



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 336 092**

51 Int. Cl.:

C12N 9/52 (2006.01)

C12N 9/54 (2006.01)

C12N 9/56 (2006.01)

C12N 15/57 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

C12N 15/75 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03731960 .5**

96 Fecha de presentación : **16.01.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1523553**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.04.2005**

54 Título: **Variantes de proteasas con múltiples sustituciones.**

30 Prioridad: **16.01.2002 US 350222 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.04.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.04.2010

73 Titular/es: **GENENCOR INTERNATIONAL, Inc.**
925 Page Mill Road
Palo Alto, California 94304, US

72 Inventor/es: **Bott, Richard, R.;**
Estell, David, A.;
Kellis, James, T., Jr. y
Poulose, Ayrookaran, J.

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 336 092 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Variantes de proteasas con múltiples sustituciones.

5 **Antecedentes de la invención**

Las serín proteasas son un subgrupo de carbonil hidrolasas. Comprenden una clase diversa de enzimas que tienen un amplio rango de especificidades y funciones biológicas. Stroud, R. Sci. Amer., 131: 74-88. A pesar de su diversidad funcional, la maquinaria catalítica de las serín proteasas se ha aproximado mediante por lo menos dos familias de enzimas genéticamente diferentes: 1) las subtilisinas y 2) las serín proteasas bacterianas homólogas y relacionadas con la quimiotripsina de mamífero (por ejemplo, tripsina y tripsina de *S. gresius*). Estas dos familias de serín proteasas muestran mecanismos destacadamente similares de catalizadores. Kraut, J. (1977), Annu. Rev. Biochem., 46: 331-358. Además, aunque la estructura primaria no esté relacionada, la estructura terciaria de estas dos familias de enzimas reunirá una triada catalítica conservada de aminoácidos que consisten en serina, histidina y aspartato.

Las subtilisinas son serín proteasas (aproximadamente PM 27.500) que se secretan en grandes cantidades a partir de una amplia variedad de especies de *Bacillus* y otros microorganismos. La secuencia de proteínas de subtilisina se ha determinado a partir de por lo menos nueve especies diferentes de *Bacillus*. Markland, F.S., *et al.* (1983), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 364:1537-1540. Se ha descrito la estructura cristalográfica tridimensional de subtilisinas de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* y varias variantes naturales de *B. lentus*. Estos estudios indican que aunque la subtilisina no está genéticamente relacionada con las serín proteasas de mamífero, tiene una estructura similar en el sitio activo. Las estructuras de cristales por rayos X que contenían inhibidores de péptido unidos covalentemente (Robertus, J.D., *et al.* (1972), Biochemistry, 11: 2439-2449) o complejos de productos (Robertus, J.D., *et al.* (1976), J. Biol. Chem., 251: 1097-1103) también han proporcionado información con respecto al sitio activo y al supuesto hueco de unión al sustrato de la subtilisina. Además, se han descrito un gran número de estudios de modificaciones cinéticas y químicas para la subtilisina; Svendsen, B. (1976), Carlsberg Res. Commun., 41: 237-291; Markland, F.S. Id.), así como por lo menos un informe en el que la cadena lateral de metionina en el residuo 222 de subtilisina se convertía mediante peróxido de hidrógeno en metionin-sulfóxido (Stauffer, D.C., *et al.* (1965), J. Biol. Chem., 244: 5333-5338) y se han llevado a cabo mutagénesis específicas de sitio (Wells y Estell (1988) TIBS 13: 291-297). WO98/55634, WO99/20727 y WO99/20770 describen todos variantes de subtilisina que presentan sustituciones en varias combinaciones de posiciones. La variante descrita se puede utilizar (por ejemplo) en composiciones de limpieza.

35 **Descripción resumida de la invención**

La presente invención proporciona una variante de proteasa, que es una variante de una proteasa precursora de subtilisina de *Bacillus lentus* que presenta la secuencia mostrada en la figura 3, estando dicha variante caracterizada por tener la misma carga electrostática neta a pH 7 o el mismo punto isoelectrico que dicha proteasa precursora, y que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la sustituciones R170S-A1R, R170S-G61R, R170S-N204R, R170S-S216R o R170S-G100R en relación a dicha proteasa precursora, donde las posiciones de dichas sustituciones son equivalentes a las posiciones especificadas en la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* madura mostrada en la figura 1.

La presente invención proporciona además ADN que codifica dicha variante de proteasa, así como un vector de expresión que comprende dicha secuencia de ADN y una célula huésped transformada con dicho vector de expresión.

La presente invención proporciona además una composición de limpieza que comprende la variante de proteasa descrita anteriormente.

