



등록특허 10-2553627



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년07월07일
(11) 등록번호 10-2553627
(24) 등록일자 2023년07월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/54 (2006.01) *A23K 20/189* (2016.01)
C11D 3/386 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 9/54 (2013.01)
A23K 20/189 (2016.05)
- (21) 출원번호 10-2019-7020123
- (22) 출원일자(국제) 2017년12월22일
심사청구일자 2020년12월11일
- (85) 번역문제출일자 2019년07월11일
- (65) 공개번호 10-2019-0095361
- (43) 공개일자 2019년08월14일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2017/084452
- (87) 국제공개번호 WO 2018/115473
국제공개일자 2018년06월28일
- (30) 우선권주장
16206367.1 2016년12월22일
유럽특허청(EPO)(EP)

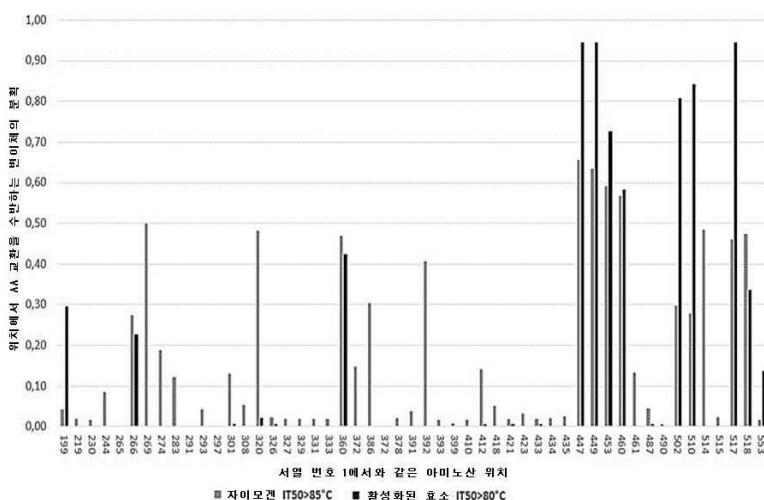
- (73) 특허권자
에베 누트리찌온 게엠베하
독일 비스백 (우편번호 49429) 호겐뵈겐1
- (72) 발명자
미헬스, 안드레아스
독일 40237 뒤셀도르프 린데만 스트라쎄 110
샤이디그, 안드레아스
독일 26810 베스토빌레딩겐 아이드너 스트라쎄 16
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
인비전 특허법인

전체 청구항 수 : 총 19 항

심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 **안정한 프로테아제 변이체****(57) 요약**

서열 번호: 1 내지 3 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 쿠마몰리신 AS 골격의 완전한 길이의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일하면서, 단백질분해 활성을 유지하는 프로테아제 변이체, 또는 단백질분해 활성을 유지하는 이의 단편, 분획 또는 셔플드 변이체에 관한 것이며, 이러한 프로테아제 변이체는 서열 번호: 4에 제시된 바와 같은 쿠마몰리신 AS 야생형, 또는 서열 번호: 1 내지 3 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 쿠마몰리신 AS 골격과 비교하여 변경되거나 개선된 안정성을 입증한다.

대 표 도

(52) CPC특허분류

C11D 3/386 (2022.08)

C12Y 304/21 (2013.01)

(72) 발명자

이렌드, 크리스티안

독일 50829 켈른 인젠크로퍼 베그 73

크랍, 클라우디아

독일 50677 켈른 로트링거 스트라쎄 25

흔, 토마스

독일 52068 아헨 라이쉬 베그 66

명세서

청구범위

청구항 1

프로테아제 변이체에 있어서,

서열번호: 1과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하며,

상기 프로테아제 변이체는 하나 이상의 아미노산 치환을 가지며, 여기서 적어도 하나의 아미노산 치환은 서열번호: 1의 잔기 위치 A517이며,

상기 아미노산 치환은 A517T 및 A517S 중 하나이며,

상기 프로테아제 변이체는 야생형 쿠마몰리신 AS(Kumamolisin *Alicyclobacillus sendaiensis*)에 비교하여 증가된 열안정성을 가지는 프로테아제 변이체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 프로테아제 변이체는 (iii) 서열번호: 4에 제시된 바와 같은 쿠마몰리신 AS 야생형 또는 iv) 서열번호: 1 내지 3 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 쿠마몰리신 AS 골격과 비교하여 개선된 안정성을 나타내는 프로테아제 변이체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 프로테아제 변이체는 서열번호: 1의 잔기 위치 D447 또는 A449에 적어도 하나의 아미노산 치환을 더 가지는 프로테아제 변이체.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 프로테아제 변이체는 서열번호: 1에 제시된 바와 같은 쿠마몰리신 AS 골격과 비교하여 적어도 두개의 아미노산 치환을 가지는 프로테아제 변이체.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 프로테아제 변이체는 D447S, A449Y, A517T, N510H, E360L, E360V, E360C, V502C, E453W, A514T, A514Y, A514D, A514S, A460W, A386I로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개 또는 적어도 6개의 추가의 아미노산 치환을 가지는 프로테아제 변이체.

청구항 6

제1항에 있어서,

프로테아제 변이체가 서열 번호: 1에 제시된 바와 같은 쿠마몰리신 AS 골격내 선택된 잔기에서 치환의 세트를 갖는 프로테아제 변이체로서, 이러한 세트가 다음인 프로테아제 변이체:

- a) D447S, A449Y, E453W 및 A517T, 또는
- b) D447S, A449Y, E453W 및 A517S

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 개선된 안정성이 활성화된 효소 또는 자이모젠 중 어느 하나의 개선된 열안정성 IT50인

프로테아제 변이체.

청구항 8

제7항에 있어서, 프로테아제 변이체가 $\geq 75^{\circ}\text{C}$ 내지 $\leq 105^{\circ}\text{C}$ 의 IT50을 갖는 프로테아제 변이체.

청구항 9

제1항에 따른 프로테아제를 암호화하는 핵산 분자.

청구항 10

제9항에 따른 핵산 분자를 포함하는 플라스미드 또는 벡터 시스템.

청구항 11

제1항에 따른 프로테아제 변이체 또는 프로테아제를 포함하는 조성물로서, 이러한 조성물이 ≥ 5 의 pH를 갖는 조성물.

청구항 12

제1항에 따른 프로테아제 변이체 또는 프로테아제를 포함하는 사료 첨가물.

청구항 13

제1항에 따른 프로테아제 변이체 또는 프로테아제를 포함하는 사료 성분.

청구항 14

제1항에 따른 프로테아제 변이체 또는 프로테아제를 포함하는 사료 보충물.

청구항 15

제1항에 따른 프로테아제 변이체 또는 프로테아제를 포함하는 가축 사료.

청구항 16

가축 사료의 제조에 사용되는 제1항에 따른 프로테아제 변이체.

청구항 17

제1항에 따른 프로테아제 변이체의 제조 방법으로서:

- i) 서열 번호: 1 내지 4 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 쿠마몰리신 AS 아미노산 서열을 암호화하는 DNA, cDNA 또는 mRNA를 돌연변이유발시키는 단계,
- ii) 이렇게 수득된 쿠마몰리신 AS의 하나 이상의 돌연변이체를 발현시키는 단계, 및
- iii) 열안정성에 대해 쿠마몰리신 AS의 하나 이상의 돌연변이체를 시험하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 18

제1항에 있어서,

N510, V502, E453, E360, A514 및 A460로 이루어진 그룹에서 선택되는 서열번호: 1 내의 하나 이상의 잔기 위치에서의 하나 이상의 아미노산 치환을 더 포함하는 프로테아제 변이체.

청구항 19

제1항 및 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

A449, A517, N510, V502, E453, E360, A514 및 A460에서의 하나 이상의 치환은 서열번호: 1에 개시된 바와 같은 상기 쿠마몰리신 AS와 비교하여 A449Y, A517T, N510H, E360L, E360V, E360C, V502C, E453W, A514T, A514Y, A514D, A514S, A460W로 이루어진 그룹에서 선택되는 프로테아제 변이체.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

발명의 분야

[0002]

본 발명은 프로테아제의 분야에 관한 것이다.

배경 기술

[0003]

배경

[0004]

프로테아제는 오늘날 동물 사료, 세제, 과일 및 음료 가공, 가죽 가공, 단백질 가수분해물의 생산, 경질 표면 세정 또는 생물막(biofilm) 세정, 상처 치유를 촉진시키는 괴사성 또는 화상 조직의 치료 및/또는 베이킹 반죽 제조(baking dough preparation)를 포함하는 식품 제조를 포함하는, 산업적 응용의 많은 분야에 사용되고 있다.

[0005]

많은 이러한 적용에서, 효소의 개선된 안정성은 중요한 장점이다. 프로테아제는 흔히 제조 공정 동안 열 처리를 겪으므로, 개선된 열안정성은 각각의 프로테아제의 가공성을 증가시키는데 도움을 준다.

[0006]

이는 특히, 동물 사료 속의 프로테아제의 사용을 위해 적용되며 여기서 프로테아제는 사료의 소화능 및 영양소 이용을 개선시키는데 도움을 준다.

[0007]

사료 가공 동안, 사료는 흔히 열에 적용시켜서, 예컨대, 스팀(steam)을 적용하여 병원체를 감소시키거나 제거하고, 사료의 저장 수명 및 개선된 사료 전환을 이끄는 성분의 최적화된 활용을 증가시킨다. 처리 시간(conditioning time)은 사료의 유형 및 제형에 따라서 수초 내지 수분으로 변할 수 있다. 처리(conditioning) 동안의 온도는 전형적으로 70°C 내지 100°C의 범위이다. 처리 후, 사료는 때때로 펠렛화 다이(pelleting die)를 통해 압출되며, 이는 마찰에 의해 유발된 단시간 동안 열 소산(dissipation)으로 인하여 사료의 온도를 단시간에 크게 상승시킨다.

[0008]

여전히 다른 적용에서, 프로테아제 효소도 또한 열에 노출된다. 이는 세제 속에서의 용도(예컨대, 세척기 세척(laundry washing) 동안 온수에 대한 노출), 과일 및 음료 가공(압착 공정 동안 또는 저온살균 또는 멸균으로 인한 열 노출), 가죽 가공, 단백질 가수분해물의 생산, 경질 표면 세정 또는 생물막 세정, 상처 치유를 촉진시키는 괴사성 또는 화상 조직의 치료, 조직 가공(멸균화, 및 프리온 단백질의 변성)시 공정 보조 및/또는 베이킹 반죽 제조를 포함하는 식품 제조에서의 용도를 포함한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009]

프로테아제는 단백질이므로, 이들은 열 및 압력에 의한 변성에 대해 민감할 수 있다. 변성은 효소의 구조를 필연적으로 변경시켜서, 감소된 활성 수준 및 감소된 효소의 효능을 야기한다.

[0010]

열 충격으로부터 프로테아제 안정성을 개선시키거나 프로테아제를 보호하기 위한 상이한 방법들이 존재한다. 동물 사료 적용에서, 한가지 선택사항은 후-펠렛 액체 적용(Post-pellet liquid application)이며, 이는 전문화된 장비의 구입 및 설치, 액체 효소를 저장하기 위한 공간 및 적용할 효소의 양의 조심스러운 계산을 필요로 하므로 비교적 복잡하고 고가이다.

[0011]

다른 선택사항은 프로테아제를 펠렛화하기 전에 다른 성분(예컨대, 사료 또는 세제 속)을 사용한 보호성 코팅의 적용이다. 코팅은 예컨대, 세척 매질속에서, 또는 동물의 소화관 내에서 충분히 용해되지 않을 수 있으므로 효소의 효능을 감소시킬 수 있다. 펠렛화 공정의 고열 및 수분 함량을 견딜 수 있지만, 보다 낮은 온도 및 보다 높은 수분 조건에서, 예컨대, 동물의 위 또는 세척기 속에서 후속적으로 용해시키는 코팅 설계를 달성하는 것은 또한 어렵다.

[0012]

다른 선택사항은 본질적으로 열안정성 프로테아제를 사용하는 것이다. 이러한 프로테아제는 호열성 및 초-호열성 유기체로부터 기원하며 고 열안정성의 독특한 구조 및 기능 특성을 갖는다. 그러나, 이러한 프로테아제는 차선의 활성(suboptimal activity), 특이성, 생물이용률, pH-범위 또는 가공성과 같은, 다른 제한으로 인한 곤란

을 겪는다.

[0013] 따라서, 본 발명의 목적은 상기 논의한 제한으로 인한 곤란을 겪지 않는 안정한 프로테아제 변이체를 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

발명의 요지

[0015] 이러한 및 추가의 목적은 본 발명의 독립 청구항에 따른 방법 및 수단을 충족한다. 종속항은 구체적인 구현예에 관한 것이다.

발명의 구현예

[0017] 본 발명을 상세히 기술하기 전에, 본 발명은 기술된 장치 또는 조성을 또는 기술된 방법의 공정 단계의 특수한 구성성분 부분 또는 구조적 특징에 한정되지 않아야 하는데 이는 이러한 장치 및 방법이 변할 수 있기 때문임을 이해하여야 한다. 또한, 본원에 사용된 전문용어는 특수한 구현예만을 기술하기 위한 목적이며, 제한하고자 함이 아님을 이해하여야 한다. 특정의 척도(measure, 수단)가 서로 상이한 종속항에 인용되어 있다는 단순한 사실만으로 이러한 척도의 조합이 유리하게 사용될 수 없음을 나타내지는 않는다. 청구범위에서 임의의 참고 신호는 그 영역을 제한하는 것으로 고려되지 않는다. 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같은, 단수 형("a," "an" 및 "the")은 내용이 달리 명확하게 나타내지 않는 한 단수 및/또는 복수 참고를 포함한다. 또한, 청구범위에서, 단어 "포함하는"은 다른 요소 또는 단계를 배제하지 않는다.

[0018] 더욱이, 수치로 구분된 매개변수 범위가 제공되는 경우, 범위는 이러한 제한 값을 포함하는 것으로 간주됨을 이해하여야 한다.

[0019] 본원에 개시된 구현예는 서로 관련되지 않을 수 있는 개개 구현예로서 이해되어야 함을 의미하지 않음을 또한 이해하여야 한다. 하나의 구현예에서 논의된 특징은 본원에 나타낸 다른 구현예와 관련하여 또한 개시됨을 의미 한다. 하나의 경우에, 특정의 특징이 하나의 구현예로 개시되지 않으나, 다른 구현예로 개시된 경우, 기술자는 상기 특징이 상기 다른 구현예와 함께 개시됨을 의미하지 않음을 반드시 의미하는 것이 아님을 이해할 것이다. 기술자는 또한 다른 구현예에 대해 상기 특징을 개시하는 것이 본 출원의 요지이지만, 단지 명료함의 목적을 위해서 및 명세서를 관리가능한 분량으로 유지하기 위해서 이러한 개시가 이루어지지 않았음을 이해할 것이다.

[0020] 본 발명의 하나의 구현예에 따라서, 서열 번호 1 내지 3 중 어느 것에 제시된 바와 같은 쿠마몰리신 AS 콜격(Kumamolisin AS backbone)의 완전한 길이의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일한 프로테아제 변이체, 또는 단백질분해 활성을 유지하는 이의 단편, 분획 또는 셔플드 변이체(shuffled variant)가 제공된다. 프로테아제 변이체는

[0021] (i) 서열 번호 4에 제시된 바와 같은 쿠마몰리신 AS 야생형, 또는

[0022] (ii) 서열 번호 1 내지 3 중 어느 하나에 제시된 쿠마몰리신 AS 콜격과 비교하여 변경되거나 개선된 안정성을 나타낸다.

