



(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 누트리쥬온 게엠베하  
독일 비스백 (우편번호 49429) 호젠비겐1  
(72) 발명자  
미헬스, 안드레아스  
독일 40237 뒤셀도르프 린데만 스트라쎄 110  
샤이디그, 안드레아스  
독일 26810 베스트벌레딩겐 아이드너 스트라쎄 16  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
인비전 특허법인

전체 청구항 수 : 총 19 항

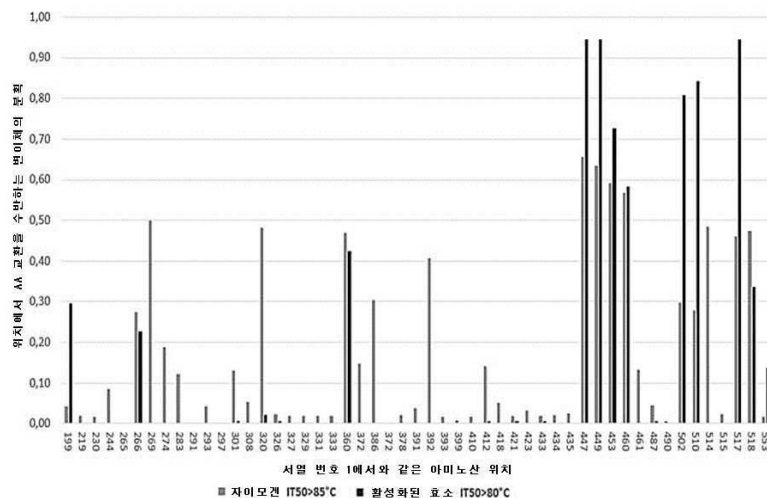
심사관 : 한지혜

(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 서플드 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.

대표도



(52) CPC특허분류

**C11D 3/386** (2022.08)

**C12Y 304/21** (2013.01)

(72) 발명자

**이렌드, 크리스티안**

독일 50829 쾰른 인겐도르퍼 베그 73

**크랍, 클라우디아**

독일 50677 쾰른 로트링거 스트라쎄 25

---

**혼, 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 자이모겐 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  $\geq 5$ 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℃ 내지 100℃의 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

[0014] **발명의 요지**

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

[0016] **발명의 구현예**

[0017] 본 발명을 상세히 기술하기 전에, 본 발명은 기술된 장치 또는 조성물 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. 특징의 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 나타난 다른 구현예와 관련하여 또한 개시됨을 의미한다. 하나의 경우에, 특징의 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 골격(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 골격과 비교하여 변경되거나 개선된 안정성을 나타낸다.

[0023] 용어 "셔플드 변이체"는 이러한 단편 또는 분획과 다른 상동성 효소로부터의 하나 이상의 단편의 조합이 단백질분해 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 트리펩티달-펩티다제를 포함하는, S53(MEROPS 수탁 번호 MER000995, 또한 Wlodawer et al, 2003 참고)으로 불리는, 세돌리신 계열의 펩티다제로부터의 산 프로테아제를

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

- [0028] 세둘리신의 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] 세둘리신은 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] 세둘리신의 단백질 폴드(protein fold)는 서브틸리신의 것과 밀접하게 관련되어 있으며, 그룹 둘 다는 때때로 세린 프로테아제로 불린다. 그러나, 세둘리신은 추가의 루프를 갖는다. 아미노산 서열은 서브틸리신과는 밀접하게 유사하지 않으며, 이는 명확히 상이한 활성 부위 잔기 및 최대 활성화에 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 서플드 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 서플드 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, L442W, 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 서플드 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  $\Delta$ IT50을 유발하므로, 바람직하지만, 다른 것은 표 2a, 2b 및 4의 조합적 및 구별되는 클론, 및 일부 조합에 있어서 높은 발생율을 가지고, 높은 전체적인  $\Delta$ 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 서플드 변이체일 수 있음을 주목한다. 이러한 경우에, 돌연변이체 잔기의 번호매김이 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 2개 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:
- [0096] a) 360, 447, 449 및 510
- [0097] b) 447, 449 및 514, 및/또는
- [0098] 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  $\geq 75$  내지  $\leq 105^{\circ}\text{C}$ 의 IT50을 갖는다.
- [0101] 일부 구현예에서, 활성화된 효소의 경우  $\geq 70$  내지  $\leq 90^{\circ}\text{C}$ 의 IT50이 제공되지만, 자이모겐의 경우  $\geq 80$  내지  $\leq 105^{\circ}\text{C}$ 의 IT50이 제공된다.
- [0102] 쿠마몰리신 AS 야생형 효소는 자이모겐, 즉 불활성 자이모겐으로서, 및 활성화된 효소로서  $59^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  ( $n = 10$ )의 IT50을 갖는다. 본 명세서의 과정에서, 상이한 변이체는 이들의 IT50, 또는  $\Delta\text{IT50}$ (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:
- [0105] a) 상기 숙주 세포를 배양하는 단계, 및
- [0106] b) 상기 숙주 세포로부터 프로테아제 또는 프로테아제 변이체를 분리하거나, 배지로부터 프로테아제 또는 프로테아제 변이체를 수거하는 단계를 포함한다.
- [0107] 본 발명의 다른 구현예에 따라서, 상기 설명에 따른 프로테아제 변이체를 포함하는 조성물이 제공되며, 이러한 조성물은  $\geq 5$ 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 소화 유해한 단백질생성 화합물(proteinogenic compound)을 분해하는 것을 돕는다.