La presente invención también proporciona un método de mejor rendimiento de lavado de una proteasa precursora de subtilisina de *Bacillus lentus* que tiene la secuencia mostrada en la figura 3, que comprende la introducción de las sustituciones R170S-A1R, R170S-G61R, R170S-N204R, R170S-S216R o R170S-G100R en dicha proteasa precursora para producir una variante de proteasa, donde dicha variante de proteasa tiene la misma carga electrostática neta a pH 7 o el mismo punto isoelectrico que dicha proteasa precursora, y donde dicha variante de proteasa tiene una mejor rendimiento de lavado en relación a dicha proteasa precursora, donde las posiciones de dichas sustituciones son equivalentes a las posiciones especificadas en la subtilisina madura de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en la figura 1.

El método puede comprender modificar una secuencia de ADN que codifica dicha proteasa precursora para producir una secuencia de ADN modificada que codifica la variante de proteasa. Puede comprender además transformar una célula huésped con un vector que contiene la secuencia de ADN modificada y que expresa la variante de proteasa a partir de la célula huésped transformada.

65 **Breve descripción de los dibujos**

Las figuras 1A-C representan las secuencias de AND (SEC ID No. 1) y aminoácidos (SEC ID No. 2) para subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* y un mapa de restricción parcial de este gen.

ES 2 336 092 T3

La figura 2 representa los residuos de aminoácidos conservados entre subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* (BPN)' y *Bacillus lentus* (tipo salvaje).

Las figuras 3A y 3B representan la secuencia de aminoácido de cuatro subtilisinas. La línea superior representa la secuencia de aminoácidos de subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* (a veces referida como subtilisina BPN') (SEC ID NO: 3). La segunda línea representa la secuencia de aminoácidos de subtilisina de *Bacillus subtilis* (SEC ID NO: 4). La tercera línea representa la secuencia de aminoácidos de subtilisina de *B. licheniformis* (SEC ID NO: 5). La cuarta línea representa la secuencia de aminoácidos de subtilisina de *Bacillus lentus* (también referida como subtilisina 309 en la PCT WO89/06276) (SEC ID NO: 6). El símbolo * indica la ausencia de residuos de aminoácidos específicos en comparación con la subtilisina BPN'.

La figura 4 representa el vector de expresión de *B. Subtilis* pVS08.

La figura 5 representa la orientación del cebador ApaI directo, el cebador ApaI inverso, el cebador mutagénico inverso y el cebador mutagénico directo.

Descripción detallada de la invención

Las proteasas son carbonil hidrolasas que actúan en general para dividir enlaces peptídicos de proteínas o péptidos. Tal como se utiliza en la presente invención, "proteasa" significa una proteasa natural o una proteasa recombinante. Las proteasas naturales incluyen una α -aminoaceil péptido hidrolada, peptidilaminoácido hidrolasa, acilamino hidrolasa, serín carboxipeptidasa, metalocarboxipeptidasa, tiol proteinasa, carboxil-proteinasa y metaloproteinasa. Se incluyen serín, metalo, tiol y ácido proteasas, sí como endo y exo proteasas.

La presente invención incluye enzimas proteasas que son variantes de carbonil hidrolasa (variantes de proteasas) no naturales que tienen una actividad proteolítica, estabilidad, especificidad de sustrato, perfil de pH y/o rendimiento diferentes característicos en comparación con la carbonil hidrolasa precursora de la que deriva la secuencia de aminoácidos de la variante. Específicamente, dichas variantes de proteasa presentan una secuencia de aminoácidos no hallada en la naturaleza, que se deriva mediante la sustitución de una pluralidad de residuos de aminoácidos de una proteasa precursora con aminoácidos diferentes. La proteasa precursora puede ser una proteasa natural o una proteasa recombinante.

A lo largo de esta solicitud, se hace referencia a varios aminoácidos mediante códigos de una letra y tres letras. Dichos códigos se identifican en Dale, M.W. (1989), Molecular Genetics of Bacteria, John Wiley & Sons, Ltd., Appendix B.

Las variantes de proteasas útiles en la presente invención derivan de subtilisina de *Bacillus lentus*.

Las subtilisinas son proteasas bacterianas o fúngicas que actúan en general para dividir enlaces peptídicos de proteínas o péptidos. Tal como se utiliza en la presente invención, "subtilisina" significa una subtilisina natural o una subtilisina recombinante. Se conoce que un conjunto de subtilisinas naturales se producen y a menudo se secretan mediante diversas especies microbianas. Las secuencias de aminoácidos de los miembros de esta serie no son completamente homólogas. Sin embargo, las subtilisinas en esta serie muestran el mismo tipo de actividad proteolítica o similar. Esta clase de serín proteasas comparte una secuencia de aminoácidos común que define una triada catalítica que las diferencia de la clase de serín proteasas relacionadas con quimiotripsina. Las serín proteasas relacionadas con subtilisinas y quimiortripsina presentan una triada catalítica que comprende aspartato, histidina y serina. En las proteasas relacionadas con subtilisina, el orden relativo de estos aminoácidos, leídos desde el extremo amino al carboxilo, es aspartato-histidina-serina. En las proteasas relacionadas con quimiotripsina, el orden relativo, sin embargo es histidina-aspartato-serina. De este modo, la subtilisina se refiere en la presente invención a una serín proteasa que tiene la triada catalítica de proteasas relacionadas con subtilisina. Algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, a las subtilisinas identificadas en la figura 3 de la presente invención. En general y para los objetivos de la presente invención, la numeración de los aminoácidos en proteasas corresponde a los números asignados a la secuencia de subtilisina madura de *Bacillus amyloliquefaciens* presentada en la figura 1.