[0023] 용어 "셔플드 변이체"는 이러한 단편 또는 분획과 다른 상동성 효소로부터의 하나 이상의 단편의 조합이 단백질 분해 활성을 유지하는 한, 이러한 조합에 관한 것이다.

[0024] 용어 "상동성 효소(homologous enzyme)"는 쿠마몰리신과 동일한 구조적 폴드(structural fold) 및 적어도 40% 서열 동일성(sequence identity)에 속하는 효소를 기술한다. 이러한 범주는 본원에서 하기 논의된 바와 같은 세돌리신(Sedolisin)을 포함한다.

[0025] 쿠마몰리신 AS의 일부 돌연변이체가 기술되어 왔다. 쿠마몰리신 AS의 N291D 돌연변이체 균주의 발견은 셀리악병(celiac disease)에 대해 유용한 치료를 제공하기 위해 논의되어 왔다. 사람 위장관에서 N291D 쿠마몰리신 AS 단백질을 생산할 수 있는 유전적으로 변형된 유기체를 생성하는 것을 시사하는 많은 제안이 존재한다. 미국 출원 제US 20140178355 A1호를 참고한다.

[0026] 바람직하게는, 본 발명에 따른 쿠마몰리신 AS 변이체는 93% 동일성, 보다 바람직하게는 95% 동일성, 보다 바람직하게는 98% 동일성, 가장 바람직하게는 99% 동일성을 갖는다.

[0027] 용어 "쿠마몰리신"은 산-작용성 엔도펩티다제 및 트리펩티딜-펩티다제를 포함하는, S53(MEROPS 수탁 번호 MER000995, 또한 Wlodawer et al, 2003 참고)으로 불리는, 세돌리신 계열의 펩티다제로부터의 산 프로테아제를

지칭한다. 세돌리신은 펩스타틴에 의한 억제에 대해 내성이라는 점에서 대부분의 엔도펩티다제와는 상이한 최적의 산성 pH를 지닌 엔도펩티다제이다(Terashita et al., 1981; Oda et al., 1998).

[0028] 세돌리신의 활성화는 pH 6.5 이하, 보다 우수하게는 pH 3.5 이하에서 자가촉매적 절단을 포함하며(또한 특허원 제EP16176044호 및 Okubo et al., 2016 참고), 이는 성숙한 및 활성인 형태를 전달하기 위한 하나 이상의 펩타이드를 방출한다. 상기 자가촉매적 절단은 알칼리성, 중성 및 약산성 조건 하에서 억제된다.

[0029] 세돌리신은 Glu, Asp 및 Ser를 지닌 촉매 트리아드(catalytic triad)를 포함하며, 이는 서열 번호: 1에 따른 쿠마몰리신 AS에서 Glu267, Asp271 및 Ser278의 위치에 존재한다. Ser 잔기는 서브틸리신 프로테아제(MEROPS 계열 S8)의 촉매 트리아드 Asp, His, Ser 트리아드와 동일한 친핵성이고, 트리아드의 Glu는 구조적으로 동일한 위치는 아니지만 서브틸리신에서 His 일반 염기에 대한 기능적 치환이다.

[0030] 세돌리신의 단백질 폴드(protein fold)는 서브틸리신의 것과 밀접하게 관련되어 있으며, 그룹 둘 다는 때때로 세린 프로테아제로 불린다. 그러나, 세돌리신은 추가의 루프를 갖는다. 아미노산 서열은 서브틸리신과는 밀접하게 유사하지 않으며, 이는 명확히 상이한 활성 부위 잔기 및 최대 활성에 대해 수득되는 보다 낮은 pH를 고려할 때, 별도의 계열임이 타당하다.

[0031] 하나의 구현예에서, 서열 번호: 1로 제시된 쿠마몰리신 AS로부터 기원한 아미노산 서열, 또는 단백질분해 활성을 유지하는 이의 단편, 분획 또는 셔플드 변이체를 포함하는 프로테아제 변이체가 제공되며, 이러한 프로테아제 변이체는 D447, A449, A517, N510, V502, E453, E360, A514, A460, A392, A386, T301, D199, Q518, G266, P553, E269, R412, S435, G320, T326, T461, Q244, D293, A487, V274, A372, K283, T308, A418, I391, A423, A331, S327, I219, M333, A329, N515, A378, S434, E421, A433, S230, Q393, D399, Y490, G281, Y287, R516, A475, S354, S315P, W325, L442, A470, S324, Q361, A190, T196, Q202, E228, A229, A242, D251, S262, N291, L297, H305, D306, V314, A328, I330, L338, A342, A351, D358, G388, D402, V455, E459, A478, K483, Q497, T507, L540, Q542, A548, P551, R166 및/또는 D265로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열 번호: 1 내의 하나 이상의 잔기 위치에서 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는다.

[0032] 상기 제시된 번호매김이 서열 번호: 1 또는 4(이는 거의 동일하며, 4개는 야생형이고 1개는 돌연변이유발에 사용된 실제 골격이며, 2개 사이의 차이는 N 말단의 AA 잔기이다)를 지칭하지만, 청구된 프로테아제는 단백질분해 활성을 유지하는 이의 단편, 분획 또는 셔플드 변이체일 수 있다. 이러한 경우에, 돌연변이체 잔기의 번호매김이 여전히 완전한 길이의 서열 번호: 1 또는 4를 지칭하고, 각각 보다 짧은 형태의 번호매김으로 해독되어야 하지만, 수득되는 아미노산 서열은 서열 번호: 1 또는 4보다 더 짧다.

[0033] 일 구현예에서, 프로테아제 변이체는

[0034] (i) 서열 번호: 4에 제시된 바와 같은 쿠마몰리신 AS 야생형, 또는

[0035] (ii) 서열 번호: 1 내지 3 중 어느 것에 제시된 바와 같은 쿠마몰리신 AS 골격과 비교하여 변경되거나 개선된 안정성을 나타낸다.

[0036] 일 구현예에서, 프로테아제 변이체는 서열 번호: 1 또는 4에 제시된 바와 같은 쿠마몰리신과 비교하여, D447S, A449Y, A517T, N510H, E360L, E360V, E360C, V502C, E453W, A514T, A514Y, A514D, A514S, A460W, A386I, A392V, A392L, A392I, A392M, T301S, D199E, Q518G, P553K, E269M, E269T, E269C, E269H, E269Q, G266A, D293Y, G320A, R412Q, E421R, A487Q, T461V, T461C, A331F, A331Y, A329Q, A329H, A329T, S435I, S435R, S435T, S435V, V274I, A372S, K283L, Q244C, Q244G, T308C, A418W, I391W, A423V, T326R, T326W, T326L, T326K, I219L, S327F, S327L, S327W, M333I, N515G, A378G, S434G, A433G, S230D, Q393S, D399S, Y490W, A190D, T196S, Q202D, E228Q, A229W, A242S, D251S, S262C, G281R, Y287K, N291T, N291S, D293F, L297T, T301C, T301M, H305F, H305W, D306S, V314M, V314L, S315P, G320Q, G320S, S324L, S324R, W325K, A328W, A328D, A328R, A328Y, I330L, M333Y, M333L, L338R, A342R, A351S, S354E, S354Q, D358G, Q361C, Q361L, A386L, A386V, A386M, G388C, D402E, R412M, R412E, R412D, L442W, L442D, D447C, D447A, A449L, A449M, A449E, A449N, E453Y, E453F, V455I, V455L, E459W, A460R, A470V, A475V, A478L, K483A, Q497Y, Q497M, Q497D, Q497R, V502T, T507L, R516L, R516E, R516I, A517S, L540V, Q542H, Q542D, Q542S, A548S, P551N, P551R, P553L, R166I, D265T로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 아미노산 치환을 갖는다.

[0037] 이러한 개개의 아미노산 치환은 표 1에 나타나 있다. 상기 제시된 번호매김이 서열 번호: 1 또는 4를 지칭하지만, 청구된 프로테아제는 단백질분해 활성을 유지하는 이의 단편, 분획 또는 셔플드 변이체일 수 있음에 주목한다. 이러한 경우에, 돌연변이체 잔기의 번호매김이 완전한 길이의 서열 번호: 1 또는 4를 여전히 참고하지만,

수득되는 아미노산 서열은 서열 번호: 1 또는 4의 것보다 더 짧거나, 더 길다.

[0038] 본 발명의 일 구현예에서, 프로테아제 변이체는 서열 번호: 1 또는 4에 제시된 바와 같은 쿠마몰리신 AS와 비교하여 적어도 하나의 아미노산 치환을 가지며, 이러한 치환은 다음으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다:

- [0039] · A517T 또는 A517S
- [0040] · A514S, A514T 또는 A514D
- [0041] · N510H
- [0042] · V502C
- [0043] · A449Y, A449N 또는 덜 선호되는 A449E
- [0044] · D447S 또는 D447C
- [0045] · A392I, A392L, A392V 또는 A392M
- [0046] · E360L, E360V 또는 E360C
- [0047] · E269H, E269T, E269M, E269C 또는 E269Q
- [0048] · Q518G
- [0049] · G320Q, G320A 또는 덜 선호되는 G320S
- [0050] · A386I, A386L, A386V 또는 A386M
- [0051] · G266A
- [0052] · A372S
- [0053] · E453Y, E453W 또는 덜 선호되는 E453F
- [0054] · A460W
- [0055] · A329Q, A329H 또는 A329T
- [0056] · D293Y
- [0057] · R412E, R412D, R412Q 또는 R412M
- [0058] · T301S
- [0059] · D199E
- [0060] · A331F 또는 A331Y
- [0061] · S435T, S435R 또는 S435I
- [0062] · V274I
- [0063] · D399S
- [0064] · S230D
- [0065] · S434G
- [0066] · M333I 또는 M333L
- [0067] · N515G
- [0068] · A418W
- [0069] · I391W
- [0070] · E421R
- [0071] · A487Q

- [0072] · A378G
- [0073] · A423V
- [0074] · T326K, T326L, T326 R 또는 T326W
- [0075] · A433G
- [0076] · D399S
- [0077] · Y490W
- [0078] · R516E 또는 R516I
- [0079] · P553K
- [0080] · V314L
- [0081] · S327W, S327L 또는 S327FA475V
- [0082] · A342R
- [0083] · S354E 또는 S354Q
- [0084] · S315P
- [0085] 이러한 치환 중 일부는 서열 번호: 1 또는 4로 제시된 바와 같은 쿠마몰리신 AS내로 개별적으로 도입되는 경우 높은 Δ IT50을 유발하므로, 바람직하지만, 다른 것은 표 2a, 2b 및 4의 조합적 및 구별되는 클론, 및 일부 조합에 있어서 높은 발생율을 가지고, 높은 전체적인 Δ IT50을 지닌 개개 치환의 조합을 갖는다.
- [0086] 일부를 상호교환적으로 사용하여 효소를 안정화할 수 있으며 일부 조합은 생산 또는 사료의 성능, 유사 발효 역가(like fermentation titer), 프로테아제 억제제(대두 콩 보우만-버크 및 쿠니츠-형 트립신(soy bean Bowman-Birk and Kunitz-type trypsin)로서 항-영양 인자의 가수분해 및/또는 키모트립신 억제제), pH 프로파일, pH 및 펩신 안정성, 또는 보다 높은 이온 강도에 대한 안정성 및 이러한 강도 하에서의 성능과 관련된 다른 특성을 야기한다.
- [0087] 상기 제시된 바와 같은 번호매김이 서열 번호: 1 또는 4를 참고하지만, 청구된 프로테아제는 단백질분해 활성을 유지하는 이의 단편, 분획 또는 셀플드 변이체일 수 있음을 주목한다. 이러한 경우에, 돌연변이체 잔기의 번호 매김이 여전히 완전한 길이의 서열 번호: 1 또는 4를 참고하지만, 수득되는 아미노산 서열은 서열 번호: 1 또는 4의 서열보다 더 짧다.
- [0088] 본 발명의 하나의 구현예에서, 프로테아제 변이체는 서열 번호: 1 또는 4에 제시된 바와 같은 쿠마몰리신 AS 골격과 비교하여 적어도 2개의 아미노산 치환을 갖는다. 바람직하게는 프로테아제 변이체는 상기 그룹으로부터 선택된 적어도 3개, 보다 바람직하게는 적어도 4개, 보다 바람직하게는 적어도 5개 및 가장 바람직하게는 적어도 6개의 아미노산 치환을 갖는다. 바람직하게는 이러한 아미노산 치환은 상기 논의된 개개 치환의 조합이다.
- [0089] 본 발명의 일 구현예에서, 프로테아제 변이체는 서열 번호: 1 또는 4에 제시된 바와 같은 쿠마몰리신 AS 골격과 비교하여 적어도 2개의 아미노산 치환을 가지며, 이러한 적어도 2의 아미노산 치환은 447 및 449, 453, 502, 510, 517, 360, 460, 199, 266, 301, 386 및 514로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열 번호: 1 또는 4 내에 2 개 이상의 위치에 존재한다. 바람직하게는 프로테아제 변이체는 상기 그룹으로부터 선택된 적어도 3개, 보다 바람직하게는 적어도 4개, 보다 바람직하게는 적어도 5개 및 가장 바람직하게는 적어도 6개의 아미노산 치환을 갖는다.
- [0090] 하나의 바람직한 구현예에서, 프로테아제 변이체는 D447S, A449Y, A517T, N510H, E360L, E360V, E360C, V502C, E453W, A514T, A514Y, A460W, A386I, D199E, G266A, T301S로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나, 바람직하게는 적어도 2개, 보다 바람직하게는 적어도 3개, 보다 바람직하게는 적어도 4개, 보다 바람직하게는 적어도 5개, 가장 바람직하게는 적어도 6개의 아미노산 치환을 갖는다.
- [0091] 표 2a, 2b 및 4는 상기 제시한 개개 돌연변이의 조합을 갖는 이러한 소위 "구별되는 클론" 또는 "조합 클론"의 세트를 나타낸다.
- [0092] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "조합 클론 또는 변이체"는 재조합 라이브러리로부터 스크리닝된(screened) 클

론 또는 변이체를 의미한다. 이러한 재조합 라이브러리는 표 1의 그룹으로부터 선택된 상이한 양 및 돌연변이를 수반하는 집단을 포함한다.

[0093] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "구별되는 클론 또는 변이체"는 합리적인 방식으로 표 1의 그룹으로부터 선택된 돌연변이의 정의된 세트를 함유하도록 작제된 클론을 의미한다.

[0094] 바람직하게는, 본 발명에 따른 프로테아제 변이체가 갖는 상기 개선된 안정성은 개선된 열안정성(IT50)이다. 효소의 열안정성은 불활성화 온도(IT 50)를 측정함으로써 일반적으로 결정된다. "불활성화 온도"는 특정의 기간 동안 항온처리한 다음 실온으로 냉각 후 효소의 잔류 활성이 실온에서 동일한 조건 하에 동일한 기간 동안 항온 처리된 동일한 효소의 잔류 활성의 50%인 온도로 정의된다.

[0095] 일 구현예에 따라서, 프로테아제 변이체는 서열 번호: 1 또는 4에 제시된 바와 같은 쿠마몰리신 AS 골격내 선택된 잔기에서 치환의 세트를 가지며, 이러한 세트는 다음 중 적어도 하나이다:

a) 360, 447, 449 및 510

b) 447, 449 및 514, 및/또는

c) 447, 449, 453, 및 517.

[0099] 이러한 동시 치환된 잔기의 3개의 세트는 특히 바람직한(콘센서스 돌연변이(consensus mutations)) 특정의 구별되는 클론 또는 조합 클론의 3개의 세트에서 발생한다. 표 2a/도 3, 표 2b/도 4 및 표 4/도 5를 참고한다. 이러한 이유로, 동시 치환된 잔기의 3개의 세트는 이것이 안정성을 개선시키는 경우 특히 상승작용이 있는 것으로 여겨진다.