- [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 피사 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 피사 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

### [0135] 실험 및 도면

본 발명은 도면 및 기술한 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 MNIKKFAKQATVLTFTTA LLAGGATQAF A.

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	GEEF <del>24</del> AVLQG	HARQAAPQAV	DKGPVAGDER	MAVTTVLRRQ	RAGELAAHVE	60
RQAAIAPHAR	EHKREAFAA	SHGASLDDFA	ELRRFADAHG	LALDRANVAA	GTAVLSGPVD	120
AINRAFGVEL	RHFDHPDGSY	RSYLGEVTVP	ASIAPMIEAV	LGLDTRPVAR	PHFRMQRRAE	180
GGFEARSQAA	APTAYTPLDV	AQAYQFPEGL	DGQGQCIAI	ELGGGYDEAS	LAQYFASLGV	240
PAPQVVSVS	DGASNQPTGD	PSGPDGEVEL	DIEVAGALAP	GAKFAVYFAP	NTDAGFLDAI	300
TTAIHDPTLK	PSVVSISWGG	PEDSWTSAAI	AAMNRAFLDA	AALGVTVLAA	AGDSGSTDGE	360
QDGLYHVDF	AASPYVLACG	GTRLVASGGR	IAQETVWNDG	PDGGATGGGV	SRI FPLPAWQ	420
EHANVPPSAN	PGAS SGRGVP	DLAGNADPAT	GYEVVI DGEA	TVIGGTSAVA	PLFAALVARI	480
NQKLKAVGY	LNPTLYQLPA	DVFHDI TEGN	NDIANRAQIY	QAGPGWDPCT	GLGS PIGVRL	540
LQALLPSASQ	PQP	553				

프로펩타이드는 회색으로 음영처리되어 있다. 측매 트리아드 SED(=Ser/Glu/Asp)는 이탤릭체로 나타낸, E267, D271 및 S467로 이루어진다. 본 발명자가 변경된/개선했던 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.

MNIKKFAKQA	TVLTFTTALL	AGGATQAFAS	DMEKPWKEGE	EARAVLQGH	RAQAPQAVDK	60
GPVAGDERMA	VTTVLRRQRA	GELAAHVERQ	AAIAPHAREH	LKREAF AASH	GASLDDFAEL	120
RRFADAHGLA	LDRANVAAGT	AVLSGPVDAI	NRAFGVELRH	FDHPDGSYRS	YLGEVTVPAS	180
IAPMIEAVLG	LDTRPVARPH	FRMQRRAE	GG	FEARSQAAAP	TAYTPLDVAQ	240
QQQCIAI IEL	GGGYDEASLA	QYFASLG VPA	PQVVSVSVDG	ASNQPTGDPS	GPDGEVELDI	300
EVAGALAPGA	KFAVYFAPNT	DAGFLDAITT	AIHDPTLKPS	VVSISWGGPE	DSWTSAAIAA	360
MNRAFLDAAA	LGVTVLAAAG	DSGSTDGEQD	GLYHVDFPAA	SPYVLACGGT	RLVASGGRIA	420
QETVWNDGPD	GGATGGGVSR	IFPLPAWQEH	ANVPPSANPG	ASSGRGV PDL	AGNADPATGY	480
EVVIDGEATV	IGGTSAVAPL	FAALVARINQ	KLKAVGYLN	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:

AAPTAYTPLD	VAQAYQFPEG	LDGQGQCIAI	IELGGGYDEA	SLAQYFASLG	VPAPQVVSVS	60
VDGASNQPTG	DPSGPDGEVE	LDIEVAGALA	PGAKFAVYFA	PNTDAGFLDA	ITTAIHDPTL	120
KPSVVSISWG	GPEDSWTSAA	IAAMNRAFLD	AAALGVTVLA	AAGDSGSTDG	EQDGLYHVDF	180
PAASPYVLAC	GGTRLVASGG	RIAQETVWND	GPDGGATGGG	VSRI FPLPAW	QEHANVPPSA	240
NPGASSGRGV	PDLAGNADPA	TGYEVVIDGE	ATVIGGTSAV	APLFAALVAR	INQKLKAVG	300
YLNPTLYQLP	ADVFDH DITEG	NNDIANRAQI	YQAGPGWDPC	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:

MSDMEKPKWE	GEEARAVLQG	HARAQAPQAV	DKGPVAGDER	MAVTTVLRRQ	RAGELAAHVE	60
RQAAIAPHAR	EHLKREAFAA	SHGASLDDFA	ELRRFADAHG	LALDRANVAA	GTAVLSGPVD	120
AINRAFGVEL	RHFDHPDGSY	RSYLGEVTVP	ASIAPMIEAV	LGLDTRPVAR	PHFRMQRRAE	180
GGFEARSQAA	APTAYTPLDV	AQAYQFPEGL	DGQGQCIAI	I ELGGGYDEAS	LAQYFASLGV	240
PAPQVVSVS	DGASNQPTGD	PSGPDGEVEL	DIEVAGALAP	GAKFAVYFAP	NTDAGFLDAI	300
TTAIHDPCLK	PSVVSISWGG	PEDSWTSAAI	AAMNRAFLDA	AALGVTVLAA	AGDSGSTDGE	360
QDGLYHVDFF	AASPYVLACG	GTRLVASGGR	IAQETVWNDG	PDGGATGGGV	SRIFPLPAWQ	420
EHANVPSSAN	PGASSGRGVP	DLAGNADPAT	GYEVVIDGEA	TVIGGTSAVA	PLFAALVARI	480
NQKLKGAAGY	LNPTLYQLPA	DVFHDITEGN	NDIANRAQIY	QAGPGWDPCT	GLGSPIGVRL	540
LQALLPSASQ	PQP					553

다시, 프로펩타이드는 회색으로 음영처리되어 있다. 촉매 트리아드 SED(=Ser/Glu/Asp)는 이탤릭체로 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

#### 실시예 1: 프로테아제 활성 검정

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

#### a) AAPF 검정 96웰 포르메이트

검정(assay) 완충액: 실험에 따라, pH 3에서 200 mM 아세트산나트륨, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.01% 트리톤 X-100

기질 스톡 용액: 물이 없는 DMSO 중의 100 mM

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

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

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 사이의시트르산삼나트륨/시트르산 및 pH 6.0 내지 7.5 사이의 트리스/말레산이다.

#### b) IT<sub>50</sub>

IT<sub>50</sub>은 상술한 조건 하에서 활성의 50%가 불활성화되는 온도를 정의한다. 이와 동일하지 않지만, 이는 적용, 예컨대, 세제 적용, 예컨대, 접시 세척 또는 직물 또는 경질 표면의 세정 및 다른 기술적 적용에서 펠렛화 조건 또는 조건들에서 열 안정성에 대한 척도이다.

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 자이모겐 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 CaCl<sub>2</sub> pH6.5

[0148] 800 mM 글리신/HCl pH2.8

[0149] 열 불활성화 실행: 샘플을 인산칼륨 완충액 속에서 용적 활성화에 상응하도록 희석시켰다. 최종 용액의 pH를 pH 6.3을 초과하도록 점검하였다. 샘플을 중복하여 웰당 20  $\mu$ L로 384 웰 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  $\mu$ L의 샘플을 384 웰 그라이너(greiner) 선명한 편평 바닥 PS-마이크로플레이트 내로 이동시키고 9  $\mu$ L의 글리신 완충액을 가하여 37°C에서 1시간의 항온처리 동안 프로테아제를 불활성화시켰다. 프로테아제를 활성화시킨 후 검정을 24  $\mu$ L의 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.

[0150] c) 프로펩타이드 - 활성화된 효소 단백질의 부재하의 IT50:

[0151] 열 불활성화 실행 전의 효소 활성화. 샘플을 2b)에 기술된 바와 같이 pH 2.8의 글리신 완충액 속에서 용적 활성화에 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 웰당 20  $\mu$ L로 384 웰 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  $\mu$ L의 샘플을 384 웰 그라이너 선명한 편평 바닥 PS-마이크로플레이트 내로 이동시키고 9  $\mu$ L의 글리신/HCl 완충액을 가하여 pH를 3.0으로 조절하였다. 검정은 24  $\mu$ L의 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.

[0152] d) pH-프로파일 - 활성화된 효소 단백질

[0153] 효소 단백질을 함유하는 희석되지 않은 세균 상층액을 1 M HCl을 사용하여 pH 4로 적정하고 효소를 37°C에서 60분 동안 활성화시켰다. 20  $\mu$ L의 샘플을 pH가 1.8 내지 7.0(NaCl을 사용하여 15 mS/cm의 전도도로 조정함)인 200  $\mu$ L의 브리튼 로빈슨 완충액(Britton Robinson buffer)에 가하였다. 이후에, 20  $\mu$ L를 384-웰 그라이너 편평 바닥 PS-미세플레이트 및 20  $\mu$ L의 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.

[0154] e) pH/펩신-내성

[0155] 효소 단백질을 함유하는 희석되지 않은 세균 상층액을 1 M HCl을 사용하여 pH 2.5로 적정하였다. 이후에, 90  $\mu$ L를 Nunc 96-웰 선명한 편평 바닥 미세역가 플레이트로 이동시켰다. pH 2.5 완충액(검정시 최종 농도 25  $\mu$ g/mL) 또는 pH 2.5 완충액 속의 10  $\mu$ L의 250  $\mu$ g/mL 펩신 스톱 용액을 각각의 웰에 가한 다음 37°C에서 30분 동안 항온처리하였다. 최종적으로, 5  $\mu$ L의 100  $\mu$ M 펩스타틴 A 용액(최종 농도 5  $\mu$ M)을 각각의 웰에 가하여 펩신 반응을 정지시켰다. 25  $\mu$ L의 샘플을 새로운 Nunc 96-웰 선명한 편평바닥 미세역가 플레이트 내의 175  $\mu$ L의 글리신/HCl 완충액 pH 3 속으로 이동시켰다. 이후에, 20  $\mu$ L를 384-웰 그라이너 편평 바닥 PS-미세플레이트 및 20  $\mu$ L의 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

