7,00	7,00	7,00	7,00
ricinoleylsulfosukcinát	0,50	0,50	0,50	0,50
příchuť	1,00	1,00	1,00	1,00
<u>Zásaditá vrstva</u>				
natrium perborát monohydrát	32,00	32,00	32,00	32,00
natrium bikarbonát	19,00	19,00	19,00	19,00
EDTA	3,00	3,00	3,00	3,00
natrium tripolyfosfát	12,00	12,00	12,00	12,00
PEG 20 000	2,00	2,00	2,00	2,00
kalium persulfát	26,00	26,00	26,00	26,00

uhličitan sodný	2,00	2,00	2,00	2,00
pyrogenní křemen	2,00	2,00	2,00	2,00
barva/příchuť	2,00	2,00	2,00	2,00

*tetraacetylen diamin

V příkladech 87-90 jsou Gln59Glu + Ser63Glu + Val95Met + Gly97Pro + Tyr217Ala, mezi jiným, nahrazeny kteroukoli kombinací variant BPN' vyjmenovaných v tabulkách 2-25, v podstatě se stejnými výsledky.

Příklady 91-94

Enzymatický čisticí prostředek na kontaktní čočky

Složka	Příklad č.			
	91	92	93	94
Ser191Glu+Gly219Ser	0,01	0,50	0,10	2,00
glukóza	50,00	50,00	50,00	50,00
neionogenní surfaktant (kopolymer polyoxyetylenpolyoxypropylen)	2,00	2,00	2,00	2,00
aniontový surfaktant (sodný ester kys. sírové polyoxyetylenalkylfenyletheru)	1,00	1,00	1,00	1,00
chlorid sodný	1,00	1,00	1,00	1,00
borax	0,30	0,30	0,30	0,30
voda	k vyrovnání do 100%			

V příkladech 91-94 jsou Ser191Glu + Gly219Ser, mezi jiným, nahrazeny kteroukoli kombinací variant BPN' vyjmenovaných v tabulkách 2-25, v podstatě se stejnými výsledky.

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

SEZNAM SEKVENCÍ

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI IDENTIFIKAČNÍHO ČÍSLA 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 275 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE IDENTIFIKAČNÍHO ČÍSLA 1:

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

Průmyslová využitelnost

Předkládaný vynález poskytuje varianty enzymu subtilisinu, které mají ve srovnání s divokým typem enzymu sníženou adsorpci a zvýšeně hydrolyzují. Dále vynález poskytuje čisticí prostředky, které obsahují účinné množství jedné nebo více variant enzymu subtilisinu a lze je použít k čištění různých druhů povrchů při potřebě odstranit nečistoty bílkovinné povahy. Tyto čisticí prostředky zahrnují detergentní prostředky na čištění pevných povrchů, prací prostředky, prostředky do myček na nádobí, prostředky na čištění ústní dutiny, prostředky na čištění umělého chrupu a prostředky na čištění kontaktních čoček.

PATENTSERVIS

Praha a.s.

-8-

P A T E N T O V É N Á R O K

3216-96

č.j.	006277
došlo	24.1.97
URAD PRŮMYSLového VLASTNICTVÍ	PŘÍL.

1. Varianta BPN' v y z n a č u j í c í s e t í m, že má změněnou sekvenci aminokyselin proti aminokyselinové sekvenci divokého typu, aminokyselinová sekvence divokého typu zahrnuje oblast první smyčky, oblast druhé smyčky, oblast třetí smyčky, oblast čtvrté smyčky a oblast páté smyčky, charakterizovanou tím, že změněná sekvence aminokyselin obsahuje substituci v jedné nebo více polohách v jedné nebo více oblastech smyček, kde

A. když substituce nastane v oblasti první smyčky, substituce nastane v jedné nebo více z poloh 59, 60, 61, 62, 63, 65 nebo 66, kde

a. když substituce nastane v poloze 59, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Glu nebo Ser,

b. když substituce nastane v poloze 60, substituující aminokyselina je Glu,

c. když substituce nastane v poloze 61, substituující aminokyselina je Asp, Gln, Glu nebo Ser,

d. když substituce nastane v poloze 62, substituující aminokyselina je Asp, Gln, Glu nebo Ser,

e. když substituce nastane v poloze 63, substituující aminokyselina je Asp nebo Glu,

f. když substituce nastane v poloze 65, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Pro nebo Ser a

g. když substituce nastane v poloze 66, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Pro nebo Ser,