[0100] 일 구현예에 따라서 상기 개선된 안정성은 활성화된 효소 또는 자이모겐의 개선된 열안정성(IT50)이다. 이의 일 구현예에서, 프로테아제 변이체는 ≥ 75 내지 $\leq 105^{\circ}\text{C}$ 의 IT50을 갖는다.

[0101] 일부 구현예에서, 활성화된 효소의 경우 ≥ 70 내지 $\leq 90^{\circ}\text{C}$ 의 IT50이 제공되지만, 자이모겐의 경우 ≥ 80 내지 $\leq 105^{\circ}\text{C}$ 의 IT50이 제공된다.

[0102] 쿠마몰리신 AS 야생형 효소는 자이모겐, 즉 불활성 자이모겐으로서, 및 활성화된 효소으로서 $59^{\circ}\text{C} +/ - 1^{\circ}\text{C}$ ($n = 10$)의 IT50를 갖는다. 본 명세서의 과정에서, 상이한 변이체는 이들의 IT50, 또는 ΔIT50 (즉, 야생형 IT50과 비교한 차이)에 의해 특징화된다.

[0103] 본 발명의 다른 구현예에 따라서, 상기 설명에 따른 프로테아제 변이체를 암호화하는 핵산 분자가 제공된다. 또한, 상기 핵산 분자를 포함하는 플라스미드 또는 벡터가 제공될 뿐만 아니라 상기 핵산 분자를 포함하는 상기 플라스미드 또는 벡터로 형질전환된 숙주 세포가 제공된다.

[0104] 또한, 프로테아제 또는 프로테아제 변이체를 생산하는 방법이 제공되며, 상기 방법은:

a) 상기 숙주 세포를 배양하는 단계, 및

b) 상기 숙주 세포로부터 프로테아제 또는 프로테아제 변이체를 단리하거나, 배지로부터 프로테아제 또는 프로테아제 변이체를 수거하는 단계를 포함한다.

[0107] 본 발명의 다른 구현예에 따라서, 상기 설명에 따른 프로테아제 변이체를 포함하는 조성물이 제공되며, 이러한 조성물은 ≥ 5 의 pH를 갖는다.

[0108] 이러한 조성물은 - 본원에 개시된 특정 프로테아제 변이체를 아직 사용하지 않는 - 유럽 출원 제16176044.2-1375호 및 이의 우선권을 청구하는 이후 출원에 일반적으로 논의되어 있으며, 이의 내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0109] 본 발명의 다른 구현예에 따라서, 상기 설명에 따른 프로테아제 변이체 또는 조성물을 포함하는 사료 첨가물, 사료 성분, 사료 보충물, 및/또는 가축사료가 제공된다.

[0110] 또한, 가축사료의 제작을 위한 상기 설명에 따른 프로테아제 변이체의 용도가 제공된다.

[0111] 이러한 사료 첨가물, 사료 성분, 사료 보충물, 및/또는 가축 사료는 바람직하게는 단위 가금류(monogastric poultry), 돼지, 어류 및 수경재배를 의미하며, 여기서 이는 가축 사료로부터 단백질 소화 및 흡수를 증가시키고 동물 건강 또는 소화에 유해한 단백질 생성 화합물(proteinogenic compound)을 분해하는 것을 돋는다.

[0112] 더욱이, 상기 설명에 따른 프로테아제의 사용은 다음으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 목적 또는 제제를 위해 제공된다:

- [0113] · 세제
- [0114] · 과일 및 음료 가공
- [0115] · 가죽 가공
- [0116] · 단백질 가수분해물의 생산
- [0117] · 경질 표면 세정 또는 생물막 세정
- [0118] · 상처 치유를 촉진하기 위한 괴사 또는 화상 조직의 치료,
- [0119] · 조직 가공시 가공 보조 및/또는
- [0120] · 베이킹 반죽 제조를 포함하는 식품 제조.

[0121] 유사하게, 다음으로 이루어진 그룹으로부터 하나의 목적 또는 이로부터 선택된 제제를 위한 첨가제, 성분 또는 제제가 제공되며 이러한 첨가제, 성분 또는 제제는 상기 설명에 따른 조성물을 포함한다:

- [0122] · 세제
- [0123] · 과일 및 음료 가공
- [0124] · 가죽 가공
- [0125] · 단백질 가수분해물의 생산
- [0126] · 경질 표면 세정 또는 생물막 세정
- [0127] · 상처 치유를 촉진하기 위한 괴사 또는 화상 조직의 치료,
- [0128] · 조직 가공시 가공 보조 및/또는
- [0129] · 베이킹 반죽 제조를 포함하는 식품 제조.

[0130] 또한, 상기 설명에 따른 프로테아제 변이체를 생성하는 방법이 제공되며, 이러한 방법은:

- [0131] i) 서열 번호: 1 내지 4 중 어느 것에 제시된 바와 같은 쿠마몰리신 AS 아미노산 서열을 암호화하는 DNA, cDNA 또는 mRNA를 돌연변이유발시키는 단계,
 - [0132] ii) 이렇게 수득된 쿠마몰리신 AS의 하나 이상의 돌연변이체를 발현시키는 단계, 및
 - [0133] iii) 적어도 안정성, 바람직하게는 열안정성에 대해 쿠마몰리신 AS의 하나 이상의 돌연변이체를 시험하는 단계.
- [0134] 바람직하게는, 상기 방법에서, 쿠마몰리신 AS 중 하나 또는 변이체의 암호화 핵산 서열 및/또는 아미노산 서열이 측정된다. 이러한 목적을 위해, 선행 기술로부터의 통상의 방법을 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

실험 및 도면

본 발명은 도면 및 전술한 설명에서 예증되고 상세히 기술되어 있지만, 이러한 예증 및 설명은 예증적 또는 예시적으로 고려되어야 하며 제한하지 않는 것으로 고려되어야 하고; 본 발명은 개시된 구현예에 한정되지 않는다. 개시된 구현예에 대한 다른 변형은 도면, 개시내용, 및 첨부된 청구범위의 연구로부터, 청구된 발명을 실시하는에 있어서 당해 분야의 기술자에 의해 이해되어 시행될 수 있다. 임의의 참고 부호는 영역을 제한하는 것으로 고려되지 않아야 한다.

본원에 개시된 모든 아미노산 서열은 N-말단 내지 C-말단에 나타나 있으며; 본원에 개시된 모든 핵산 서열은 5'→3'으로 나타낸다.

1. 쿠마몰리신 AS 골격의 아미노산 서열

서열 번호: 1은 본원에 사용된 쿠마몰리신 AS 골격의 전구효소(proenzyme)(프로펩타이드 및 효소, 본원에 또한

자이모겐으로 불림)를 나타낸다. 쿠마몰리신 AS의 야생형 서열이 N-말단 M 잔기를 갖지만, 본원에 사용된 쿠마몰리신 AS 골격은 상기 M을 결여하고 있는데, 이는 후자가 절단제거된 신호 서열(signal sequence)에 의해 대체되었다. 이러한 신호 서열은 예이다. sacB 신호 펩타이드 MNIKKFAKQATVLFTTA LLAGGATQAFA.

서열 번호: 1에서, AA 2 내지 189번(결여하고 있는 선행의 N-말단 M은 서열 번호의 번호매김에서 아미노산 번호 1(AA NO 1)로 아직 고려되고 있다)를 포함하며, 효소는 AA 190 내지 553번을 포함한다:

SDMEKPWKE	GEE ²⁴ AVLQG	HARAQAPQAV	DKGPVAGDER	MAVTVVLRRQ	RAGELAAHVE	60
RQAAIAPHAR	EHLKREAFAA	SHGASLDDFA	ELRRFADAHG	LALDRANVA	GTAVLSGPVD	120
AINRAFGVEL	RHFHDHPDGST	RSYLGEGTVP	ASIAPMIEAV	LGLDTRPVAR	PHFRMQRRAE	180
GGFEARSQAA	APTAYTPLD	AQAYQFPEG	DGQQCIAI_I	ELGGGYDEAS	LAQYFASLGV	240
PAPQVVSVSV	DGASNQPTGD	PSGPDG ²⁶ VEL	DIEVAGALAP	GAKFAVYFAP	NTDAGFLDAI	300
TTAIHDPTLK	PSVVS_ISWGG	PEDSWT ³⁰ SAAI	AAMNRAFLDA	AALGVTVLAA	AGDSGSTDGE	360
QDGLYHVDFP	AAS_PYVLACG	GTRLV ³⁶ ASGRGGR	IAQETVWNNDG	PDGGATGGGV	SRI_FPLPAWQ	420
EHANVPPSAN	PGAS_SGRGVP	DLAGNADPAT	GYEVVI_DGEA	TIVIGGTSAVA	PLFAALVARI	480
NQKLGKAVGY	LNPTLYQLPA	DVFHD ⁵² TEGN	NDIANRAQIY	QAGPGWDPCT	GLGS_PIGVRL	540
LQALLPSASQ	PQP	553				

프로펩타이드는 회색으로 음영처리되어 있다. 촉매 트리아드 SED(=Ser/Glu/Asp)는 이텔릭체로 나타낸, E267, D271 및 S467로 이루어진다. 본 발명자가 변경된/개선된 특성을 야기하는 돌연변이를 발견하였던 위치는 밑줄쳐져 있다.

2. 쿠마몰리신 AS 골격 + 리더 서열(leader sequence) 및 HisTag의 아미노산 서열

서열 번호: 2에서, sacB 리더 서열은 AA 1 내지 29번(밑줄친 파선)을 포함하며 프로펩타이드의 원래의 N-말단 M을 대체한다. 프로펩타이드(회색으로 음영처리됨)는 AA 30 내지 217번을 포함하고, 활성화된 효소는 AA 218 내지 581번을 포함하며 His-tag는 AA 582 내지 587번(이중 밑줄쳐짐)을 포함한다.

MN IKKFAKQA	TVLFTTALL	AGGATQAFAS	DMEKPWKEGE	EARAVLQGH	RAQAPQAVDK	60
GPVAG DERMA	VTVVLRQRA	GELAAHVERQ	AAIAPHAREH	LKREAFAAASH	GASLDDFAEL	120
RRFADAHGLA	LDRANVAAGT	AVLSGPVDAI	NRAFGVELRH	FDHPDG ¹⁸⁰ SYRS	YLGEVTV ¹⁸⁵ PAS	180
IAPMIEAVLG	LDTRPVARPH	FRMQRRAEGG	FEARSQAAAP	TAYTPLDVAQ	AYQFPEGLDG	240
QGQCIAI IEL	GGGYDEASLA	QYFASLGVP	PQVVSVDG	ASNQPTGDP	GPDGEVELDI	300
EVAGALAPGA	KFAVYFAPNT	DAGFLAITT	AIHDPTLKP	VVSISWGGPE	DSWTSAAIAA	360
MNRAFLDAAA	LGVTVLAAAG	DSGSTDGEQD	GLYHVDFPAA	SPYVLACGGT	RLVASGGRIA	420
QETVWNNDGP	GGATGGGVS	IFPLPAWQEH	ANVPPSANPG	ASSGRGPVDL	AGNADPATGY	480
EVVIDGEATV	IGGTSAVAPL	FAALVARINQ	KLGKAVGYLN	PTLYQLPADV	FHDITEGNND	540
IANRAQIYQA	GPGWDPCTGL	GSPIGVRLQ	ALLPSASQPQ	PHHHHHH	587	

3. 프로펩타이드를 결여한 활성화된 쿠마몰리신 AS 골격의 아미노산 서열

서열 번호: 3에서, 활성화된 쿠마몰리신 AS 골격 효소는 AA 1 내지 364번으로 나타나 있다:

AAAPTAYTPLD	VAQAYQFPEG	LDGQQCIAI	IELGGGYDEA	SLAQYFASLG	VPAPQVVSVS	60
VDGASNQPTG	DPSGPDG ¹²⁰ EV	LDIEVAGALA	PGAKFAVYFA	PNTDAGFLDA	ITTAIHDPTL	120
KPSVVSISWG	GPEDSWTSA	IAAMNRAFL	AAALGVTVL	AAGDSGSTDG	EQDGLYHVDF	180
PAASPYVLAC	GGTRLV ²⁴⁰ ASGG	RIAQETVWN	GPDGGATGGG	VSRIFPLPAW	QECHANVPPSA	240
NPGASSGRGV	PDLAGNADPA	TGYEVV ³⁰⁰ IDGE	ATVIGGTSAV	APLFAALVAR	INQKLGKAVG	300
YLNPTLYQLP	ADVFD ³⁶⁰ HITEG	NNIANRAQI	YQAGPGWDP	TGLGSPIGVRL	LQALLPSAS	360
QPQP	364					

4. 쿠마몰리신 AS 야생형의 아미노산 서열

서열 번호: 4는 알리사이클로바실러스 센다이엔시스(*Alicyclobacillus sendaiensis*)(GenBank: AB085855.1)로부터 수득된 바와 같은, 쿠마몰리신 AS 야생형의 전구효소(프로펩타이드 및 효소) 서열을 나타낸다. 서열 번호: 4는 본원에 사용된 쿠마몰리신 AS 골격의 서열이 야생형 서열 번호: 4에 여전히 존재하는 N-말단 M을 결여하고

있다는 점에서 본원에 사용된 쿠마몰리신 AS 골격의 서열을 나타내는 서열 번호: 1과는 상이하다. 이는 서열 번호: 1에서 N-말단 M이 sacB 신호 서열로 대체되기 때문이며, 이러한 신호 서열은 후에 절단 제거된다. 서열 번호: 4에서, 프로펩타이드는 AA 1 내지 189번을 포함하고, 효소는 AA 190 내지 553번을 포함한다:

MSDMEKPWKE GEEARAVLQG HARAQAPQAV DKGPVAGDER MAVTVVLRQ RAGELAAHVE	60
RQAAIAPHAR EHLKREAAFAA SHGASLDDFA ELRRFADAHG LALDRANVAAGTAVLSPV	120
ATINRAFGVEL RHFDHPDGSY RSYLGEVTVP ASIAPMIEAV LGDTRPVAR PHFRMQRRAE	180
GGFEARSQAA APTAYTPLDV AQAYQFPEGL DGQQCIAI I ELGGGYDEAS LAQYFASLGV	240
PAPOVVSVSV DGASNQPTGD PSGPDGEVEL DIEVAGALAP GAKFAVYFAP NTDAGFLDAI	300
TTAIHDPTLK PSVVSISWGG PEDSWTSAAI AAMNRAFLDA AALGVTVLAA AGDSGSTDGE	360
QDGLYHVDFF AASPYVLACG GTRLVASGGR IAQETVWNNDG PDGGATGGGV SRIFPLPAWQ	420
EHANVPPSAN PGASSGRGVLP DLAGNADPAT GYEVVIDGEA TVIGGTSAVA PLFAALVARI	480
NQKLGKAVGY LNPTLYQLPA DVFHLDITEGN NDIANRAQIY QAGPGWDPC GLGSPIGVRL	540
LQALLPSASQ PQP	553

다시, 프로펩타이드는 회색으로 음영처리되어 있다. 촉매 트리아드 SED(=Ser/Glu/Asp)는 이탈릭체로 나타낸, E267, D271 및 S467로 이루어져 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 자이모겐 및 활성화된 효소의 열 안정성을 위해 최적화된 변이체내 돌연변이의 분포를 나타낸다.

도 2는 야생형 및 표 4로부터의 상단 변이체 1 내지 7번에 대한 안정성 및 성능에 있어서 이온 강도의 효과를 나타낸다.

도 3 내지 5는 구별된 클론 및 조합 클론의 상이한 세트내 아미노산 위치에서 치환의 발생을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0136]

실시예 1: 프로테아제 활성 검정

[0137]

프로테아제 활성 검정을 미세역가 플레이트(microtiter plate)에서 수행하였다.