[0157] 20  $\mu$ l의 희석되지 않은 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  $\mu$ L 글리신/HCl 완충액 pH 3.0 속에 희석시켰다. 샘플을 37°C에서 20분 동안 항온처리한 다음 20  $\mu$ L의 샘플을 384-웰 그레이너 편평 바닥 PS-미세 플레이트 및 20  $\mu$ L의 기질 용액(0.01% 트리톤-X100이 들어있는 수 중 2 mM AAPF-pNA)으로 이동시키고 실시예 1 a)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

[0159] 보우만-버크(Bowman-Birk) 및 쿠니츠-형(Kunitz-type) 억제제(BBI/KTI)는 콩과식물(legume) 및 곡물 낱알의 종자에 광범위하게 퍼져있는 세린 프로테아제의 강력한 억제제이다. 검정 원리는 프로테아제 활성에 의해 BBI/KTI의 단백질분해적 분해가 벤질-아르기닌-pNA(Bz-R-pNA) 기질 상에서 억제제없이 천연 트립신 활성을 회복한다는 것이다. 효소 단백질을 함유하는 90  $\mu$ L의 세균 상층액을 글리신/HCl 완충액 속에 pH 3.0으로 희석시킨 다음 37°C에서 30분 동안 항온처리하였다. 20  $\mu$ L의 샘플을 이후에 20  $\mu$ L의 억제제 용액(KTI: 글리신 완충액 pH 3.0에서 희석시킨 8  $\mu$ g/mL; BBI: 16  $\mu$ g/mL; KTI/BBI: 4/8  $\mu$ g/mL)과 혼합하고 37°C에서 60분 동안 추가로 항온처리하였다. 15  $\mu$ L의 샘플을 384-웰 그레이너 편평 바닥 PS-미세플레이트로 이동시킨 다음 pH 8.0에서 15  $\mu$ L의 트립신 용액(최종 트립신 농도는 1  $\mu$ g/mL이다; 최종 pH 7.0 또는 pH 7.5)을 각각의 웰에 가하고 플레이트를 37°C에서 10분 동안 항온처리하였다. 최종적으로, 30  $\mu$ L의 기질 용액(0.01% 트리톤-X100이 들어있는 수 중 2 mM Bz-R-pNA)을 각각의 웰에 가하고 실시예 1 a)에 기술된 바와 같이 410 nm 및 37°C에서 동역학을 모니터링함으로써 활성을 측정하였다. 각각의 동역학 실험을 4회 수행하였다.

[0160] 실시예 2: 유전적 다양성의 생성

[0161] 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, 4<sup>th</sup> 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 이중 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

[0165] 초기 단계에서 단일 부위 포화 라이브러리 형태 또는 후속적인 단계에서 조합 라이브러리 형태의 생성된 유전적 다양성 또는 구별되는 클론을 최적화된 표현형, 즉, 증가된 열 안정성을 지닌 변이체에 대해 이들을 완전 자동화된 로봇 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 불활성과 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  $\Delta$ IT50에 의해 변이체를 특성화하는 사용된 골격(=N-말단 메티오닌을 결실하고 있는 야생형)의 IT50과 비교하였다. 골격은 자이모겐으로서  $79.6^{\circ}\text{C} \pm 0.4^{\circ}\text{C}$  ( $n = 46$ )의 IT50 및 활성화된 효소로서  $59^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  ( $n = 10$ )의 IT50을 갖는다.

[0168] [표 1]

서열 번호: 1 에 대한 쿠마롤리신 AS 단일 아미노산 치환, 및 자이모겐 및 활성화된 효소에 대한 골격과 비교한 이들의  $\Delta$ IT50

위치	돌연변이	$\Delta$ IT50 자이모겐	$\Delta$ 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] 20

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 나타난 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.

[0174]

#### 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, 4<sup>th</sup> edition에 기술된 표준 클로닝 기술, CSHL을 사용하였다. 프로테아제 효소 변이체를 바실러스 서브틸리스내에서 이중 발현 및 상술한 방법을 사용하여 표현형적으로 분석 후 특성화하였다.

[0176]

상기 제공된 실시예에서 확인되고 표 1에 요약된, 돌연변이를 조합하는 조합 라이브러리는 Yolv 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.