"Subtilisina recombinante" o "proteasa recombinante" se refieren a una subtilisina o proteasa en la que la secuencia de ADN que codifica la subtilisina o proteasa se modifica para producir una variante (o mutante) de la secuencia de ADN que codifica la sustitución, delección o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos naturales. Métodos adecuados para producir dicha modificación y que se puede combinar con los descritos en la presente invención, incluyen los descritos en la Patente de Estados Unidos RE 34,606, la Patente de Estados Unidos 5,204,015 y la Patente de Estados Unidos 5,185,258, la Patente de Estados Unidos 5,700,676, la Patente de Estados Unidos 5,801,038, y la Patente de Estados Unidos 5,763,257.

Una "variante de enzima" tiene una secuencia de aminoácidos que deriva de la secuencia de aminoácidos de una "enzima precursora". Las enzimas proteasas precursoras incluyen enzimas naturales y enzimas recombinantes. La secuencia de aminoácidos de la variante de enzima "deriva" de la secuencia de aminoácidos de la enzima precursora mediante la sustitución, delección o inserción de uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la enzima precursora. Dicha modificación es de la "secuencia de ADN de la enzima precursora" que codifica la secuencia de aminoácidos de la enzima precursora en lugar de la manipulación de la enzima precursora *per se*. Los métodos

ES 2 336 092 T3

adecuados para dicha manipulación de la secuencia de ADN precursora incluyen métodos descritos en la presente invención, así como métodos conocidos por los expertos en la materia.

Una “variante de proteasa” tiene una secuencia de aminoácidos que deriva de la secuencia de aminoácidos de una “proteasa precursora”. Las proteasas precursoras incluyen proteasas naturales y proteasas recombinantes. La secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa “deriva” de la secuencia de aminoácidos de la proteasa precursora mediante la sustitución, delección o inserción de uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la proteasa precursora. Dicha modificación es de la “secuencia de ADN de la precursora” que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteasa precursora en lugar de la manipulación de la enzima proteasa precursora *per se*. Los métodos adecuados para dicha manipulación de la secuencia de ADN precursora incluyen métodos descritos en la presente invención, así como métodos conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, EP 0 328299, WO89/06279 y las Patentes de Estados Unidos y solicitudes ya referenciadas en la presente invención).

“Aminoácido cargado” se define como un aminoácido que es potencialmente ionizable, cambia de carga y proporciona una carga electrostática a un pH o intervalo de pH específico. Estos aminoácidos incluyen, por ejemplo, aminoácidos ácidos, aminoácidos básicos y algunos aminoácidos polares. Los aminoácidos ácidos son aquellos que están negativamente cargados a un pH 6,0, por ejemplo, ácido aspártico (Asp o D) y/o ácido glutámico (glu o E). Los aminoácidos básicos son aquellos que están positivamente cargados a pH 6,0, por ejemplo, lisina (Lys o K), arginina (arg o R) y/o histidina (His o H).

“Aminoácido no cargado” se define como un aminoácido que no es potencialmente ionizable. Estos aminoácidos incluyen, pero sin limitación, aminoácidos no polares no cargados y/o aminoácidos polares no cargados. Los aminoácidos no polares no cargados incluyen, pero sin limitación, alanina (Ala o A), valina (Val o V), leucina (Leu o L), isoleucina (Ile o I), prolina (Pro or P), fenilalanina (Phe o F), triptófano (Trp o W), y/o metionina (Met o M). Los aminoácidos polares no cargados incluyen, pero sin limitación, glicina (Gly o G), serina (Ser o S), treonina (Thr o T), cisteína (Cys o C), tirosina (Tyr o Y), asparagina (Asn o N) y/o glutamina (Gln o Q).

“Carga electrostática neutra” se define como la suma de cargas electrostáticas de la variante o enzima o proteasa precursora a un pH o intervalo de pH determinado. Un pH de ejemplo es pH 6,0.