[0138]

a) AAPF 검정 96웰 포르메이트

[0139]

검정(assay) 완충액: 실험에 따라, pH 3에서 200 mM 아세트산나트륨, 1 mM CaCl₂, 0.01% 트리톤 X-100

[0140]

기질 스톡 용액: 물이 없는 DMSO 중의 100 mM

[0141]

기질 작업 용액: 검정 완충액 속에 1:50으로 희석된 기질 스톡 용액

[0142]

실행: 50 μL의 희석된 샘플을 Nunc 96 선명한 편평 바닥 플레이트의 웰(well) 내로 로딩한다. 샘플의 용적 활성에 상응하는 0.01% 트리톤-X100을 함유하는 물 속에서 희석한다. 50 μL의 기질 작업 용액을 첨가하여 반응을 개시한다. 효소 활성의 척도로서 410 nm에서의 흡광도의 증가를 모니터링함으로써 37°C에서 동역학을 측정한다. 활성은 참고 방법으로 측정한 공지된 단백질분해 활성을 갖는 참고 효소 제제를 사용한 보정 곡선을 구축함으로써 활성을 계산하였다.

[0143]

상이한 pH 값에서 프로테아제 활성을 검정하기 위하여 다음의 완충액을 사용하였는데, 각각 pH 2.0 내지 3.0 사이의 200 mM: 글리신/HCl, pH 3.0 내지 6.0 사이의 시트르산삼나트륨/시트르산 및 pH 6.0 내지 7.5 사이의 트리스/말레산이다.

[0144]

b) IT₅₀

[0145]

IT₅₀은 상술한 조건 하에서 활성의 50%가 불활성화되는 온도를 정의한다. 이와 동일하지 않지만, 이는 적용, 예컨대, 세제 적용, 예컨대, 접시 세척 또는 치물 또는 경질 표면의 세정 및 다른 기술적 적용에서 펠렛화 조건 또는 조건들에서 열 안정성에 대한 척도이다.

[0146]

예측된 조건 하에서 효소 변이체의 스크리닝이 필수적이다. 본원에 기술된 것과 같은 프로테아제의 경우, 본원에 또한 기술된 바와 같은 방법에 의한 열적으로 보다 안정한 변이체에 대한 스크리닝은 프로테아제의 자가-가

수분해에 의해 영향받을 수 있다. 특허원 제EP16176044호의 실시예 9에 이미 기술된 바와 같이, 프로테아제가 활성인 조건 하에서 보다 높은 열 안정성을 지닌 변이체에 대한 스크리닝은 열 불활성화 및 자가-가수분해의 혼합 효과의 결과로서, 다수의 거짓 양성을 생성한다. 동일한 적용은 본원에 기술된 산 프로테아제의 부류의 경우에서와 같이, 후술된 방식의 불활성 효소 사이모겐 형태의 효소 및 효소 변이체에 대한 시험을 실행함으로써, 소 분자 가역성 효소 억제제의 부재하에서의 이러한 문제를 피하는 것을 교시하고 있다.

[0147] 검정 완충액: 50 mM 인산나트륨, 0.25mM CaCl₂ pH6.5

[0148] 800 mM 글리신/HCl pH2.8

[0149] 열 불활성화 실행: 샘플을 인산칼륨 완충액 속에서 용적 활성에 상응하도록 희석시켰다. 최종 용액의 pH를 pH 6.3을 초과하도록 점검하였다. 샘플을 중복하여 웨일 20 μL로 384 웨일 PCR 플레이트에 PCR 기계의 온도 구배의 방향에 따라서 이전시켰다. 플레이트를 접착성 또는 가열 용융 커버 호일로 밀봉하고 예측된 IT50 값 주변에서 +/- 12°C의 열 구배를 지닌 열 구배 사이클러 상에서 10분 동안 항온처리하였다. 샘플을 다음과 같이 AAPF-pNA를 사용하여 샘플의 잔류 활성을 측정하기 전에 8°C로 냉각시켰다. 온도 항온처리 플레이트로부터 각각 15 μL의 샘플을 384 웨일 그라이너(greiner) 선명한 편평 바닥 PS-마이크로플레이트 내로 이동시키고 9 μL의 글리신 완충액을 가하여 37°C에서 1시간의 항온처리 동안 프로테아제를 불활성화시켰다. 프로테아제를 활성화시킨 후 검정을 24 μL의 AAPF-pNA 용액(0.01% 트리톤-X100이 들어있는 수 중 2 mM AAPF-pNA)을 첨가하여 개시하고 활성을 37°C에서 다음의 동역학에 의해 측정하였다. 불활성화 온도에서 잔류 활성에 대해 표준화된 실험 데이터를 4개의 매개변수 세부 계획 기능에 맞추어서 IT50을 평가하였다.

c) 프로펩타이드 - 활성화된 효소 단백질의 부재하의 IT50:

[0150] 열 불활성화 실행 전의 효소 활성화. 샘플을 2b)에 기술된 바와 같이 pH 2.8의 글리신 완충액 속에서 용적 활성에 상응하도록 희석시키고 pH를 pH 4.0 이하가 되도록 점검하였다. 샘플을 37°C에서 1시간 동안 항온처리하여 활성화시켰다. 항온처리 후 샘플을 50 mM 인산나트륨 완충액 pH 8.0 속에서 1:3으로 희석함으로써 7.0 초과로 설정하였다. 활성화된 효소 단백질 실행의 열 불활성화. 활성화된 효소 단백질의 분취량을 중복하여 웨일 20 μL로 384 웨일 PCR 플레이트에 PCR 기계의 온도 구배의 방향에 따라 이동시켰다. 플레이트를 접착성 또는 가열 용융 커버 호일로 밀봉하고 예측된 IT50 값 주변의 +/- 12°C의 온도 구배로 10분 동안 열 구배 사이클러 상에서 항온처리하였다. 샘플을 다음과 같이 AAPF-pNA를 사용하여 샘플의 잔류 활성을 측정하기 전에 8°C로 냉각시켰다. 온도 항온처리 플레이트로부터 각각 15 μL의 샘플을 384 웨일 그라이너 선명한 편평 바닥 PS-마이크로플레이트 내로 이동시키고 9 μL의 글리신/HCl 완충액을 가하여 pH를 3.0으로 조절하였다. 검정은 24 μL의 AAPF-pNA 용액(0.01% 트리톤-X100이 들어있는 수 중 2 mM AAPF-pNA)에 첨가하여 개시하고 활성을 37°C에서 다음의 동역학에 의해 측정하였다. 불활성화 온도에서 잔류 활성에 대해 표준화된 실험 데이터를 4개의 매개변수 세부 계획 기능에 맞추어서 IT50을 평가하였다.

d) pH-프로파일 - 활성화된 효소 단백질

[0151] 효소 단백질을 함유하는 희석되지 않은 세균 상층액을 1 M HCl을 사용하여 pH 4로 적정하고 효소를 37°C에서 60분 동안 활성화시켰다. 20 μL의 샘플을 pH가 1.8 내지 7.0(NaCl을 사용하여 15 mS/cm의 전도도로 조정함)인 200 μL의 브리튼 로빈슨 완충액(Britton Robinson buffer)에 가하였다. 이후에, 20 μL를 384-웨일 그레이너 편평 바닥 PS-미세플레이트 및 20 μl의 기질 용액(0.01% 트리톤-X100이 들어있는 수 중 2 mM AAPF-pNA)으로 이동시키고 활성을 실시예 1a)에 기술된 바와 같이 410 nm 및 37°C에서 동역학을 모니터링함으로써 측정하였다. 각각의 동역학 실험을 4회 수행하였다.

e) pH/펩신-내성

[0152] 효소 단백질을 함유하는 희석되지 않은 세균 상층액을 1 M HCl을 사용하여 pH 2.5로 적정하였다. 이후에, 90 μL를 Nunc 96-웨일 선명한 편평 바닥 미세역가 플레이트로 이동시켰다. pH 2.5 완충액(검정시 최종 농도 25 μg/mL) 또는 pH 2.5 완충액 속의 10 μl의 250 μg/mL 펩신 스톡 용액을 각각의 웨일에 가한 다음 37°C에서 30분 동안 항온처리하였다. 최종적으로, 5 μl의 100 μM 펩스타틴 A 용액(최종 농도 5 μM)을 각각의 웨일에 가하여 펩신 반응을 정지시켰다. 25 μl의 샘플을 세로운 Nunc 96-웨일 선명한 편평바닥 미세역가 플레이트 내의 175 μl의 글리신/HCl 완충액 pH 3 속으로 이동시켰다. 이후에, 20 μl를 384-웨일 그레이너 편평 바닥 PS-미세플레이트 및 20 μl의 기질 용액(0.01% 트리톤-X100이 들어있는 수 중 2 mM AAPF-pNA)내로 이동시키고 실시예 1 a)에 기술된 바와 같이 410 nm 및 37°C에서 동역학을 모니터링함으로써 활성을 측정하였다. 각각의 동역학 실험을 4회

수행하였다.

[0156] f) 전도성 의존성

20 μ L의 희석되지 않는 세균 상층액을 NaCl을 사용하여 Nunc 96-웰 선명한 편평 바닥 미세역가 플레이트 속에서 2, 4, 6, 10, 20, 30, 40, 50 mS/cm의 전도도로 조절한 180 μ L 글리신/HCl 완충액 pH 3.0 속에 희석시켰다. 샘플을 37°C에서 20분 동안 항온처리한 다음 20 μ L의 샘플을 384-웰 그레이너 편평 바닥 PS-미세플레이트 및 20 μ L의 기질 용액(0.01% 트리톤-X100이 들어있는 수 중 2 mM AAPF-pNA)으로 이동시키고 실시예 1a)에 기술된 바와 같이 410 nm 및 37°C에서 동역학을 모니터링함으로써 활성을 측정하였다. 각각의 동역학 실험을 4회 수행하였다.

[0158] g) BBI/KTI 가수분해 - 기능적 트립신 검정

보우만-버크(Bowman-Birk) 및 쿠니츠-형(Kunitz-type) 억제제(BBI/KTI)는 콩과식물(legume) 및 곡물 날알의 종자에 광범위하게 퍼져있는 세린 프로테아제의 강력한 억제제이다. 검정 원리는 프로테아제 활성을 의해 BBI/KTI의 단백질분해적 분해가 벤질-아르기닌-pNA(Bz-R-pNA) 기질 상에서 억제제없이 천연 트립신 활성을 회복한다는 것이다. 효소 단백질을 함유하는 90 μ L의 세균 상층액을 글리신/HCl 완충액 속에 pH 3.0으로 희석시킨 다음 37°C에서 30분 동안 항온처리하였다. 20 μ L의 샘플을 이후에 20 μ L의 억제제 용액(KTI: 글리신 완충액 pH 3.0에서 희석시킨 8 μ g/mL; BBI: 16 μ g/mL; KTI/BBI: 4/8 μ g/mL)과 혼합하고 37°C에서 60분 동안 추가로 항온처리하였다. 15 μ L의 샘플을 384-웰 그레이너 편평 바닥 PS-미세플레이트로 이동시킨 다음 pH 8.0에서 15 μ L의 트립신 용액(최종 트립신 농도는 1 μ g/mL이다; 최종 pH 7.0 또는 pH 7.5)을 각각의 웰에 가하고 플레이트를 37°C에서 10분 동안 항온처리하였다. 최종적으로, 30 μ L의 기질 용액(0.01% 트리톤-X100이 들어있는 수 중 2 mM Bz-R-pNA)을 각각의 웰에 가하고 실시예 1a)에 기술된 바와 같이 410 nm 및 37°C에서 동역학을 모니터링함으로써 활성을 측정하였다. 각각의 동역학 실험을 4회 수행하였다.

[0160] 실시예 2: 유전적 다양성의 생성

초기의 유전적 다양성은 서열 번호: 1의 활성 효소 코어 서열의 각각의 위치를 무작위처리함으로써 도입하였다. 돌연변이체 효소 단일 부위 포화 라이브러리를 Green & Sambrook (eds), Molecular Cloning, 4th edition에 기술된 바와 같은 돌연변이유발 방법, CSHL 및 Cadwell and Joyce (PCR Methods Appl. 3 [194], 136-140에 개시된 바와 같은 적합한 돌연변이유발원성 PCR 방법을 사용하여 이. 콜라이/바실러스 셔틀 벡터(shuttle vector) 상에 수반된 유전자내로 도입하였다. 프로테아제 효소 변이체는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 내에서 이종 발현 후 특성화하고 표현형적으로 최적화된 변이체를 실시예 3에 요약된 스크리닝 과정에 의해 선택하였다.

[0162] 일반적으로, 효소와 같이, 단백질을 돌연변이유발시켜, 이의 구성원이 변경된 특성을 가질 수 있는 돌연변이된 단백질 구성원의 라이브러리를 수득하는 방법은 잘 확립되어 있다. 단백질을 돌연변이유발시키는 방법은 부위 지시된 돌연변이유발 및 예컨대, Hsieh & Vaisvila (2013)에 기술된 바와 같은 다른 것을 포함하며, 이의 내용은 구현 목적을 위해 참고로 본원에 포함된다.

[0163] 이러한 방법은 즉, 확립된 라이브러리가 이후 특수한 특징에 대해 스크리닝되는 경우 때때로 "지시된 발전"으로 불린다. Packer & Liu (2015)는 각각의 방법론의 개관을 제공하며, 이의 내용은 구현 목적을 위해 본원에 참고로 포함된다.

[0164] 실시예 3: 증가된 열 안정성을 지닌 효소 변이체에 대한 표현형적 스크리닝

초기 단계에서 단일 부위 포화 라이브러리 형태 또는 후속적인 단계에서 조합 아리브러리 형태의 생성된 유전적 다양성 또는 구별되는 클론을 최적화된 표현형, 즉, 증가된 열 안정성을 지닌 변이체에 대해 이들을 완전 자동화된 로보트 워크스테이션(robotic workstation)에서 고 처리량으로 수행함을 요구하도록 개조된 실시예 1b)에 기술된 바와 같은 방법을 사용하여 스크리닝하였다. 이는 항온처리 시간, 용적, 기질에서 주로 개조되었고 이러한 주요 개조는 온도 구배에 있어서 열 불활성화 프로파일에 의한 것이 아니라 단일 온도에서 항온처리 후 잔류 활성에 의한 최적화된 변이체를 선택하기 위한 것이었으며, 이러한 온도는 유전적 다양성의 평균으로부터 최적화된 변이체를 구별하기 위해 설정되었다. 서열 번호: 2로부터 2개의 위치, 3개의 위치, n개의 위치를 포함하는, 하나 이상의 아미노산 위치에서 상이한 프로테아제 변이체를 유도하였다. 적절히 반복되는 라운드의 본원에 기술된 과정을 수행하여 적용의 요구도를 만족시켰다.

[0166] 실시예 4:

[0167] 사용된 골격과 비교하여 IT50을 증가시키는 다음의 개개 돌연변이를 확인하였다. IT50을 상술한 바와 같이 분석하고 상응하는 Δ IT50에 의해 변이체를 특성화하는 사용된 골격(=N-말단 메티오닌을 결실하고 있는 야생형)의 IT50과 비교하였다. 골격은 자이모겐으로서 79.6°C $+/- 0.4^{\circ}\text{C}$ ($n = 46$)의 IT50 및 활성화된 효소로서 59°C $+/- 1^{\circ}\text{C}$ ($n= 10$)의 IT50을 갖는다.