[0177]

#### 실시예 6

[0178]

표 1로부터의 2개 이상의 돌연변이를 포함하는 구별된 클론 및 조합 클론을 확인하고, IT50을 상술한 바와 같이 분석하고 상응하는  $\Delta$ 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 돌연변이의 선택된 조합을 포함하는 구별된 클론, 및 야생형과 비교한 이들의 ΔIT50

#	구별된 클론 및 선택된 조합 클론내 돌연변이					
1					E360L	A392V
2				T301S	E360V	A386I
3					E360L	A386I
4					E360L	A392I
5					E360V	A386I
6			T301S	G320A	E360L	
7			T301S		E360L	A386I
8			T301S		E360V	A392I
9					E360V	A392V
10					E360L	A386I
11			T301S		E360L	A392I
12			T301S		E360L	A386I
13					E360L	A386I
14					E360V	A392I
15					E360L	A386I
16			T301S		E360L	
17			T301S		E360L	A392V
18			T301S		E360V	A386I
19					E360V	A386I
20			T301S		E360V	A392I
21	D199E				E360V	
22					E360L	A386I
23					E360L	A386I
24					E360V	A392V
25		E269T			E360V	A386I
26			T301S		E360L	A392V
27					E360L	A392V
28					E360V	A392I
29			T301S		E360L	
30					E360L	A386I
31			T301S		E360L	A386I
32					E360V	A392V
33			T301S		E360L	A392I
34					E360V	
35					E360L	A386I
36			T301S		E360V	A386I
37					E360L	A386I
38			T301S		E360L	A386I
39			T301S		E360V	A392V
40			T301S		E360L	A386I

[0180]

#	구별된 클론 및 선택된 조합 클론내 돌연변이					
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 돌연변이				IT50 자이모겐	ΔIT50 자이모겐	IT50 완성 효소	ΔIT50 완성 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	Q518G		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 돌연변이							
41				T301S		E360L	A386I	
42						E360V		A392I
43						E360V	A386I	A392I
44						E360L		A392V
45	D199E					E360V		
46				T301S		E360L	A386I	A392I
47	D199E	G266A				E360V		A392V
48		G266A				E360V		A392V
49						E360L		A392I
50				T301S		E360V	A386I	
51						E360L	A386I	
52						E360L	A386I	
53	D199E	G266A				E360V		A392V
54						E360V	A386I	A392I
55	D199E	G266A	E269H			E360V		A392L
56						E360V	A386I	
57						E360V		A392V
58				T301S		E360L	A386I	A392I
59	D199E					E360V	A386I	
60						E360V	A386I	A392I
61	D199E					E360V	A386I	
62						E360V	A386I	
63	D199E	G266A		T301S		E360L		
64	D199E	G266A	E269T		G320A	E360V		A392L
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					E360V		
76				T301S		E360L		A392I
77	D199E					E360V		
78	D199E					E360L		
79						E360V	A386I	

[0183]

#	구별된 클론 및 선택된 조합 클론내 돌연변이						
41		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
42		D447S	A449Y		A460W		N510H
43		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
44		D447S	A449Y	E453W	A460W		N510H
45		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
46		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
47		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
48	R412E	D447S	A449Y	E453W	A460W		
49		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
50		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
51		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
52		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
53		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
54		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
55		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
56		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
57		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
58		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
59		D447S	A449Y			V502C	N510H
60		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
61		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
62		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
63		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
64		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
65		D447S	A449Y			V502C	N510H
66		D447S	A449Y	E453W	A460W		
67		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
68		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
69		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
70		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
71		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
72		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
73		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
74		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
75		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
76		D447S	A449Y	E453W	A460W		N510H
77		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
78		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
79		D447S	A449Y			V502C	N510H

[0184]

#	구별된 클론 및 선택된 조합 클론내 돌연변이				IT50 자이모겐	ΔIT50 자이모겐	IT50 결정 표수	ΔIT50 결정 표수
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	26.9
54		A517T	Q518G		>95	>17	86.4	26.9
55		A517T	Q518G	P553K	101.7	23.2	86.3	26.8
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	26.8
65		A517T			94.0	15.9	85.8	25.1
66	R516I	A517T	Q518G		100.1	21.6	85.7	26.2
67		A517T			>95	>17	85.7	26.2
68		A517T	Q518G		>95	>17	85.7	26.2
69		A517T			94.9	16.6	85.4	25.7
70		A517T			-10.0	-10.0	85.4	25.9
71		A517T			95.8	17.3	85.4	25.9
72		A517T	Q518G		>95	>17	85.4	25.9
73		A517T	Q518G		>95	>17	85.4	25.9
74		A517T	Q518G		100.4	21.9	85.3	25.8
75		A517T			>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	l	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
l391	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		
l219	L	1,1	0,8		16
M333	l	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	
	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	I	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	I	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 실시예 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 나타난 상단 변이체에 대한 이온 강도의 효과를 나타낸다.

[0192] 고 이온 강도에서의 성능 및 안정성을 실시예 1d에 기술한 바와 같이 시험하였다. pH 프로파일은 대조군 매개변수였으며 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 나타난 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, 모 효소(parent enzyme)로부터 이러한 변이체를 구별한다.

[0196]

[ 丑 4 ]

[illegible]

[0197]

[0198]

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

[0199] [표 5]

바람직한 조합 및 구별된 변이체내 제 공된 돌연변이의 발생 빈도  
발생 빈도는 제 공된 돌연변이의 역할 및 중요성의 척도이다 .