“Punto isoelectrico” (pI_o) se define como el valor de pH en el que la proteína o complejo de proteínas, por ejemplo, la proteasa o complejo de proteasas (con metal u otros iones opcionalmente unidos) son neutros, es decir, la suma de cargas electrostáticas (carga electrostática neta = NEC) en el complejo es igual a cero. En esta suma, se debe tener en cuenta la consideración de la naturaleza positiva o negativa de las cargas electrostáticas individuales.

El “mismo punto isoelectrico (pI_o)” se define como el pI_o en un intervalo definido de unidades de pH. Por ejemplo, un intervalo definido de unidades de pH no podía ser superior a 1 unidad de pH, entre 0,25 y 0,75, por ejemplo, 0,5 unidades de pH, preferiblemente entre 0,01 y 0,5 unidades de pH, por ejemplo, 0,1 unidades de pH, y más preferiblemente entre 0,001 y 0,05 unidades de pH, por ejemplo, 0,1 unidades de pH del pI_o al que se compara el otro pI_o. El mismo punto isoelectrico se puede determinar a un pH determinado o en un intervalo de pH definido.

“Carga electrostática idéntica” se define como mantener “Z” o el mismo número de residuos cargados específicos en la variante de proteasa como hay en la proteasa precursora. Aunque el número de residuos cargados puede ser el mismo, los residuos de aminoácidos específicos se pueden sustituir en otras posiciones aproximadamente en el exterior de la variante de proteasa, siempre y cuando la carga electrostática neutra sea la misma que la de la proteasa precursora a un pH determinado.

La misma “carga electrostática neta” se define como mantener Z, o la suma de las cargas electrostáticas de la proteasa precursora en un intervalo definido de la suma de cargas electrostáticas de la variante de proteasa. El mantenimiento de la misma suma carga electrostática significa mantener la carga electrostática neta en un intervalo definido de unidades de carga sobre un intervalo definido de pH. Una variante de proteasa que tiene la misma carga electrostática neta que la proteasa precursora tendría una carga electrostática neta en un número definido de unidades de carga de la proteasa precursora. Por ejemplo, la variante de proteasa que tiene la misma carga electrostática neta no puede tener más de 1 unidad de pH, en las unidades de carga de 0,25 a 0,75, por ejemplo, 0,5 unidades, de la carga electrostática neta de la proteasa precursora. Aún más preferiblemente, la variante de proteasa que tiene la misma carga electrostática neta puede estar en 0,05 a 0,25 unidades, por ejemplo, 0,1 unidades de la carga electrostática neta de la proteasa precursora. Aún más preferiblemente, la variante de proteasa que tiene la misma carga electrostática neta puede estar en 0,001 a 0,05 unidades, por ejemplo, 0,01 unidades de la carga electrostática neta de la proteasa precursora. Las unidades de carga se pueden definir como el número de protones donados (ácidos) o aceptados (básicos). La carga electrostática de un aminoácido individual se puede establecer en general mediante la determinación del número de protones aceptados o donados a un pH determinado, por ejemplo 6,0 ó 7,0. Los valores Z también se pueden determinar mediante las ecuaciones descritas posteriormente en esta solicitud.

“Contenido de carga total” de la variante de proteasa o la proteasa precursora se define como en número total de cargas electrostáticas de la proteasa respectiva. Una variante de proteasa con la misma carga electrostática neta puede tener un contenido de carga total diferente a la proteasa precursora.

ES 2 336 092 T3

Tal como entenderán los expertos en la material, el punto isoeléctrico se puede calcular de manera práctica utilizando consideraciones de equilibrio utilizando valores de pK para varios residuos cargados en la enzima en cuestión y, a continuación, hallando mediante iteración el valor de pH en el que la NEC de molécula de enzima es igual a cero tal como se describe en EP 0945502 y los ejemplos de la misma.

Un problema con este cálculo es que los valores de pK para los residuos cargados dependen de su medio y consecuentemente están sujetos a variación. Sin embargo, se obtienen buenos resultados al asignar valores de pK aproximados específicos a los residuos cargados independientemente del valor real. También es posible realizar cálculos más sofisticados, parcialmente tomando en consideración el medio.

El pI también se puede determinar experimentalmente mediante enfoque isoeléctrico o mediante valoración de la solución que contenía la enzima. Además, los diversos valores de pK para los residuos cargados se pueden determinar experimentalmente mediante valoración.

En un aspecto adicional de la invención, las observaciones anteriores sobre el pI se utilizan además en un método para determinar o seleccionar la posición o posiciones y el aminoácido o aminoácidos a eliminar, sustituir o insertar por el aminoácido o aminoácidos en la proteasa precursora, de manera que la carga electrostática neta o punto isoeléctrico de la variante de proteasa son los mismos que la NEC o el pI de la proteasa precursora calculados al mismo valor de pH o un intervalo de pH definido.