B. když substituce nastane v oblasti druhé smyčky,

substituce nastane v jedné nebo více z poloh 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106 nebo 107, kde

- a. když substituce nastane v poloze 95, substituující aminokyselina je Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Met, Pro, Ser nebo Thr,
- b. když substituce nastane v poloze 96, substituující aminokyselina je Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Met, Pro, Ser, Thr nebo Val,
- c. když substituce nastane v poloze 97, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Pro nebo Ser,
- d. když substituce nastane v poloze 98, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Pro, Ser nebo Thr,
- e. když substituce nastane v poloze 99, substituující aminokyselina je Glu,
- f. když substituce nastane v poloze 100, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Pro nebo Ser,
- g. když substituce nastane v poloze 101, substituující aminokyselina je Asp nebo Glu,
- h. když substituce nastane v poloze 102, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Pro nebo Ser,
- i. když substituce nastane v poloze 103, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Glu nebo Ser,
- j. když substituce nastane v poloze 104, substituující aminokyselina je Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Ser, Thr nebo Val,
- k. když substituce nastane v poloze 105, substituující aminokyselina je Asp nebo Glu,

l. když substituce nastane v poloze 106, substituující aminokyselina je Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr nebo Val a

m. když substituce nastane v poloze 107, substituující aminokyselina je Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Met, Pro, Ser, Thr nebo Val,

C. když substituce nastane v oblasti třetí smyčky, substituce nastane v jedné nebo více z poloh 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132 nebo 133, kde

a. když substituce nastane v poloze 126, substituující aminokyselina je Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Met, Pro, Ser, Thr nebo Val,

b. když substituce nastane v poloze 127, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Pro nebo Ser,

c. když substituce nastane v poloze 128, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Gly nebo Ser,

d. když substituce nastane v poloze 129, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Gly nebo Ser,

e. když substituce nastane v poloze 130, substituující aminokyselina je Asp nebo Glu,

f. když substituce nastane v poloze 131, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Gly nebo Ser,

g. když substituce nastane v poloze 132, substituující aminokyselina je Asp nebo Glu a

h. když substituce nastane v poloze 133, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Pro, Ser nebo Thr,

D. když substituce nastane v oblasti čtvrté smyčky,

substituce nastane v jedné nebo více z poloh 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166 nebo 167, kde

- a. když substituce nastane v poloze 154, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Pro nebo Ser,
- b. když substituce nastane v poloze 155, substituující aminokyselina je Asp, Gln, Glu nebo Ser,
- c. když substituce nastane v poloze 156, substituující aminokyselina je Asp,
- d. když substituce nastane v poloze 157, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Pro nebo Ser,
- e. když substituce nastane v poloze 158, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Pro nebo Ser,
- f. když substituce nastane v poloze 159, substituující aminokyselina je Asp nebo Glu,
- g. když substituce nastane v poloze 160, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Pro nebo Ser,
- h. když substituce nastane v poloze 161, substituující aminokyselina je Asp nebo Glu,
- i. když substituce nastane v poloze 162, substituující aminokyselina je Asp nebo Glu,
- j. když substituce nastane v poloze 163, substituující aminokyselina je Asp nebo Glu,
- k. když substituce nastane v poloze 164, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Pro nebo Ser,
- l. když substituce nastane v poloze 165, substituující aminokyselina je Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Met, Pro, Ser nebo Thr,

m. když substituce nastane v poloze 166, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Pro nebo Ser a

n. když substituce nastane v poloze 167, substituující aminokyselina je Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Ser, Thr nebo Val a

E. když substituce nastane v oblasti páté smyčky, substituce nastane v jedné nebo více z poloh 187, 188, 189, 190 nebo 191, kde

a. když substituce nastane v poloze 187, substituující aminokyselina je Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Pro, Ser a Thr,

b. když substituce nastane v poloze 188, substituující aminokyselina je Asp nebo Glu,

c. když substituce nastane v poloze 189, substituující aminokyselina je Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Ser, Thr, Tyr nebo Val,

d. když substituce nastane v poloze 190, substituující aminokyselina je Asp nebo Glu,

e. když substituce nastane v poloze 191, substituující aminokyselina je Asp nebo Glu,

čímž má varianta BPN' sníženou adsorpci a zvýšeně hydrolyzuje nerozpustný substrát ve srovnání s divokým typem BPN' subtilisinu.