돌연변이	바람직한 조합 및 명백한 변이체내 발생 빈도 (활성화된 표주 (150~48°C))	돌연변이	바람직한 조합 및 명백한 변이체내 발생 빈도 (150~48°C)	돌연변이	바람직한 조합 및 명백한 변이체내 발생 빈도 (150~48°C)
D447S	127	D447S	365	A331F	7
A489Y	127	A489Y	353	A331V	9
A517T	127	A517T	256	A329Q/N/T	15
N510H	125	N510H	175	S435S/I	11
E360L/V	125	E360V/L	262	V274I	104
V502C	120	V502C	185	A372S	82
E453W	92	E453W	230	K283L	66
A514V/T	84	A514V/T	265	Q244C	46
A460V	72	A460V	308	T380C	30
A386I	56	A386I	178	A418W	28
A392V/I	50	A392V/I	392	I391W	21
T301S	44	T301S	79	A423V	18
D199E	43	D199E	30	T346L	16
Q518G	36	Q518G	250	I219L	16
P553K	20	P553K	6	S327L	16
E269T/H	12	E269T/H	133	M333I	16
G266A	19	G266A	133	N515G	13
I293V	1	I293V	24	A378G	12
G320A	1	G320A	269	S484G	12
R412Q	1	R412Q	74	A435G	10
E421R	1	E421R	11	S280D	9
A487Q	1	A487Q	24	Q395S	3
T461V	1	T461V	26	D395S	3
		T461C	48	V490W	3

[0200]

[0201] 다음의 표 6은 자이모겐 또는 활성화된 형태의  $\Delta T50$ 에 대한 단일 돌연변이의 영향을 나타낸다.  $\Delta T50$ 에 대한 단일 돌연변이의 영향의 양은 상기 돌연변이의 역할 및 중요성에 대한 척도이다.

[0202] [표 6]

자이모전(좌측) 또는 광성화된 형태(우측)에 대한 ΔIT50에서 단일 돌연변이의 영향  
ΔIT50에 대한 단일 돌연변이의 영향의 양은 상기 돌연변이의 역할 및 중요성에 대한 척도이다.

돌연변이	ΔIT50 자이모전	돌연변이	ΔIT50 자이모전	돌연변이	ΔIT50 광성화된 효소	돌연변이	ΔIT50 광성화된 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	L540V	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]

돌연변이	ΔIT50 자이모전	돌연변이	ΔIT50 자이모전	돌연변이	ΔIT50 광성화된 효소	돌연변이	ΔIT50 광성화된 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	P553L	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	H305F	-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	ΔT 50 차이 요인	돌연변이	ΔT 50 차이 요인	돌연변이	ΔT 50 활성화된 효소	돌연변이	ΔT 50 활성화된 효소
R4 12M	1,5	Q361L	0,2	A329T	0,9	A351S	-0,9
K483A	1,5	T507L	0,2	V455L	0,8	M333L	-1,0
Y490W	1,5	A548S	0,2	A328Y	0,8	E269C	-1,1
A514D	1,5	S324L	0,1	I330L	0,8	E269Q	-1,4
E360L	1,4	A487Q	0	A423V	0,8	H305W	-2,7
A433G	1,4	N291S	-0,2	Q497M	0,8	G388C	-3,5
L442W	1,4	W325K	-0,3	A392V	0,7	Q244C	-3,6
A328D	1,3	A475V	-0,3	E453Y	0,7	D265T	n.d.
A331Y	1,3	L338R	-0,5	V314L	0,7	R166I	n.d.
A351S	1,3	A342R	-0,6	S434G	0,7	V410I	n.d.
A514Y	1,3	L442W	-0,7	A449Y	0,7	A229W	n.d.
A517T	1,3	D358G	-2	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℃ 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 나타난 돌연변이의 장점을 취하는 합리적인 방식으로 작제하였다. D399S 치환을 제외하고는 502 및 510에서 돌연변이의 효과를 점진적으로 또는 충분히 보상할 수 있다.

[0208]

[표 7]

변이체 1번을 기반으로 한 변이체의 세트

#	구별된 돌연변이 및 선택된 조합	돌연변이	클론 내 돌연변이	1750 [°C] 차이 요인	1750 [°C] 열 안정성
1	G266A	E360V A392V	D447S A469V E453W A460W	G318S	301,3
2	G266A	E360V A392V	D447S A469V E453W A460W	G318S	301,3
3	G266A	E360V A392V	D447S A469V E453W A460W	G318S	301,3
4	G266A	E360V A392V	D447S A469V E453W A460W	G318S	301,3
5	G266A	E360V A392V	D447S A469V E453W A460W	G318S	301,3
6	G266A	E360V A392V	D447S A469V E453W A460W	G318S	301,3
7	G266A	E360V A392V	D447S A469V E453W A460W	G318S	301,3
8	G266A	E360V A392V	D447S A469V E453W A460W	G318S	301,3
9	G266A	E360V A392V	D447S A469V E453W A460W	G318S	301,3
10	G266A	E360V A392V	D447S A469V E453W A460W	G318S	301,3
11	G266A	E360V A392V	D447S A469V E453W A460W	G318S	301,3
12	G266A	E360V A392V	D447S A469V E453W A460W	G318S	301,3
13	G266A	E360V A392V	D447S A469V E453W A460W	G318S	301,3
14	G266A	E360V A392V	D447S A469V E453W A460W	G318S	301,3
15	G266A	E360V A392V	D447S A469V E453W A460W	G318S	301,3

[0209]

[0210]      참고 문헌:

Wlodawer A.I., Li M., Gustchina A., Oyama H., Dunn B.M., Oda K., Acta Biochim Pol. 2003;50(1):81-102

Terashita J., Oda K., Konjo 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

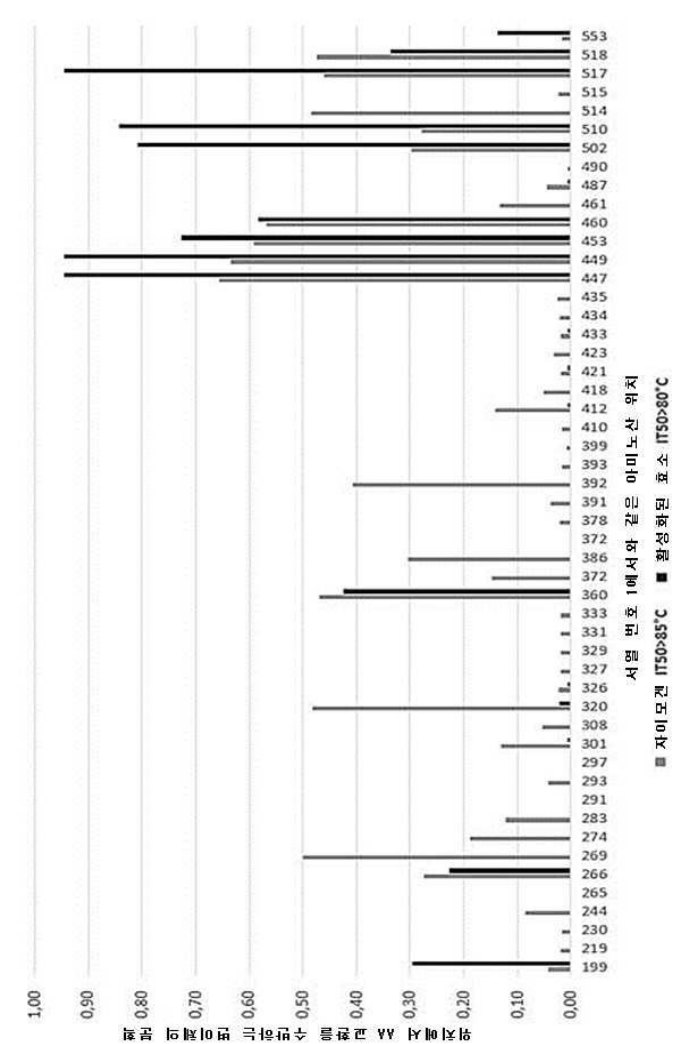
Cadwell and Joyce, Mutagenic PCR, PCR Methods Appl. 3, 1994, 136-140

Okubo et al, 2006 Jun;273(1 1):2563-76.

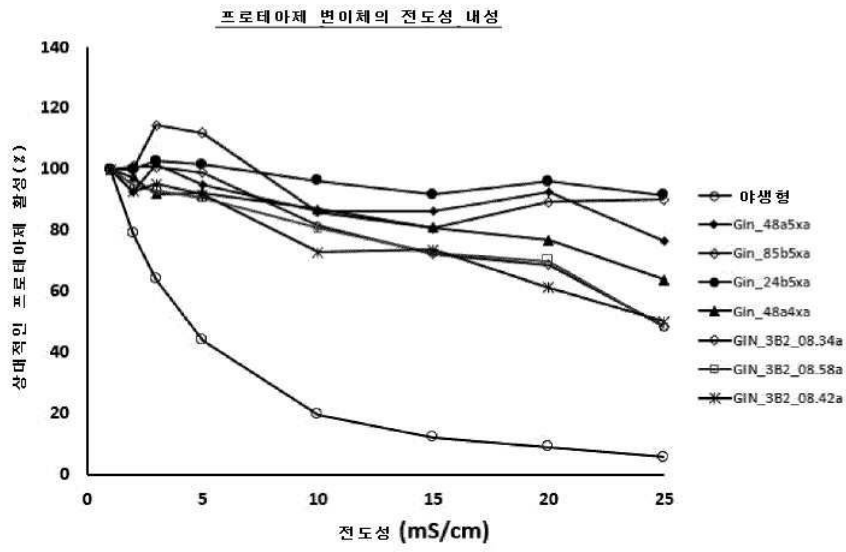
[0211]