Otra manera de expresar este principio cubierto por la invención es que la posición o posiciones y el aminoácido o aminoácidos a eliminar, sustituir o insertar por el aminoácido o aminoácidos en dicha proteasa precursora o enzima precursora se seleccionan de manera que el número total de cargas o el contenido de carga total (=TCC) y/o la NEC en una variante de proteasa o enzima resultante se mantiene constante para proporcionar una variante de proteasa o enzima que tiene un punto isoeléctrico que se mantiene igual a un pH o intervalo de pH definido para un rendimiento de lavado óptimo de la proteasa o la enzima, cuyo pH óptimo debería ser tan próximo como sea posible al pH del líquido de lavado, en el que se pretende utilizar dicha proteasa mutante.

Tal como se ha indicado anteriormente, el pI de una macromolécula, tal como una enzima, se calcula como el pH en el que la NEC de la molécula es cero. El procedimiento se ejemplifica en los ejemplos descritos en EP 0 945 502, pero los principios se describen con más detalle aquí.

Los valores de pK se asignan a cada uno de los residuos de aminoácidos potencialmente cargados. A continuación, la proporción de la aparición de un residuo de aminoácido a un pH determinado en forma cargada o no cargada (C/U (i) cargado/no cargado) se calcula para ambas cargas negativas y positivas mediante el uso de las fórmulas Ia y Ib:

$$C/U(i) = 10^{(pH-pK_i)} \text{ (carga negativa)} \quad \text{(Ia)}$$

$$C/U(i) = 10^{(pK_i-pH)} \text{ (carga positiva)} \quad \text{(Ib)}$$

Según las fórmulas anteriores, si el pH es igual a pK_i C/U(i) es igual a 1.

La carga relativa, Q_r(i), o contribución de carga asignada a cada residuo cargado, se calcula utilizando las fórmulas IIa y IIb:

$$Q_r(i) = C/U(i)/(1 + C/U(i)) \text{ (carga negativa)} \quad \text{(IIa)}$$

$$Q_r(i) = -C/U(i)/(1 + C/U(i)) \text{ (carga positiva)} \quad \text{(IIb)}$$

El valor de pH cuando la suma de todas las contribuciones de cargas a partir de los residuos cargados es igual a cero se puede encontrar por iteración o a través de la interpolación en una tabla de pH-suma de carga suficientemente densa.

Los expertos en la material entenderán que otro método de determinación de la carga electrostática neutra Z, como si el grupo (tal como el grupo R o el grupo amino) tiene una forma ácida catiónica, α representa la carga positiva fraccional.

$$Z = + \alpha = \frac{+1}{1 + 10^{(pH-pK_a)}}$$

ES 2 336 092 T3

Por otro lado, para grupos, tales como el carboxilo, con una forma ácida neutra y una base conjugada aniónica, α representa la fracción no cargada. La carga fraccional es entonces:

$$Z = -(1 - \alpha) = \alpha - 1 = \frac{-1}{1 + 10^{(\text{pK}_a - \text{pH})}}$$

Se ha indicado que varias proteínas generales de proteasa o enzima dependen de la NEC y/o el punto isoeléctrico de la molécula de proteasa o enzima. Por ejemplo, la solubilidad, estabilidad, distribución de fases en medio en fases múltiples y/o carga de la superficie de la proteasa o enzima son propiedades que están afectadas por la alteración de la NEC y/o el punto isoeléctrico de la molécula. Sorprendentemente, se pueden conseguir características de proteasa mejoradas manteniendo el mismo punto isoeléctrico o la misma carga electrostática neta. Aunque no desea unirse a ninguna teoría, los inventores creen que existen situaciones en las que se desea mantener las propiedades generales de la proteína, enzima o proteasa en cuestión modificando la cinética de la interacción de la molécula, por ejemplo, la distribución de cargas u orientación de la molécula en relación a un sustrato, superficie o medio.

La variante de proteasa y la proteasa precursora tienen una carga electrostática neta idéntica o un punto isoeléctrico idéntico. Se puede mantener la misma carga electrostática neta teniendo la carga electrostática idéntica o compensando el cambio de carga resultante de las posiciones modificadas adicionalmente mediante modificaciones adicionales en la secuencia de aminoácidos de la proteasa precursora. Estas modificaciones adicionales incluyen, pero sin limitación, la sustitución o inserción de un residuo que tiene una carga opuesta a la del residuo adicional (añadir un residuo ácido adicional para compensar un residuo básico adicional). De este modo, se contempla que el número de residuos cargados en la variante de proteasa puede ser diferente de la del precursor de la proteasa, por ejemplo, cuando el número de residuos cargados es superior que en la proteasa precursora. Para compensar el residuo cargado adicional, se puede realizar una sustitución de los correspondientes aminoácidos cargados de forma opuesta para mantener la misma carga electrostática neta. Adicionalmente, el número de residuos cargados en la variante de proteasa o enzima puede ser inferior que el número de residuos cargados en la proteasa o enzima precursora si la eliminación o sustitución de los correspondientes aminoácidos cargados de forma opuesta de otro residuo no cargado cuando se elimina o sustituye un residuo cargado por un residuo no cargado.