[0168] [표 1]

서열 번호: 1에 대한 쿠마풀리진 AS 단일 아미노산 치환, 및 자이모겐 및 활성화된 효소에 대한 골격과 비교한 이들의 Δ IT50

위치	돌연변이	Δ IT50 자이모겐	Δ IT50 활성화된 효소
A190	D	1,5	0,8
T196	S	0,7	0,3
D199	E	0,5	1,0
Q202	D	0,4	-0,3
I219	L	1,1	0,8
E228	Q	0,7	0,1
A229	W	0,2	n.d.
S230	D	2,8	-0,8
A242	S	0,3	-0,4
Q244	C	0,5	-3,6
Q244	G	0,7	1,5
D251	S	0,8	-0,3
S262	C	0,9	-0,3
G266	A	1,7	0,0
E269	M	2,4	-0,1
E269	T	2,6	-0,1
E269	C	2,1	-1,1
E269	H	4,0	-0,5
E269	Q	2,0	-1,4
V274	I	1,8	1,3
G281	R	2,0	5,4
K283	L	0,6	-0,2
Y287	K	0,2	5,2
N291	T	0,7	0,5
N291	S	-0,2	1,0
D293	Y	0,8	1,0
D293	F	1,1	1,3
L297	T	1,2	0,2
T301	S	0,6	7,6
T301	C	0,8	1,0
T301	M	0,7	0,5
H305	F	0,4	-0,4
H305	W	0,1	-2,7
D306	S	0,3	-0,5
T308	C	0,5	-0,8
V314	M	0,6	0,3
V314	L	2,5	0,7
S315P	P	0,8	3,0
G320	A	3,0	-0,2
G320	Q	3,6	1,5

[0169]

G320	S	1,0	0,6
S324	L	0,1	1,3
S324	R	0,7	2,0
W325	K	-0,3	2,7
T326	R	1,7	1,2
T326	W	0,9	0,2
T326	L	1,7	1,6
T326	K	1,9	1,2
S327	F	1,2	0,6
S327	L	1,5	1,1
S327	W	2,0	1,0
A328	W	0,6	0,5
A328	D	1,3	1,1
A328	R	1,1	0,1
A328	Y	1,5	0,8
A329	Q	2,8	0,2
A329	H	2,1	0,3
A329	T	1,0	0,9
I330	L	1,1	0,8
A331	F	2,0	0,6
A331	Y	1,3	0,6
M333	I	2,5	-0,7
M333	Y	0,3	1,0
M333	L	2,4	-1,0
L338	R	-0,5	1,5
A342	R	-0,6	3,9
A351	S	1,3	-0,9
S354	E	1,6	3,3
S354	Q	2,0	0,3
D358	G	-2,0	0,7
E360	L	1,4	3,1
E360	V	2,4	2,9
E360	C	2,3	2,3
Q361	C	0,9	1,5
Q361	L	0,2	0,1
A372	S	2,4	-0,7
A378	G	1,5	1,5
A386	I	3,6	0,5
A386	L	2,7	1,3
A386	V	2,1	1,2
A386	M	1,7	0,0
G388	C	0,6	-3,5
I391	W	1,7	0,6
A392	V	2,8	0,7

[0170]

A392	L	3,0	0,9
A392	I	3,7	2,4
A392	M	2,3	2,0
Q393	S	0,9	0,2
D399	S	2,3	2,1
D402	E	0,6	1,7
R412	Q	0,5	2,4
R412	M	1,5	2,9
R412	E	1,8	4,4
R412	D	0,4	3,5
A418	W	2,8	0,2
E421	R	1,0	0,5
A423	V	1,1	0,8
A433	G	1,4	1,9
S434	G	1,9	0,7
S435	I	1,7	1,6
S435	R	1,8	0,5
S435	T	2,5	4,7
S435	V	1,6	2,1
L442	W	1,4	0,3
L442	W	-0,7	2,4
D447	S	4,0	3,2
D447	C	3,0	1,4
D447	A	1,6	1,3
A449	Y	1,7	0,7
A449	L	0,8	0,3
A449	M	1,9	-0,9
A449	E	1,6	0,4
A449	N	1,6	3,3
E453	W	2,4	0,0
E453	Y	2,6	0,7
E453	F	1,1	-0,5
V455	I	1,2	0,3
V455	L	1,8	0,7
E459	W	0,9	-0,3
A460	W	2,6	0,5
A460	R	2,0	-0,6
T461	V	1,2	0,0
T461	C	1,2	0,6
A470	V	0,6	2,3
A475	V	-0,3	3,7
A478	L	1,2	0,2
K483	A	1,5	0,7
A487	Q	0,0	1,6

[0171]

Y490	W	1,5	0,3
Q497	Y	1,8	1,2
Q497	M	0,8	0,8
Q497	D	0,3	1,0
Q497	R	0,6	0,2
V502	C	2,3	1,9
V502	T	1,5	1,6
T507	L	0,2	1,0
N510	H	2,4	7,9
A514	T	2,2	1,3
A514	Y	1,3	-1,2
A514	D	1,5	1,2
A514	S	2,4	0,5
N515	G	2,0	-0,2
R516	L	0,5	1,2
R516	E	1,1	3,5
R516	I	1,2	4,3
A517	T	1,3	3,9
A517	S	0,3	7,7
Q518	G	1,6	4,1
L540	V	0,7	0,5
Q542	H	0,9	-0,2
Q542	D	1,1	0,4
Q542	S	0,4	0,5
A548	S	0,2	n.d.
P551	N	0,9	-0,4
P551	R	0,6	0,3
P553	K	0,5	0,3
P553	L	0,8	0,2
R166	I	1,0	0,7
D265	T	1,7	n.d.

[0172]

[0173] 표 3에 나타낸 바와 같은 극 소수의 구별된 클론 및 조합 클론은 이러한 위치에서 치환을 가져서, 이의 2개 이상의 잔기가 동시에 돌연변이되는 경우, 열 안정화시 상승 효과를 이끈다.

실시예 5

[0175] 구별되는 변이체는 선택된 구별되는 돌연변이를 부위-지시된 돌연변이유발을 통해 쿠마몰리신 AS 야생형 서열내로 도입함으로써 생성시켰다. 당해 분야에 공지된 적합한 돌연변이유발 PCR 방법 및 Green & Sambrook (eds), Molecular Cloning, 4th edition에 기술된 표준 클로닝 기술, CSHL을 사용하였다. 프로테아제 효소 변이체를 바실러스 서브틸리스내에서 이종 발현 및 상술한 방법을 사용하여 표현형적으로 분석 후 특성화하였다.

[0176] 상기 제공된 실시예에서 확인되고 표 1에 요약된, 돌연변이를 조합하는 조합 라이브러리는 Yolov and Shabarova (1990)에 기술된 바와 같은 잘 공지된 PCR 방법 및 Green & Sambrook (eds), Molecular Cloning, 4th edition, CSHL에 기술된 바와 같은 표준 클로닝 기술을 사용하였다. 조합 라이브러리는 실시예 3에 기술된 바와 같이 최적화된 변이체에 대해 스크리닝하였다.

실시예 6

[0178] 표 1로부터의 2개 이상의 돌연변이를 포함하는 구별된 클론 및 조합 클론을 확인하고, IT50을 상술한 바와 같이 분석하고 상응하는 △IT50에 의해 변이체를 특성화하는 사용된 골격(=N-말단 메티오닌이 결실된 야생형)의 IT50과 비교하였다. 골격의 IT50은 변이체와 동일한 실험에서 측정하였으므로 골격의 측정된 IT50은 평균 값으로부터 약간 상이할 수 있다. 결과는 다음의 표 2a에 나타낸다(도 3은 그래프 형태의 결과를 나타낸다):

[0179]

[표 2a]

표 1로부터의 들연변이의 선택된 조합을 포함하는 구별된 클론, 및 아생형과 비교한 이들의 △IT50

#	구별된 클론 및 선택된 조합 클론내 들연변이						
1				E360L		A392V	
2			T3015	E360V	A386I		
3				E360L	A386I	A392V	
4				E360L		A392I	
5				E360V	A386I	A392I	
6			T3015	G320A	E360L		
7			T3015	E360L	A386I	A392I	
8			T3015	E360V		A392I	
9				E360V		A392V	
10				E360L	A386I		
11			T3015	E360L		A392I	
12			T3015	E360L	A386I		
13				E360L	A386I	A392I	
14				E360V		A392V	
15				E360L	A386I		
16			T3015	E360L			
17			T3015	E360L		A392V	
18			T3015	E360V	A386I		
19				E360V	A386I		
20			T3015	E360V		A392I	
21	D199E			E360V			
22				E360L	A386I		
23				E360L	A386I	A392I	
24				E360V		A392V	
25		E269T		E360V	A386I		
26			T3015	E360L		A392V	
27				E360L		A392V	
28				E360V		A392I	
29			T3015	E360L			
30				E360L	A386I	A392I	
31			T3015	E360L	A386I	A392V	
32				E360V		A392I	
33			T3015	E360L		A392I	
34				E360V			
35				E360L	A386I	A392V	
36			T3015	E360V	A386I		
37				E360L	A386I		
38			T3015	E360L	A386I	A392V	
39			T3015	E360V		A392V	
40			T3015	E360L	A386I	A392V	

[0180]

#	구별된 클론 및 선택된 조합 클론내 들연변이						
1		D447S	A449Y	A460W	V502C	N510H	
2		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
3		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
4		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
5		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
6		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
7		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
8		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
9		D447S	A449Y	E453W	A460W		N510H
10		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
11		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
12		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
13		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
14		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
15		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
16		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
17		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
18		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
19		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
20		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
21		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
22		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
23		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
24		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
25		D447S	A449Y			V502C	N510H
26		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
27		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
28		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
29		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
30		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
31		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
32		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
33		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
34		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
35		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
36		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
37		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
38		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
39		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
40		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H

[0181]

#	구별된 클론 및 선택된 조합 클론 내 품연변이			IT50 차이모건	ΔIT50 차이모건	IT50 절상 효소	ΔIT50 절상 효소
1	A517T			95,5	17,0	90,1	30,6
2	A517T			>95	>17	90,1	30,6
3	A517T			99,5	21,0	89,2	29,7
4	A517T			97,3	18,8	89,1	29,6
5	A517T			99,4	20,9	88,8	29,3
6	A517T			96,4	17,9	88,6	29,1
7	A517T			96,4	17,9	88,5	29,0
8	A517T			99,1	20,6	88,5	29,0
9	A517T	Q518G		97,8	19,3	88,5	29,0
10	A517T			98,4	19,9	88,4	28,9
11	A517T			97,7	19,2	88,4	28,9
12	A517T			98,6	20,1	88,3	28,8
13	A517T			99,5	21,0	88,2	28,7
14	A517T			>95	>17	88,2	28,7
15	A517T			98,3	19,8	88,1	28,6
16	A517T			95,8	17,3	88,0	28,5
17	A517T			97,2	18,7	88,0	28,5
18	A517T			97,6	19,1	87,8	28,3
19	A517T			98,5	20,0	87,8	28,3
20	A517T	Q518G		97,0	18,5	87,8	28,3
21	A517T			>95	>17	87,8	28,3
22	A517T			>95	>17	87,8	28,3
23	A517T			97,1	18,6	87,8	28,3
24	A517T			99,0	20,5	87,8	28,3
25	A517T			94,0	16,0	87,7	27,0
26	A517T			97,4	18,9	87,7	28,2
27	A517T	Q518G		98,0	19,5	87,7	28,2
28	A517T			>95	>17	87,6	28,1
29	A517T			96,5	18,0	87,6	28,1
30	A517T			99,0	20,2	87,5	28,0
31	A517T			98,1	19,6	87,5	28,0
32	A517T	Q518G		97,9	19,4	87,4	27,9
33	A517T			97,1	18,6	87,4	27,9
34	A517T			95,6	17,1	87,4	27,9
35	A517T			98,2	19,7	87,4	27,9
36	A517T			98,5	20,0	87,4	27,9
37	A517T	Q518G		97,9	19,4	87,4	27,9
38	A517T			>95	>17	87,3	27,8
39	A517T			96,2	17,7	87,2	27,7
40	A517T	Q518G		>95	>17	87,1	27,6

[0182]

#	구별된 클론 및 선택된 조합 클론내 품연변이					
41			T301S		E360L	A386i
42					E360V	A392i
43					E360V	A392i
44					E360L	A392v
45	D199E				E360V	
46			T301S		E360L	A386i
47	D199E	G266A			E360V	A392v
48		G266A			E360V	A392v
49			T301S		E360L	A386i
50					E360V	A386i
51					E360L	A386i
52					E360L	A386i
53	D199E	G266A			E360V	A392v
54					E360V	A392i
55	D199E	G266A	E269H		E360V	A392L
56					E360V	A386i
57					E360V	A392v
58			T301S		E360L	A386i
59	D199E				E360V	A386i
60					E360V	A386i
61	D199E				E360V	A386i
62					E360V	A386i
63	D199E	G266A		T301S	E360L	
64	D199E	G266A	E269T		G320A	E360V
65					E360L	A386i
66		G266A			E360V	A392v
67					E360L	A386i
68	D199E				E360V	
69	D199E				E360V	A386i
70	D199E				E360L	
71	D199E	G266A	E269H	T301S	E360L	
72	D199E				E360L	
73	D199E	G266A			E360V	
74	D199E	G266A	E269H		E360V	A392L
75	D199E			T301S	E360L	
76	D199E				E360V	A392i
77	D199E				E360L	
78	D199E				E360L	
79					E360V	A386i

[0183]

#	구별된 클론 및 선택된 조합 클론내 동연변이					
41	D4475	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
42	D4475	A449Y		A460W		N510H
43	D4475	A449Y	E453W		V502C	N510H
44	D4475	A449Y	E453W	A460W		N510H
45	D4475	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
46	D4475	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
47	D4475	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
48	R412E	D4475	A449Y	E453W	A460W	
49		D4475	A449Y	E453W		V502C
50		D4475	A449Y		A460W	V502C
51		D4475	A449Y	E453W		V502C
52		D4475	A449Y		A460W	V502C
53		D4475	A449Y	E453W	A460W	V502C
54		D4475	A449Y	E453W	A460W	V502C
55		D4475	A449Y	E453W	A460W	V502C
56		D4475	A449Y	E453W		V502C
57		D4475	A449Y	E453W	A460W	V502C
58		D4475	A449Y		A460W	V502C
59		D4475	A449Y			V502C
60	D4475	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
61	D4475	A449Y	E453W		V502C	N510H
62	D4475	A449Y		A460W	V502C	N510H
63	D4475	A449Y	E453W		V502C	N510H
64	D4475	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
65	D4475	A449Y			V502C	N510H
66	D4475	A449Y	E453W	A460W		
67	D4475	A449Y	E453W		V502C	N510H
68	D4475	A449Y	E453W		V502C	N510H
69	D4475	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
70	D4475	A449Y		A460W	V502C	N510H
71	D4475	A449Y	E453W		V502C	N510H
72	D4475	A449Y	E453W		V502C	N510H
73	D4475	A449Y	E453W		V502C	N510H
74	D4475	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
75	D4475	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
76	D4475	A449Y	E453W	A460W		N510H
77	D4475	A449Y	E453W		V502C	N510H
78	D4475	A449Y	E453W		V502C	N510H
79	D4475	A449Y			V502C	N510H

[0184]