2. Varianta BPN' podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jedna nebo více substitucí nastane v oblasti první smyčky.

3. Varianta BPN'podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jedna nebo více substitucí nastane v oblasti druhé smyčky.
4. Varianta BPN'podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jedna nebo více substitucí nastane v oblasti třetí smyčky.
5. Varianta BPN'podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jedna nebo více substitucí nastane v oblasti čtvrté smyčky.
6. Varianta BPN'podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jedna nebo více substitucí nastane v oblasti páté smyčky.
7. Varianta BPN'podle kteréhokoliv z nároků 1-6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že aminokyselinová sekvence divokého typu dále obsahuje oblast šesté smyčky, charakterizovanou tím, že změněná aminokyselinová sekvence dále obsahuje jednu nebo více substitucí v oblasti šesté smyčky, kde substituce v oblasti šesté smyčky nastanou v jedné nebo více z poloh 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219 nebo 220, kde
 - a. když substituce nastane v poloze 199, substituující aminokyselina pro polohu 199 je Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

b. když substituce nastane v poloze 200, substituující aminokyselina pro polohu 200 je His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

c. když substituce nastane v poloze 201, substituující aminokyselina pro polohu 201 je Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

d. když substituce nastane v poloze 202, substituující aminokyselina pro polohu 202 je Pro, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

e. když substituce nastane v poloze 203, substituující aminokyselina pro polohu 203 je Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

f. když substituce nastane v poloze 204, substituující aminokyselina pro polohu 204 je Asp nebo Glu,

g. když substituce nastane v poloze 205, substituující aminokyselina pro polohu 205 je Leu, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

h. když substituce nastane v poloze 206, substituující aminokyselina pro polohu 206 je Pro, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

i. když substituce nastane v poloze 207, substituující aminokyselina pro polohu 207 je Asp nebo Glu,

j. když substituce nastane v poloze 208, substituující aminokyselina pro polohu 208 je Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

k. když substituce nastane v poloze 209, substituující aminokyselina pro polohu 209 je Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

l. když substituce nastane v poloze 210, substituující

aminokyselina pro polohu 210 je Ala, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

m. když substituce nastane v poloze 211, substituující aminokyselina pro polohu 211 je Ala, Pro, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

n. když substituce nastane v poloze 212, substituující aminokyselina pro polohu 212 je Gln, Ser, Asp nebo Glu,

o. když substituce nastane v poloze 213, substituující aminokyselina pro polohu 213 je Trp, Phe, Tyr, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

p. když substituce nastane v poloze 214, substituující aminokyselina pro polohu 214 je Phe, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

q. když substituce nastane v poloze 215, substituující aminokyselina pro polohu 215 je Thr, Pro, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

r. když substituce nastane v poloze 216, substituující aminokyselina pro polohu 216 je His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

s. když substituce nastane v poloze 217, substituující aminokyselina pro polohu 217 je Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

t. když substituce nastane v poloze 218, substituující aminokyselina pro polohu 218 je Gln, Ser, Asp nebo Glu,

u. když substituce nastane v poloze 219, substituující aminokyselina pro polohu 219 je Pro, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu a

v. když substituce nastane v poloze 220, substituující aminokyselina pro polohu 220 je Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

8. Čisticí prostředek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje variantu BPN' kteréhokoliv z nároků 1-7, a nosič čisticího prostředku a je vybrán ze skupiny skládající se z čisticích prostředků na pevné povrchy, prostředku do myček na nádobí, prostředku na čištění ústní dutiny, prostředku na čištění umělého chrupu, prostředku na čištění kontaktních čoček a pracího prostředku.

9. Čisticí prostředek podle nároku 8 v y z n a č u j í c í s e t í m, že čisticí prostředek je čisticí prostředek na pevné povrchy.

10. Čisticí prostředek podle nároku 8 v y z n a č u j í c í s e t í m, že čisticí prostředek je prací prostředek.

11. Mutovaný gen BPN' v y z n a č u j í c í s e t í m, že kóduje variantu BPN' dle kteréhokoliv z nároků 1-7.

PATENTSERVIS
Praha