La NEC o el pI son idénticos, por ejemplo, cuando el contenido de carga total de la variante de proteasa y la proteasa precursora son el mismo; o cuando se mantiene el mismo número de residuos cargados en la proteasa precursora. Cuando se recoloca el aminoácido cargado para mantener la NEC o pI idénticos, por los menos uno de estos aminoácidos cargados se sustituye en una posición de residuo diferente de la de la proteasa precursora. Si existe un número específico de aminoácidos cargados específicos en la proteasa precursora, "X" lisinas en *Bacillus lentus* en (GG36), entonces la variante de proteasa conservará el mismo número de residuos de lisina, es decir, "X", pero a diferentes posiciones en relación a la proteasa precursora. De este modo, por ejemplo, K27 se puede sustituir con un residuo diferente y la correspondiente L sustituida en otra posición, preferiblemente una posición de la superficie. En una realización, un residuo cargado, por ejemplo, ácido glutámico, ácido aspártico, lisina o arginina se pueden sustituir en una posición diferente. Para mantener la carga electrostática idéntica, el residuo específico del precursor que se sustituye por el residuo cargado, por ejemplo, residuo K de la posición 27, se puede sustituir en la posición 27. Por ejemplo, un R45N-N204R tiene posiciones de residuos idénticos para mantener idéntica carga electrostática. Además, si el residuo específico del precursor que se sustituye por el residuo cargado es un residuo no cargado, otros residuos no cargados se pueden sustituir en una posición que originalmente tiene un residuo cargado. Por ejemplo, la combinación R170S-A1R sustituye una alanina por una arginina, sustituyendo una arginina por una serina. Naturalmente, si se realizan múltiples modificaciones, se puede sustituir cualquier residuo sustituido en cualquiera de otros residuos que se modifican, siempre y cuando se mantenga el mismo número de cada aminoácido respectivo. La carga electrostática se puede determinar a cualquier pH predeterminado, siempre y cuando se haga la determinación en el mismo pH para la variante de proteasa y la proteasa precursora.

Se puede mantener la misma carga electrostática neta de la molécula compensando el cambio en la carga electrostática neta resultante de la modificación de la proteasa precursora. Por ejemplo, una manera de conseguir dicha alteración es insertar o sustituir en un residuo de aminoácido adicional cargado de manera opuesta o eliminar un residuo de aminoácido cargado de forma similar, pero diferente. Si, por ejemplo, existen más aminoácidos ácidos presentes en la variante de proteasa que en la proteasa precursora, la variante incluirá aminoácidos básicos adicionales. Si, por ejemplo, existen más de un aminoácido ácidos específico, por ejemplo, ácido glutámico, presente en la variante de proteasa que en la proteasa precursora, para compensar dichas modificaciones, se podría eliminar o sustituir una cantidad correspondiente de residuos de ácido aspártico por un aminoácido no cargado. Por ejemplo, si existe un número específico de aminoácidos cargados en la proteasa precursora, los inventores contemplan un incremento o disminución del número de ese aminoácido en la variante de proteasa con el correspondiente incremento o disminución en los aminoácidos que compensan el cambio en el número de aminoácidos cargados. De este mo-

ES 2 336 092 T3

do, tal como se ha descrito anteriormente, los residuos cargados positivamente adicionales se podrían compensar mediante la adición de un número correspondiente de aminoácidos cargados negativamente o la sustitución de un número correspondiente de otros aminoácidos cargados positivamente por un residuo no cargado o combinaciones de los mismos. Un número inferior de residuos cargados positivamente se podría compensar por la eliminación de un número correspondiente de aminoácidos cargados negativamente, la sustitución de un número correspondiente de residuos no cargados por un número correspondiente de aminoácidos cargados negativamente o combinaciones de los mismos.