#	구별된 클론 및 선택된 조합 클론		IT50 사이오겐	ΔIT50 사이오겐	IT50 활성 효소	ΔIT50 활성 효소
41	A517T	Q518G	98.4	19.9	87.0	27.5
42	A517T		92.7	14.2	86.9	27.4
43	A517T		>95	>17	86.9	27.4
44	A517T		96.9	18.4	86.8	27.3
45	A517T		93.5	15.1	86.7	26.0
46	A517T	Q518G	97.4	18.9	86.7	27.2
47	A517T	Q518G	101.5	23.0	86.6	27.1
48	A517T	Q518G	100.3	21.8	86.6	27.1
49	A517T	Q518G	>95	>17	86.6	27.1
50	A517T	Q518G	94.7	16.2	86.5	27.0
51	A517T		>95	>17	86.5	27.0
52	A517T		>95	>17	86.4	26.9
53	A517T	Q518G	P553K	102.2	23.7	86.4
54	A517T	Q518G	>95	>17	86.4	26.9
55	A517T	Q518G	P553K	101.7	23.2	86.3
56	A517T		93.1	14.6	86.2	27.0
57	A517T	Q518G	>95	>17	86.2	26.7
58	A517T	Q518G	>95	>17	86.2	26.7
59	A517T		92.2	14.1	86.1	25.4
60	A517T	Q518G	97.2	18.7	86.0	26.5
61	A517T		93.2	14.9	85.9	26.2
62	A517T		92.4	13.9	85.9	26.6
63	A517T		95.7	17.2	85.8	26.3
64	A517T	Q518G	P553K	100.1	21.6	85.8
65	A517T		94.0	15.9	85.8	25.1
66	R516I	A517T	Q518G	100.1	21.6	85.7
67		A517T		>95	>17	85.7
68		A517T	Q518G	>95	>17	85.7
69		A517T		94.9	16.6	85.4
70		A517T		-10.0	-10.0	25.7
71		A517T		95.8	17.3	85.4
72		A517T	Q518G	>95	>17	85.4
73	A517T	Q518G	>95	>17	85.4	25.9
74	A517T	Q518G	100.4	21.9	85.3	25.8
75	A517T	Q518G	>95	>17	85.3	25.8
76	A517T	Q518G	95.1	16.6	85.2	25.7
77	A517T		94.9	16.4	85.1	25.5
78	A517T		>95	>17	85.1	25.6
79	A517T		93.0	15.0	85.0	25.7

[0185]

[0186]

[표 3] 일부 바람직한 치환 및 이들의 주요 특성

G320	A	3,0	-0,2	2	186
	Q	3,6	1,5		46
	S	1,0	0,6		35
T326	R	1,7	1,2		11
	W	0,9	0,2		
	L	1,7	1,6	1	6
	K	1,9	1,2	1	1
T461	V	1,2	0,0	1	26
	C	1,2	0,6		48
Q244	C	0,5	-3,6		46
	G	0,7	1,5	1	1
D293	Y	0,8	1,0	1	24
	F	1,1	1,3		
A487	Q	0,0	1,6	1	24
V274	I	1,8	1,3		104
A372	S	2,4	-0,7		82
K283	L	0,6	-0,2		68
T308	C	0,5	-0,8		30
A418	W	2,8	0,2		12
	H	1,1	1,3		16
I391	W	1,7	0,6		21
A423	V	1,1	0,8		18
A331	F	2,0	0,6		7
	Y	1,3	0,6		9
S327	F	1,2	0,6		
	L	1,5	1,1		16
	W	2,0	1,0		
I219	L	1,1	0,8		16
M333	I	2,5	-0,7		16
A329	Q	2,8	0,2		5
	H	2,1	0,3		3
	T	1,0	0,9		7
N515	G	2,0	-0,2		13
A378	G	1,5	1,5		12
S434	G	1,9	0,7		12
E421	R	1,0	0,5	1	11
A433	G	1,4	1,9		11
S230	D	2,8	-0,8		9
Q393	S	0,9	0,2		3
D399	S	2,3	2,1		4
Y490	W	1,5	0,3		2
G281	R	2,0	5,4		

[0187]

Y287	K	0,2	5,2	
R516	I	1,2	4,3	
	E	1,1	3,5	
	L	0,5	1,2	
A475	V	-0,3	3,7	
S354	E	1,6	3,3	
S315P	P	0,8	3,0	
W325	K	-0,3	2,7	
L442	W	-0,7	2,4	
	W	1,4	0,3	
A470	V	0,6	2,3	
S324	R	0,7	2,0	
S324	L	0,1	1,3	
Q361	C	0,9	1,5	
Q361	L	0,2	0,1	
A190	D	1,5	0,8	
T196	S	0,7	0,3	
Q202	D	0,4	-0,3	
E228	Q	0,7	0,1	
A229	W	0,2	n.d.	
A242	S	0,3	-0,4	
D251	S	0,8	-0,4	
S262	C	0,9	-0,3	
N291	T	0,7	0,5	
N291	S	-0,2	1,0	
L297	T	1,2	0,2	
H305	F	0,4	-0,4	
H305	W	0,1	-2,7	
D306	S	0,3	-0,5	
V314	M	0,6	0,3	
V314	L	2,5	0,7	
A328	W	0,6	0,5	
A328	D	1,3	1,1	
A328	R	1,1	0,1	
A328	Y	1,5	0,8	
I330	L	1,1	0,8	
M333	Y	0,3	1,0	
M333	L	2,4	-1,0	
L338	R	-0,5	1,5	
A342	R	-0,6	3,9	
A351	S	1,3	-0,9	
S354	Q	2,0	0,3	
D358	G	-2,0	0,7	

[0188]

G388	C	0,6	-3,5	
D402	E	0,6	1,7	
V455	I	1,2	0,3	
V455	L	1,8	0,7	
E459	W	0,9	-0,3	
A478	L	1,2	0,2	
K483	A	1,5	0,7	
Q497	Y	1,8	1,2	
Q497	M	0,8	0,8	
Q497	D	0,3	1,0	
Q497	R	0,6	0,2	
V502	T	1,5	1,6	
T507	L	0,2	1,0	
L540	V	0,7	0,5	
Q542	H	0,9	-0,2	
Q542	D	1,1	0,4	
Q542	S	0,4	0,5	
A548	S	0,2	n.d.	
P551	N	0,9	-0,4	
P551	R	0,6	0,3	
P553	L	0,8	0,2	
R166	I	1,0	0,7	
D265	T	1,7	n.d.	

[0189]

[0190] 돌연변이가 발효 미생물 생산 시스템에서의 생산성 또는 pH-조건 또는 펩신과 같은 동물의 내인성 프로테아제에 대한 안정성으로서, 다른 효소 매개변수에 양성 또는 음성 효과를 가질 수 있음이 또한 이해되어야 한다. 저 pH에서 및 펩신의 존재하에서 공급 효소의 안정성을 시험하는 것은 공급 효소에 대한 표준이며 실시에 1e에 요약한 바와 같은 본 연구에서 수행되었다. 보다 높은 이온 강도에 대한 안정성은 고 이온 농도가 이러한 조건 하에

서 효소 안정성 및 효소 성능을 방해할 수 있고 예를 들면 위에서 발견될 수 있다고 해도 공급 효소에 대한 표준 시험이 아니다. 위에서 산의 분비 및 공급 성분은 증가된 이온 강도로 해석된다.

[0191] 도 2는 야생형이 보다 높은 이온 강도의 존재하에서 안정성 및 성능 감소의 조합된 효과로 곤란을 겪음을 나타낸다. 도 2는 또한 표 4, 변이체 1 내지 7번에 나타낸 상단 변이체에 대한 이온 강도의 효과를 나타낸다.

[0192] 고 이온 강도에서의 성능 및 안정성을 실시예 1d에 기술한 바와 같이 시험하였다. pH 프로파일은 대조군 매개변 수였으며 실시예 1f에 기술한 바와 같이 시험하였다. 트립신/키모트립신 억제제 BBI 및 KTI(보우만-버크 억제제 및 쿠니츠-형 억제제)와 같은 단백질성 항영양 인자의 소화는 실시예 1g에서 기술한 바와 같이 시험된 프로테아제의 잠재적으로 유리한 성능 특성이다.

[0193] 세부적으로 시험한 651개의 개개 조합 및 구별된 변이체로부터, 표 4는 다수의 성능 및 안정성 매개변수를 강화하는 변이체를 기술한다(도 5는 그래프 형태의 결과를 나타낸다).

[0194] 표 4에 나타낸 모든 변이체는 야생형보다 미생물 생산 시스템에서 보다 우수하거나 동등하게 잘 생산되며 실시예 1d에 기술된 바와 같이 시험한 이들의 pH 활성 프로파일에 있어서 관련 변화를 갖지 않는다. 표 4는 활성화된 효소의 열 안정성, pH/펩신 안정성 및 보다 높은 이온 강도에 대한 안정성 및 이러한 강도 하에서의 성능을 기반으로 이러한 변이체를 순위매긴다.

[0195] 가장 우수한 변이체는 기능적 트립신 억제 검정에서 시험한 바와 같이 BBI 및 KTI(보우만-버크 억제제 및 쿠니츠형 억제제)를 가수분해할 수 있으며, 이는 이러한 변이체를 이러한 변이체로 가공된 고 열 안정성 외에, 모효소(parent enzyme)로부터 이러한 변이체를 구별한다.

[0196]

[豆 4]

특별히 우수한 성능을 지닌 일부 명백한 조합들은

[0197]

다음의 표 5는 제공된 돌연변이의 바람직한 조합 및 구별된 변이체의 발생 빈도를 나타낸다. 발생 빈도는 제공된 돌연변이의 역할 및 중요성의 척도이다.

[0199]

[표 5]

돌연변이	바람직한 조합 및 영역한 변이 조성내 빌 쟁 번도		바람직한 조합 및 영역한 변이 조성내 빌 쟁 번도 (T50=38°C)	돌연변이	바람직한 조합 및 영역한 변이 조성내 빌 쟁 번도	
	(열 성화된 빌 쟁 번도)	조성내 빌 쟁 번도			변이 조성내 빌 쟁 번도	(T50=38°C)
D4475	127	D4475	365	A331F	7	
A449Y	127	A449Y	353	A331Y	9	
A517T	127	A517T	256	A329Q/H/T	15	
N510H	125	N510H	175	S435H/I	11	
E500V/L	125	E500V/L	262	V27A/I	104	
V502C	120	V502C	185	A372S	82	
E535W	92	E535W	220	K283L	66	
A514V/T	84	A514V/T	265	Q244C	46	
A460W	72	A460W	198	T380C	30	
A386I	56	A386I	178	A448W	28	
A392V/I	50	A392V/I	392	A391W	21	
I301S	44	I301S	79	A423V	18	
D199E	43	D199E	30	T376L	16	
Q518S	36	Q518S	259	I259L	16	
P553K	20	P553K	6	S327L	16	
E269T/H	12	E269T/H	33	M333I	16	
G266A	19	G266A	133	N515G	13	
D293Y	1	D293Y	24	A378G	12	
G320A	1	G320A	265	S434G	12	
R412Q	1	R412Q	74	A433G	10	
E421R	1	E421R	11	S230D	9	
A487Q	1	A487Q	24	Q395S	3	
T461V	1	T461V	26	D399S	3	
T461C	1	T461C	48	Y430W	3	

바람직한 조합 및 구별된 변이체내 체공법을 얻변이의 발생 번도
발생 번도는 제공된 돌연변이의 역할 및 중요성의 척도이다.

[0200]

[0201]

다음의 표 6은 자이모겐 또는 활성화된 형태의 ΔT_{50} 에 대한 단일 돌연변이의 영향을 나타낸다. ΔT_{50} 에 대한 단일 돌연변이의 영향의 양은 상기 돌연변이의 역할 및 중요성에 대한 척도이다.

[0202]

[표 6]

자이모전(좌측) 또는 활성화된 형태(우측)에 대한 $\Delta IT50$ 에서 단일 둘연변이의 영향
 $\Delta IT50$ 에 대한 단일 둘연변이의 영향의 양은 상기 둘연변이의 역할 및 중요성에 대한 학도이다.

둘연변이	$\Delta IT50$ 자이모전	둘연변이	$\Delta IT50$ 자이모전	둘연변이	$\Delta IT50$ 활성화된 효소	둘연변이	$\Delta IT50$ 활성화된 효소
D447S	4,8	L297T	1,2	A517S	7,7	D358G	0,7
E269H	4,0	S327F	1,2	N510H	7,6	A331Y	0,6
A392I	3,7	V455I	1,2	T301S	7,6	S327F	0,6
G320Q	3,6	T461V	1,2	G281R	5,4	T461C	0,6
A386I	3,6	T461C	1,2	Y287K	5,2	G320S	0,6
G320A	3,0	A478L	1,2	S435T	4,7	A386I	0,5
A392L	3,0	R516I	1,2	R412E	4,4	A460W	0,5
D447C	3,0	I219L	1,1	R516I	4,3	A514S	0,5
S230D	2,8	D293F	1,1	Q518G	4,1	S435R	0,5
A329Q	2,8	A328R	1,1	A517T	3,9	A190D	0,5
A392V	2,8	I330L	1,1	A475V	3,7	E421R	0,5
A418W	2,8	A423V	1,1	R516E	3,5	N291T	0,5
A386L	2,7	E453F	1,1	R412D	3,5	T301M	0,5
E269T	2,6	R516E	1,1	A342R	3,4	I540V	0,5
E453Y	2,6	Q542D	1,1	D447S	3,3	A328W	0,5
A460W	2,6	G320S	1,0	S354E	3,3	Q542S	0,5
V314L	2,5	A329T	1,0	A449N	3,3	A449E	0,4
M333I	2,5	E421R	1,0	E360L	3,1	Q542D	0,4
S435T	2,5	R166I	1,0	S315PP	3,0	A329H	0,3
E269M	2,4	V410I	1,0	E360V	2,9	S354Q	0,3
M333L	2,4	S262C	0,9	R412M	2,9	Y490W	0,3
E360V	2,4	T326W	0,9	W325K	2,7	L442W	0,3
A372S	2,4	Q361C	0,9	A392I	2,4	V455I	0,3
E453W	2,4	Q393S	0,9	R412Q	2,4	A449L	0,3
N510H	2,4	E459W	0,9	L442W	2,4	T196S	0,3
A514S	2,4	Q542H	0,9	E360C	2,3	V314M	0,3
E360C	2,3	P551N	0,9	A470V	2,3	P551R	0,3
A392M	2,3	D251S	0,8	D399S	2,1	P553K	0,3
D399S	2,3	D293Y	0,8	S435V	2,1	A329Q	0,2
V502C	2,3	T301C	0,8	A392M	2,0	A418W	0,2

[0203]