도면

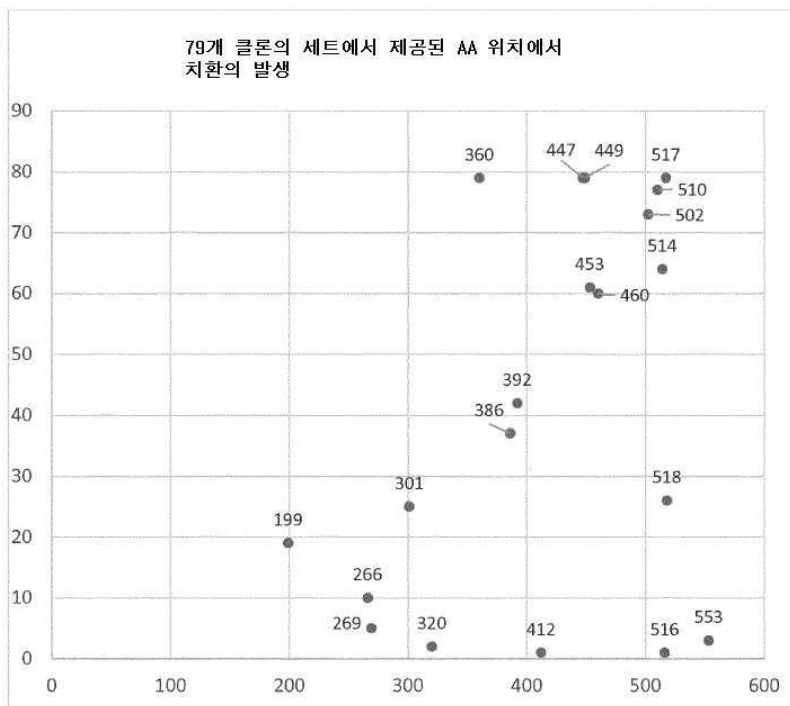
도면1



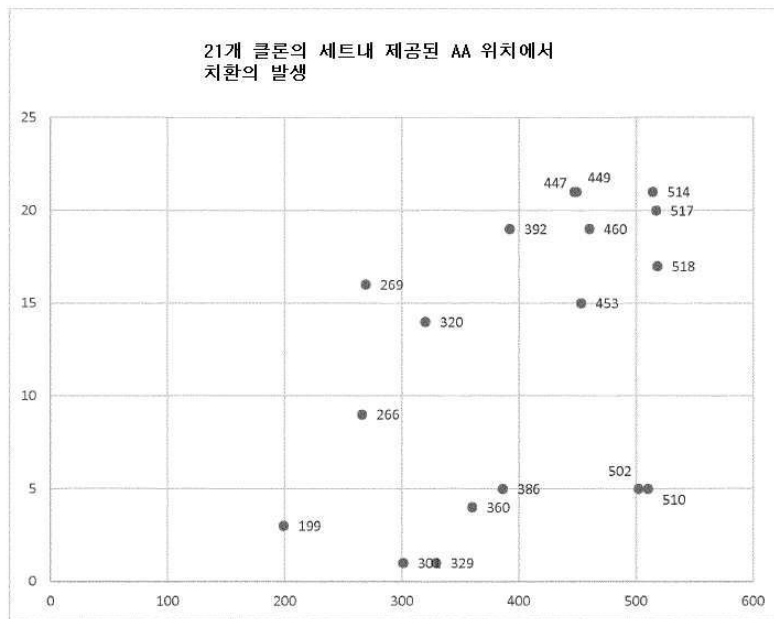
도면2



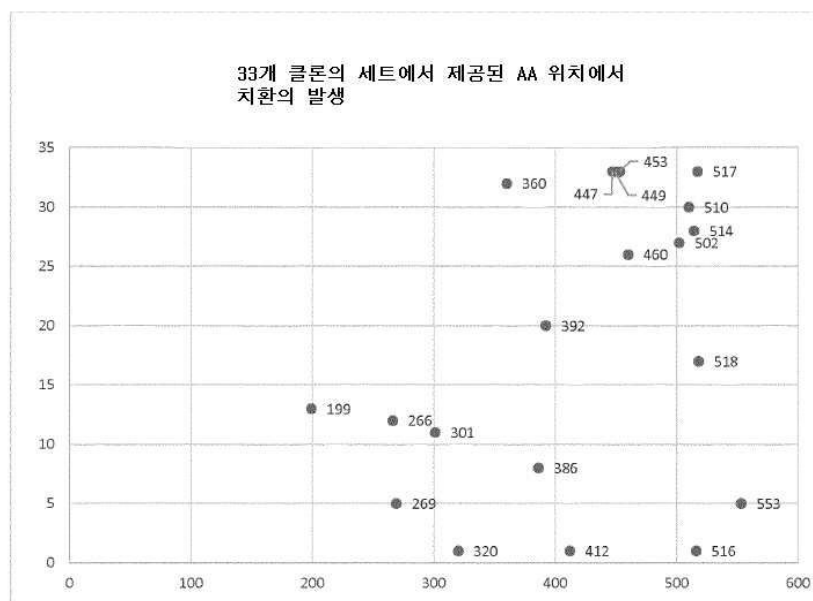
도면3



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 Gly

210 215 220  
Tyr Asp Glu Ala Ser Leu Ala Gln Tyr Phe Ala Ser Leu Gly Val Pro  
225 230 235 240  
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  
305 310 315 320  
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  
385 390 395 400  
Asp Gly Gly Ala Thr Gly 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 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	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 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 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 Gly Val Ser Arg Ile

210 215 220  
Phe Pro Leu Pro Ala Trp Gln Glu His Ala Asn Val Pro Pro Ser Ala

225 230 235 240  
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

305 310 315 320  
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 15

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	80
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	160
Leu Gly Leu Asp Thr Arg Pro Val Ala Arg Pro His Phe Arg Met Gln			
165	170	175	
Arg Arg Ala Glu Gly 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	240
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 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