En una realización, el mismo residuo de aminoácido cargado que se sustituye por un residuo no cargado en la primera posición de aminoácido se sustituye en la segunda posición de aminoácidos donde está presente el mismo aminoácido no cargado que sustituye el residuo cargado. Se puede sustituir un residuo no cargado en la posición original del aminoácido cargado, mientras que el aminoácido cargado sustituido puede sustituir la posición del aminoácido no cargado. Por ejemplo, R45N-N204R refleja la sustitución de un aminoácido no cargado, asparagina por un aminoácido cargado, arginina. El mismo aminoácido no cargado sustituido por el aminoácido cargado no necesita estar presente en la posición en la que se reinserta el aminoácido cargado. Por ejemplo, un aminoácido no cargado seleccionado del grupo de alanina (Ala o A), glicina (Gly o G), asparaginas (Asn o N), prolina (Pro o P), serina (Ser o S) y/o treonina (Thr o T) se puede sustituir en la posición del aminoácido cargado mientras que el residuo de aminoácido cargado se sustituye en una posición de aminoácido ocupada originalmente por otro del grupo anterior. Por ejemplo, en la variante E271T-G100E, el aminoácido ácido glutámico en la posición 271 se sustituye por un aminoácido treonina, mientras que un residuo de glicina en la posición 100 se sustituye por un aminoácido ácido glutámico. Así mismo, el aminoácido cargado idéntico no necesita sustituirse en la posición originalmente no cargada, por ejemplo K27T-G100E. Los aminoácidos cargados ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), lisina (K) y arginina (R) son útiles en este aspecto.

En otro aspecto de la presente invención, la NEC de la variante de proteasa varía menos de un intervalo de 0,5 unidades de carga (Z) de las de la NEC de la proteasa precursora sobre el intervalo de pH de 0 a 14.

En otro aspecto de la invención, la NEC de la variante de proteasa varía menos de un intervalo de 1 unidad de carga de la de la NEC de la proteasa precursora sobre un intervalo de pH definido. El intervalo de pH definido puede ser, por ejemplo, en 2 unidades de pH del conocido en la técnica como pH óptimo o deseado para el medio deseado de la proteasa o enzima o en un intervalo de 4 unidades de pH.

En otro aspecto de la invención, se ha determinado que la modificación de los residuos cargados hallados en la proteasa precursora manteniendo la misma o idéntica carga electrostática neta puede dar lugar a una variante de proteasa que muestra unas características de lavado beneficiosas mejoradas.

En otro aspecto de la invención, se ha determinado que la modificación de los residuos cargados hallados en la proteasa precursora manteniendo la misma o idéntica carga electrostática neta a un pH definido, por ejemplo, sobre un intervalo de 4 unidades de pH, o sobre el intervalo de pH de 0,001 a 14 puede dar lugar a una variante de proteasa que muestra unas características de lavado beneficiosas mejoradas.

Los residuos de aminoácidos cargados de ejemplo contemplados para la modificación por los inventores incluyen, por ejemplo, aminoácidos básicos, tales como lisina, arginina y/o histidina; aminoácidos ácidos, por ejemplo, ácido aspártico y/o ácido glutámico; y/o en cualquier caso, grupos R polares, por ejemplo, tirosina.

Las variantes de proteasas de la presente invención pueden tener, en relación a dicha proteasa precursora, el mismo número de residuos de aminoácidos cargados positivamente, tanto los aminoácidos idénticos que en la proteasa precursora como diferentes aminoácidos que tienen la misma carga, y el mismo número de residuos de aminoácidos cargados negativamente que en la proteasa precursora; o más o menos residuos de aminoácidos cargados positivamente y correspondientemente más o menos residuos de aminoácidos cargados negativamente, de manera que la carga electrostática neta y/o el punto isoeléctrico de la variante de proteasa son los mismos que la proteasa precursora.

Las variantes de proteasas de la presente invención pueden tener, en relación a dicha proteasa precursora, el mismo número de residuos de aminoácidos cargados positivamente, tanto los aminoácidos idénticos que en la proteasa precursora como diferentes aminoácidos que tienen la misma carga, y el mismo número de residuos de aminoácidos cargados negativamente que en la proteasa precursora; o más o menos residuos de aminoácidos cargados positivamente y correspondientemente más o menos residuos de aminoácidos cargados negativamente, de manera que la carga electrostática neta y/o el punto isoeléctrico de la variante de proteasa son los mismos que la proteasa precursora. Se observó que un incremento en el número de residuos cargados positivamente mediante la sustitución de los mismos puede dar lugar a un incremento en la eficacia de esa variante concreta en un medio de lavado concreto, mientras que un cambio de la correspondiente carga opuesta puede dar lugar a un aumento de la eficacia en un medio de lavado diferente. Por ejemplo, se anticipa que mutaciones de cargas negativas proporcionan características beneficiosas en medios de lavado de fuerza iónica baja. Se anticipa que variantes comprenden tanto un incremento positivo como un incremento negativo manteniendo la misma carga electrostática neta o punto isoeléctrico dará lugar a una molécula de proteasa que muestra mejores características en ambos medios en comparación con el rendimiento de la proteasa precursora.

ES 2 336 092 T3

Estas sustituciones se realizan en subtilisina de *Bacillus lentus* (recombinante o tipo nativo).