둘연변이	$\Delta IT50$ 자이모전	둘연변이	$\Delta IT50$ 자이모전	둘연변이	$\Delta IT50$ 활성화된 효소	둘연변이	$\Delta IT50$ 활성화된 효소
A514T	2,2	S315P	0,8	V502C	1,9	L297T	0,2
E269C	2,1	A449L	0,8	A433G	1,9	A478L	0,2
A329H	2,1	Q497M	0,8	S324R	1,9	T326W	0,2
A331F	2,1	P533L	0,8	D402E	1,7	Q393S	0,2
A386V	2,1	T196S	0,7	T326L	1,6	P553L	0,2
E269Q	2,0	E228Q	0,7	S435I	1,6	Q497R	0,2
G281R	2,0	Q244G	0,7	V502T	1,6	A331F	0,1
S327W	2,0	N291T	0,7	A487Q	1,6	A328R	0,1
S354Q	2,0	T301M	0,7	G320Q	1,5	E228Q	0,1
A460R	2,0	L540V	0,7	A378G	1,5	Q361L	0,1
N515G	2,0	K283L	0,6	Q361C	1,5	E453W	0
T326K	1,9	T301S	0,6	Q244G	1,5	G266A	0
S434G	1,9	V314M	0,6	L338R	1,5	A386M	0
A449M	1,9	S324R	0,6	D447C	1,4	I391W	0
V274I	1,8	A328W	0,6	A386L	1,3	T461V	0
R412E	1,8	G388C	0,6	A514T	1,3	E269T	-0,1
S435R	1,8	D402E	0,6	V274I	1,3	E269M	-0,1
V455L	1,8	A470V	0,6	D447A	1,3	Q542H	-0,1
Q497Y	1,8	Q497R	0,6	D293F	1,3	G320A	-0,2
G266A	1,7	P551R	0,6	S324L	1,3	N515G	-0,2
T326R	1,7	D199E	0,5	A386V	1,2	K283L	-0,2
T326L	1,7	Q244C	0,5	T326K	1,2	S262C	-0,3
A386M	1,7	T308C	0,5	Q497Y	1,2	E459W	-0,3
I391W	1,7	R412Q	0,5	T326R	1,2	D251S	-0,3
S435I	1,7	R516L	0,5	A514D	1,2	Q202D	-0,3
A449Y	1,7	P553K	0,5	R516L	1,2	P551N	-0,4
D265T	1,7	Q202D	0,4	S327L	1,1	H305E	-0,4
S354E	1,6	H305F	0,4	A328D	1,1	A242S	-0,4
S435V	1,6	R412D	0,4	S327W	1,0	E269H	-0,5
D447A	1,6	Q542S	0,4	D293Y	1,0	E453F	-0,5
A449E	1,6	A242S	0,3	T301C	1,0	D306S	-0,5
A449N	1,6	D306S	0,3	D199E	1,0	A460R	-0,6
Q518G	1,6	M333Y	0,3	M333Y	1,0	M333I	-0,7
A190D	1,5	Q497D	0,3	Q497D	1,0	A372S	-0,7
S327L	1,5	A517S	0,3	T507L	1,0	S230D	-0,8
A328Y	1,5	A229W	0,2	N291S	1,0	T308C	-0,8
A378G	1,5	Y287K	0,2	A392L	0,9	A449M	-0,9

[0204]

돌연변이	$\Delta T 50$ 자이오겐	돌연변이	$\Delta T 50$ 자이오겐
R4 12M	1,5	Q361L	0,2
K483A	1,5	T507L	0,2
Y490W	1,5	A548S	0,2
A514D	1,5	S324L	0,1
E360L	1,4	A487Q	0
A433G	1,4	N291S	-0,2
L442W	1,4	W325K	-0,3
A328D	1,3	A475V	-0,3
A331Y	1,3	L338R	-0,5
A351S	1,3	A342R	-0,6
A514Y	1,3	L442W	-0,7
A517T	1,3	D358G	-2

돌연변이	$\Delta T 50$ 활성화된 효소	돌연변이	$\Delta T 50$ 활성화된 효소
A329T	0,9	A351S	-0,9
V455L	0,8	M333L	-1,0
A328Y	0,8	E269C	-1,1
I330L	0,8	E269Q	-1,4
A423V	0,8	H305W	-2,7
Q497M	0,8	G388C	-3,5
A392V	0,7	Q244C	-3,6
E453Y	0,7	D265T	n.d.
V314L	0,7	R166I	n.d.
S434G	0,7	V410I	n.d.
A449Y	0,7	A229W	n.d.
K483A	0,7	A548S	n.d.

[0205]

[0206]

표 1 및 표 6의 일부 돌연변이가 상호교환적으로 사용되어 쿠마몰리신 As내 열안정성을 가공할 수 있음이 또한 이해되어야 한다. 표 7은 표 7의 변이체 1번을 기반으로 한 변이체의 세트를 나타낸다. 가공 과정에서 502 및 510번 위치에서의 돌연변이는 극도의 산성 pH인, pH 2 이하에서 활성이 변하는 것으로 여겨진다.

[0207]

502 및 510번에서 돌연변이의 배제는 예를 들면, 클론 1번과 비교하여 열 안정성에 있어서 7, 8°C 감소를 갖는 표 7, 클론 2번에서와 같이, 활성화된 효소에 대한 표적화된 열 안정성 이하로 열안정성을 유의적으로 감소시켰다. 502 및 510의 효과에 대해 보상하기 위해 구별된 변이체의 세트를 표 1 및 6에서 확인되고 나타낸 돌연변이의 장점을 취하는 합리적인 방식으로 작제하였다. D399S 치환을 제외하고는 502 및 510에서 돌연변이의 효과를 점진적으로 또는 충분히 보상할 수 있다.

[0208]

[표 7]

#	구별된 클론 및 선택된 조합	클론 내 돌연변이	R1(R2)	50°C 활성화된 효소
1	G266A	E360V / A352V	D447S / A487Y	E480W / V502C
2	G266A	E360V / A352V	D447S / A487Y	E480W / V502C
3	G266A	E360V / A352V	R412E / A487Y	E480W / V502C
4	G266A	E360V / A352V	R412D / A487Y	E480W / V502C
5	G266A	E360V / A352V	R413Q / A487Y	E480W / V502C
6	G266A	E360V / A352V	A436G / A487Y	E480W / V502C
7	G266A	E360V / A352V	A436G / A487Y	E480W / V502C
8	G266A	E360V / A352V	T326I / A487Y	E480W / V502C
9	G266A	E360V / A352V	R412M / A487Y	E480W / V502C
10	G266A	E360V / A352V	S433T / A487Y	E480W / V502C
11	G266A	E360V / A352V	A367V / A487Y	E480W / V502C
12	G266A	E360V / A352V	T326K / A487Y	E480W / V502C
13	G266A	E360V / A352V	A436G / A487Y	E480W / V502C
14	G266A	E360V / A352V	A436G / A487Y	E480W / V502C
15	G266A	E360V / A352V	S433W / A487Y	E480W / V502C
16	G266A	E360V / A352V	D399S / A487Y	E480W / V502C

변이체 1번을 기본으로 한 변이체의 세트

[0209]

[0210]

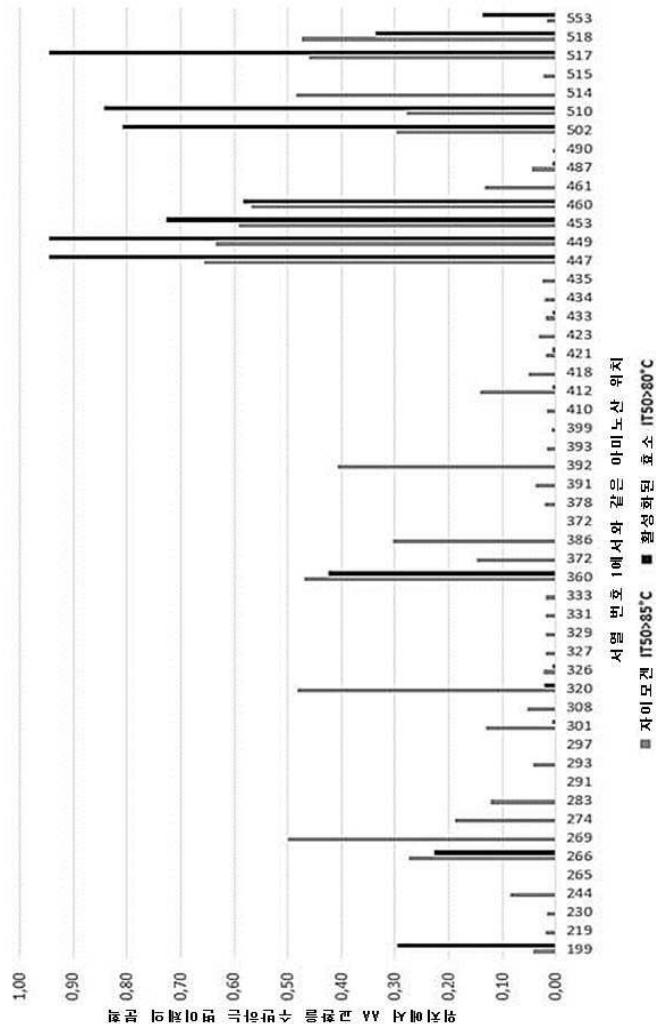
참고 문헌:

- Wlodawer Al., Li M, Gustchina A, Oyama H, Dunn BM, Oda K., Acta Biochim Pol. 2003;50(1):81-102
 Terashita J., Oda.K., Kojo.M. & Murao.S., Agric Biol Chem (1981) 45, 1937-1943
 Oda.K., Takahashi.S., Ito.M. & Dunn.B.M., Adv Exp Med Biol (1998) 436, 349-353
 Packer & Liu, Methods for the directed evolution of proteins. Nature Reviews Genetics 16, 379-394 (2015)
 Hsieh & Vaisvila, Protein engineering: single or multiple site-directed mutagenesis. Methods Mol Biol. 2013;978:173-86
 Cadwell and Joyce, Mutagenic PCR. PCR Methods Appl. 3, 1994, 136-140
 Okubo et al, 2006 Jun;273(1):2563-76.

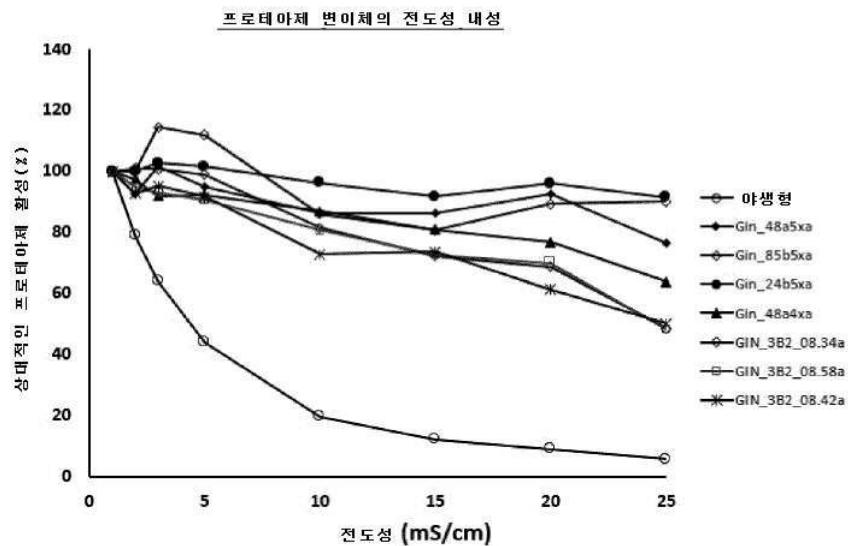
[0211]

도면

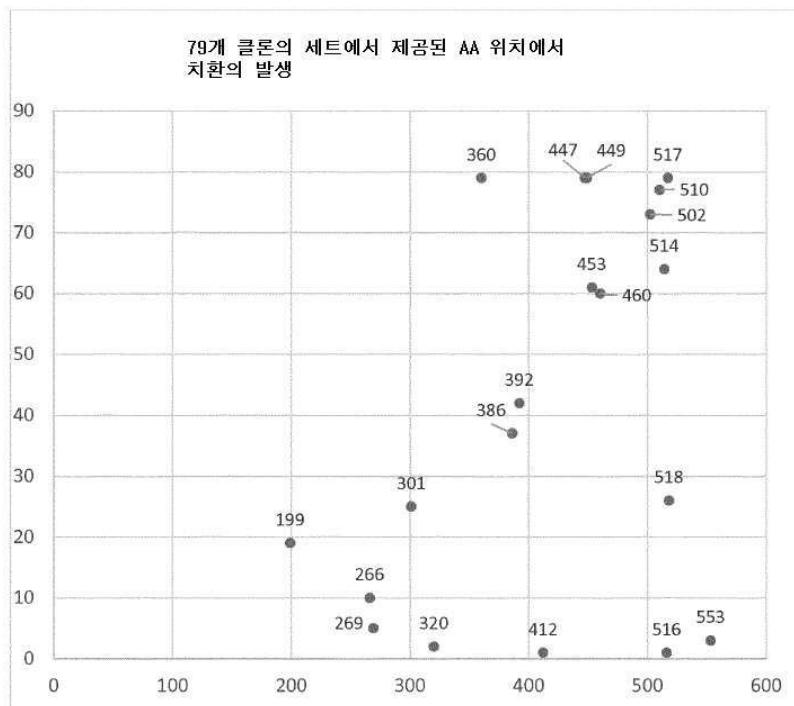
도면1



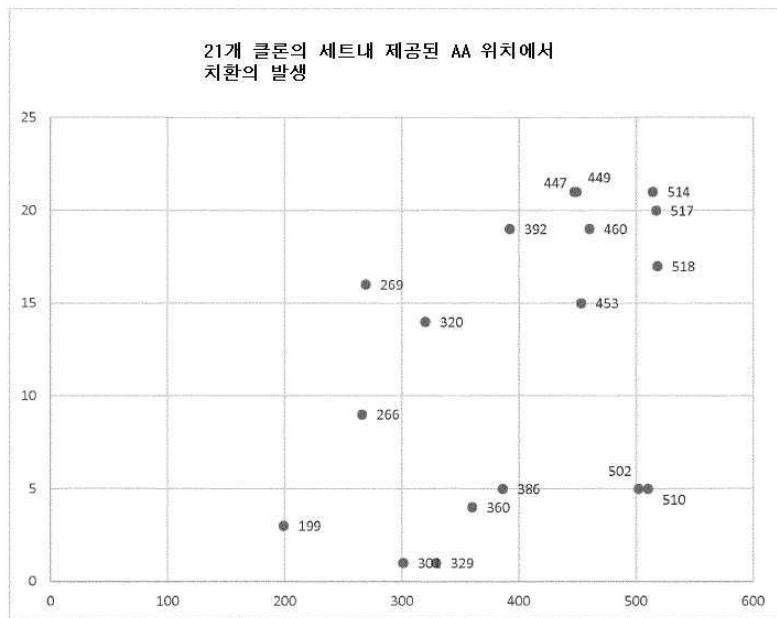
도면2



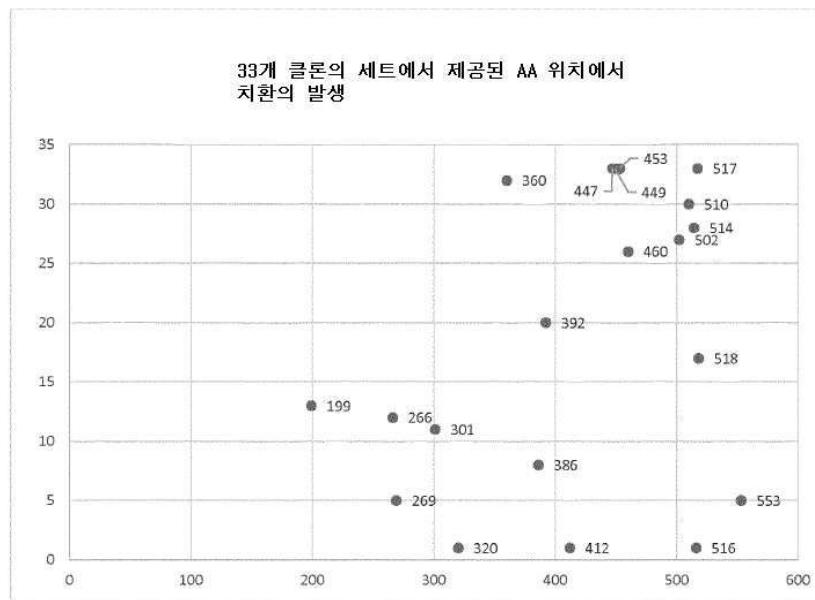
도면3



도면4



도면5



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ew nutrition

<120> Stable protease variants

<130> ED41048

<140> 16206367.1 - 1410

<141> 22.12.2016

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 552

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Kumamolisin 1 proenzyme, backbone variant (N-terminal M is lacking)

<400> 1

Ser Asp Met Glu Lys Pro Trp Lys Glu Gly Glu Glu Ala Arg Ala Val

1 5 10 15

Leu Gln Gly His Ala Arg Ala Gln Ala Pro Gln Ala Val Asp Lys Gly

20 25 30

Pro Val Ala Gly Asp Glu Arg Met Ala Val Thr Val Val Leu Arg Arg

35 40 45

Gln Arg Ala Gly Glu Leu Ala Ala His Val Glu Arg Gln Ala Ala Ile

50 55 60

Ala Pro His Ala Arg Glu His Leu Lys Arg Glu Ala Phe Ala Ala Ser

65 70 75 80

His Gly Ala Ser Leu Asp Asp Phe Ala Glu Leu Arg Arg Phe Ala Asp

85 90 95

Ala His Gly Leu Ala Leu Asp Arg Ala Asn Val Ala Ala Gly Thr Ala

100 105 110

Val Leu Ser Gly Pro Val Asp Ala Ile Asn Arg Ala Phe Gly Val Glu

115 120 125

Leu Arg His Phe Asp His Pro Asp Gly Ser Tyr Arg Ser Tyr Leu Gly

130 135 140

Glu Val Thr Val Pro Ala Ser Ile Ala Pro Met Ile Glu Ala Val Leu

145 150 155 160

Gly Leu Asp Thr Arg Pro Val Ala Arg Pro His Phe Arg Met Gln Arg

165 170 175

Arg Ala Glu Gly Gly Phe Glu Ala Arg Ser Gln Ala Ala Ala Pro Thr

180	185	190
Ala Tyr Thr Pro Leu Asp Val Ala Gln Ala Tyr Gln Phe Pro Glu Gly		
195	200	205
Leu Asp Gly Gln Gly Gln Cys Ile Ala Ile Ile Glu Leu Gly Gly		
210	215	220
Tyr Asp Glu Ala Ser Leu Ala Gln Tyr Phe Ala Ser Leu Gly Val Pro		
225	230	235
Ala Pro Gln Val Val Ser Val Ser Val Asp Gly Ala Ser Asn Gln Pro		
245	250	255
Thr Gly Asp Pro Ser Gly Pro Asp Gly Glu Val Glu Leu Asp Ile Glu		
260	265	270
Val Ala Gly Ala Leu Ala Pro Gly Ala Lys Phe Ala Val Tyr Phe Ala		
275	280	285
Pro Asn Thr Asp Ala Gly Phe Leu Asp Ala Ile Thr Thr Ala Ile His		
290	295	300
Asp Pro Thr Leu Lys Pro Ser Val Val Ser Ile Ser Trp Gly Gly Pro		
305	310	315
Glu Asp Ser Trp Thr Ser Ala Ala Ile Ala Ala Met Asn Arg Ala Phe		
325	330	335
Leu Asp Ala Ala Ala Leu Gly Val Thr Val Leu Ala Ala Ala Gly Asp		
340	345	350
Ser Gly Ser Thr Asp Gly Glu Gln Asp Gly Leu Tyr His Val Asp Phe		
355	360	365
Pro Ala Ala Ser Pro Tyr Val Leu Ala Cys Gly Gly Thr Arg Leu Val		
370	375	380
Ala Ser Gly Gly Arg Ile Ala Gln Glu Thr Val Trp Asn Asp Gly Pro		
385	390	395
Asp Gly Gly Ala Thr Gly Gly Val Ser Arg Ile Phe Pro Leu Pro		
405	410	415
Ala Trp Gln Glu His Ala Asn Val Pro Pro Ser Ala Asn Pro Gly Ala		
420	425	430

Ser Ser Gly Arg Gly Val Pro Asp Leu Ala Gly Asn Ala Asp Pro Ala
 435 440 445

Thr Gly Tyr Glu Val Val Ile Asp Gly Glu Ala Thr Val Ile Gly Gly
 450 455 460

Thr Ser Ala Val Ala Pro Leu Phe Ala Ala Leu Val Ala Arg Ile Asn

465 470 475 480

Gln Lys Leu Gly Lys Ala Val Gly Tyr Leu Asn Pro Thr Leu Tyr Gln
 485 490 495

Leu Pro Ala Asp Val Phe His Asp Ile Thr Glu Gly Asn Asn Asp Ile
 500 505 510

Ala Asn Arg Ala Gln Ile Tyr Gln Ala Gly Pro Gly Trp Asp Pro Cys
 515 520 525

Thr Gly Leu Gly Ser Pro Ile Gly Val Arg Leu Leu Gln Ala Leu Leu

530 535 540

Pro Ser Ala Ser Gln Pro Gln Pro

545 550

<210> 2

<211> 587

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Kumamolisin 1 proenzyme backbone variant with leader sequence and
 His tag

<400> 2

Met Asn Ile Lys Lys Phe Ala Lys Gln Ala Thr Val Leu Thr Phe Thr
 1 5 10 15

Thr Ala Leu Leu Ala Gly Ala Thr Gln Ala Phe Ala Ser Asp Met
 20 25 30

Glu Lys Pro Trp Lys Glu Gly Glu Glu Ala Arg Ala Val Leu Gln Gly
 35 40 45

His Ala Arg Ala Gln Ala Pro Gln Ala Val Asp Lys Gly Pro Val Ala
 50 55 60

Gly Asp Glu Arg Met Ala Val Thr Val Val Leu Arg Arg Gln Arg Ala

65	70	75	80
----	----	----	----

Gly Glu Leu Ala Ala His Val Glu Arg Gln Ala Ala Ile Ala Pro His

85	90	95
----	----	----

Ala Arg Glu His Leu Lys Arg Glu Ala Phe Ala Ala Ser His Gly Ala

100	105	110
-----	-----	-----

Ser Leu Asp Asp Phe Ala Glu Leu Arg Arg Phe Ala Asp Ala His Gly

115	120	125
-----	-----	-----

Leu Ala Leu Asp Arg Ala Asn Val Ala Ala Gly Thr Ala Val Leu Ser

130	135	140
-----	-----	-----

Gly Pro Val Asp Ala Ile Asn Arg Ala Phe Gly Val Glu Leu Arg His

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Phe Asp His Pro Asp Gly Ser Tyr Arg Ser Tyr Leu Gly Glu Val Thr

165	170	175
-----	-----	-----

Val Pro Ala Ser Ile Ala Pro Met Ile Glu Ala Val Leu Gly Leu Asp

180	185	190
-----	-----	-----

Thr Arg Pro Val Ala Arg Pro His Phe Arg Met Gln Arg Arg Ala Glu

195	200	205
-----	-----	-----

Gly Gly Phe Glu Ala Arg Ser Gln Ala Ala Ala Pro Thr Ala Tyr Thr

210	215	220
-----	-----	-----

Pro Leu Asp Val Ala Gln Ala Tyr Gln Phe Pro Glu Gly Leu Asp Gly

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Gln Gly Gln Cys Ile Ala Ile Ile Glu Leu Gly Gly Tyr Asp Glu

245	250	255
-----	-----	-----

Ala Ser Leu Ala Gln Tyr Phe Ala Ser Leu Gly Val Pro Ala Pro Gln

260	265	270
-----	-----	-----

Val Val Ser Val Ser Val Asp Gly Ala Ser Asn Gln Pro Thr Gly Asp

275	280	285
-----	-----	-----

Pro Ser Gly Pro Asp Gly Glu Val Glu Leu Asp Ile Glu Val Ala Gly

290	295	300
-----	-----	-----

Ala Leu Ala Pro Gly Ala Lys Phe Ala Val Tyr Phe Ala Pro Asn Thr

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

Asp Ala Gly Phe Leu Asp Ala Ile Thr Thr Ala Ile His Asp Pro Thr
 325 330 335
 Leu Lys Pro Ser Val Val Ser Ile Ser Trp Gly Gly Pro Glu Asp Ser
 340 345 350

Trp Thr Ser Ala Ala Ile Ala Ala Met Asn Arg Ala Phe Leu Asp Ala
 355 360 365
 Ala Ala Leu Gly Val Thr Val Leu Ala Ala Ala Gly Asp Ser Gly Ser
 370 375 380
 Thr Asp Gly Glu Gln Asp Gly Leu Tyr His Val Asp Phe Pro Ala Ala
 385 390 395 400
 Ser Pro Tyr Val Leu Ala Cys Gly Gly Thr Arg Leu Val Ala Ser Gly
 405 410 415

Gly Arg Ile Ala Gln Glu Thr Val Trp Asn Asp Gly Pro Asp Gly Gly
 420 425 430
 Ala Thr Gly Gly Val Ser Arg Ile Phe Pro Leu Pro Ala Trp Gln
 435 440 445
 Glu His Ala Asn Val Pro Pro Ser Ala Asn Pro Gly Ala Ser Ser Gly
 450 455 460
 Arg Gly Val Pro Asp Leu Ala Gly Asn Ala Asp Pro Ala Thr Gly Tyr
 465 470 475 480

Glu Val Val Ile Asp Gly Glu Ala Thr Val Ile Gly Gly Thr Ser Ala
 485 490 495
 Val Ala Pro Leu Phe Ala Ala Leu Val Ala Arg Ile Asn Gln Lys Leu
 500 505 510
 Gly Lys Ala Val Gly Tyr Leu Asn Pro Thr Leu Tyr Gln Leu Pro Ala
 515 520 525
 Asp Val Phe His Asp Ile Thr Glu Gly Asn Asn Asp Ile Ala Asn Arg
 530 535 540

Ala Gln Ile Tyr Gln Ala Gly Pro Gly Trp Asp Pro Cys Thr Gly Leu
 545 550 555 560
 Gly Ser Pro Ile Gly Val Arg Leu Leu Gln Ala Leu Leu Pro Ser Ala

565 570 575

Ser Gln Pro Gln Pro His His His His His His

580 585

<210> 3

<211> 364

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> activated Kumamolisin 1, backbone variant

<400> 3

Ala Ala Pro Thr Ala Tyr Thr Pro Leu Asp Val Ala Gln Ala Tyr Gln

1 5 10 15

Phe Pro Glu Gly Leu Asp Gly Gln Gly Gln Cys Ile Ala Ile Ile Glu

20 25 30

Leu Gly Gly Gly Tyr Asp Glu Ala Ser Leu Ala Gln Tyr Phe Ala Ser

35 40 45

Leu Gly Val Pro Ala Pro Gln Val Val Ser Val Ser Val Asp Gly Ala

50 55 60

Ser Asn Gln Pro Thr Gly Asp Pro Ser Gly Pro Asp Gly Glu Val Glu

65 70 75 80

Leu Asp Ile Glu Val Ala Gly Ala Leu Ala Pro Gly Ala Lys Phe Ala

85 90 95

Val Tyr Phe Ala Pro Asn Thr Asp Ala Gly Phe Leu Asp Ala Ile Thr

100 105 110

Thr Ala Ile His Asp Pro Thr Leu Lys Pro Ser Val Val Ser Ile Ser

115 120 125

Trp Gly Gly Pro Glu Asp Ser Trp Thr Ser Ala Ala Ile Ala Ala Met

130 135 140

Asn Arg Ala Phe Leu Asp Ala Ala Leu Gly Val Thr Val Leu Ala

145 150 155 160

Ala Ala Gly Asp Ser Gly Ser Thr Asp Gly Glu Gln Asp Gly Leu Tyr

165 170 175

His Val Asp Phe Pro Ala Ala Ser Pro Tyr Val Leu Ala Cys Gly Gly

180	185	190
Thr Arg Leu Val Ala Ser Gly Gly Arg Ile Ala Gln Glu Thr Val Trp		
195	200	205
Asn Asp Gly Pro Asp Gly Gly Ala Thr Gly Gly Val Ser Arg Ile		
210	215	220
Phe Pro Leu Pro Ala Trp Gln Glu His Ala Asn Val Pro Pro Ser Ala		
225	230	235
Asn Pro Gly Ala Ser Ser Gly Arg Gly Val Pro Asp Leu Ala Gly Asn		
245	250	255
Ala Asp Pro Ala Thr Gly Tyr Glu Val Val Ile Asp Gly Glu Ala Thr		
260	265	270
Val Ile Gly Gly Thr Ser Ala Val Ala Pro Leu Phe Ala Ala Leu Val		
275	280	285
Ala Arg Ile Asn Gln Lys Leu Gly Lys Ala Val Gly Tyr Leu Asn Pro		
290	295	300
Thr Leu Tyr Gln Leu Pro Ala Asp Val Phe His Asp Ile Thr Glu Gly		
305	310	315
Asn Asn Asp Ile Ala Asn Arg Ala Gln Ile Tyr Gln Ala Gly Pro Gly		
325	330	335
Trp Asp Pro Cys Thr Gly Leu Gly Ser Pro Ile Gly Val Arg Leu Leu		
340	345	350
Gln Ala Leu Leu Pro Ser Ala Ser Gln Pro Gln Pro		
355	360	
<210> 4		
<211> 553		
<212> PRT		
<213> Alicyclobacillus sendaiensis		
<400> 4		
Met Ser Asp Met Glu Lys Pro Trp Lys Glu Gly Glu Glu Ala Arg Ala		
1	5	10
Val Leu Gln Gly His Ala Arg Ala Gln Ala Pro Gln Ala Val Asp Lys		

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

Glu Val Ala Gly Ala Leu Ala Pro Gly Ala Lys Phe Ala Val Tyr Phe
 275 280 285
 Ala Pro Asn Thr Asp Ala Gly Phe Leu Asp Ala Ile Thr Thr Ala Ile
 290 295 300
 His Asp Pro Thr Leu Lys Pro Ser Val Val Ser Ile Ser Trp Gly Gly
 305 310 315 320
 Pro Glu Asp Ser Trp Thr Ser Ala Ala Ile Ala Ala Met Asn Arg Ala
 325 330 335

Phe Leu Asp Ala Ala Ala Leu Gly Val Thr Val Leu Ala Ala Ala Gly
 340 345 350
 Asp Ser Gly Ser Thr Asp Gly Glu Gln Asp Gly Leu Tyr His Val Asp
 355 360 365
 Phe Pro Ala Ala Ser Pro Tyr Val Leu Ala Cys Gly Gly Thr Arg Leu
 370 375 380
 Val Ala Ser Gly Gly Arg Ile Ala Gln Glu Thr Val Trp Asn Asp Gly
 385 390 395 400

Pro Asp Gly Gly Ala Thr Gly Gly Val Ser Arg Ile Phe Pro Leu
 405 410 415
 Pro Ala Trp Gln Glu His Ala Asn Val Pro Pro Ser Ala Asn Pro Gly
 420 425 430
 Ala Ser Ser Gly Arg Gly Val Pro Asp Leu Ala Gly Asn Ala Asp Pro
 435 440 445
 Ala Thr Gly Tyr Glu Val Val Ile Asp Gly Glu Ala Thr Val Ile Gly
 450 455 460

Gly Thr Ser Ala Val Ala Pro Leu Phe Ala Ala Leu Val Ala Arg Ile
 465 470 475 480
 Asn Gln Lys Leu Gly Lys Ala Val Gly Tyr Leu Asn Pro Thr Leu Tyr
 485 490 495
 Gln Leu Pro Ala Asp Val Phe His Asp Ile Thr Glu Gly Asn Asn Asp
 500 505 510
 Ile Ala Asn Arg Ala Gln Ile Tyr Gln Ala Gly Pro Gly Trp Asp Pro

515

520

525

Cys Thr Gly Leu Gly Ser Pro Ile Gly Val Arg Leu Leu Gln Ala Leu

530

535

540

Leu Pro Ser Ala Ser Gln Pro Gln Pro

545

550

<210> 5

<211> 29

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> sacB signal peptide

<400> 5

Met Asn Ile Lys Lys Phe Ala Lys Gln Ala Thr Val Leu Thr Phe Thr

1

5

10

15

Thr Ala Leu Leu Ala Gly Gly Ala Thr Gln Ala Phe Ala

20

25