La variante de proteasa puede comprender además por lo menos un aminoácido sustituido adicional en una o más posiciones de residuo equivalentes a las posiciones de residuo seleccionadas del grupo que consiste en 1, 2 - 4, 6, 9-12, 14, 15, 17-20, 25, 27, 36-38, 40, 44, 49, 51, 52, 54-61, 68, 71, 75, 76, 87, 89, 91, 97, 100-102, 104, 108, 111, 112, 115, 117, 118, 120-123, 128, 129, 131, 133, 134, 136, 137, 140, 143-146, 159, 164, 165, 167, 171, 173, 175, 180, 182-187, 191, 192, 194, 195, 204, 206, 209-212, 216, 218, 222, 224, 226 234-245, 252, 255, 257-263 265, 268, 269, y 274. Las sustituciones específicas contempladas por los inventores incluyen aquellas equivalentes a: I122A, Y195E, M222A, M222S, Y167A, R170S, A194P, D36, N76D, H120D, G195E, y K235N de subtilisina de *Bacillus lentus*.

De particular interés son las variantes en estas posiciones que demuestran un mayor rendimiento de lavado con la sustitución de un aminoácido cargado. La combinación de variantes que incluyen estas posiciones y las que tienen originalmente un aminoácido cargado es de interés.

Los expertos en la material entenderán que las variantes de proteasas que tienen estas modificaciones se pueden realizar y se describen en las Patentes de Estados Unidos 5,741,694; 6,190,900; y 6,197,567. Además, estas modificaciones también se pueden realizar utilizando métodos de transformación directa de *Bacillus* tal como se describe en la Solicitud Provisional Ser. No. 60/423,087 (solicitada el 1 de noviembre, 2002; Neelam Amin y Volker Schellenberger). En una realización, se realizaron modificaciones utilizando técnicas PCR de fusión (Tepljakov, AV, *et al*, Protein Eng., 1992 Jul 5 (5): 413-20).

Los números de posición de los aminoácidos especificados se refieren a los asignados a la secuencia de subtilisina madura de *Bacillus amyloliquefaciens* presentada en la figura 1. La presente invención, sin embargo, no está dirigida a la mutación de esta subtilisina concreta.

En cambio, la proteasa precursora es subtilisina de *Bacillus lentus* (SEC Id No. 6) y se realizan las sustituciones en las posiciones de los residuos de aminoácidos equivalentes correspondientes a los indicados anteriormente.

Una posición de residuo (aminoácido) de una proteasa precursora es equivalente a un residuo de subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* si es homóloga (es decir, que corresponde en posición en la estructura primaria) a un residuo específico en subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*.

Con el fin de establecer homología con la estructura primaria, se compara directamente la secuencia de aminoácidos de una proteasa precursora con la secuencia primaria de subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* y, particularmente, a un conjunto de residuos conocidos por ser invariables en subtilisina cuya secuencia es conocida. Por ejemplo, la figura 2 de la presente invención muestra los residuos conservados entre la subtilisina de *B. amyloliquefaciens* y subtilisina de *B. lentus*, después de alinear los residuos conservados, permitiendo las inserciones y deleciones necesarias con el fin de mantener la alineación (es decir, evitando la eliminación de residuos conservados a través de la deleción e inserción arbitraria), se definen los residuos equivalentes a aminoácidos concretos en la secuencia primaria de subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. La alineación de residuos conservados debería conservar preferiblemente un 100% de dichos residuos. Sin embargo, la alineación de más de un 98%, más de un 95%, más de un 90%, más de un 85%, más de un 80%, más de un 75%, más de un 50%, o por lo menos más de un 45% de los residuos conservados también es adecuada para definir los residuos equivalentes. Debería mantenerse la conservación de la triada catalítica Asp32/His64/Ser221. Siezen *et al.* (1991) Protein Eng. 4 (7): 719-737 muestra la alineación de un gran número de serín proteasas. Siezen *et al.* se refieren al agrupamiento como subtilasas o serín proteasas de tipo subtilisina.

Por ejemplo, en la figura 3, las secuencias de aminoácidos de subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* (*carlsbergensis*) y *Bacillus lentus* se alinea para proporcionar la máxima cantidad de homología entre las secuencias de aminoácidos. Una comparación de estas secuencias muestra que existe un conjunto de residuos conservados contenidos en cada secuencia. Estos residuos conservados (como entre BPN' y *B. lentus*) se identifican en la figura 2.

De este modo, estos residuos conservados se pueden utilizar para definir los correspondientes residuos de aminoácidos equivalentes de subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* en subtilisina de *Bacillus lentus* (Publicación PCT No. WO89/06279 publicada el 13 de Julio de 1989).

Las secuencias de aminoácidos de ciertas subtilisinas se alinean en las figuras 3A y 3B con la secuencia de subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* para producir la máxima homología de residuos conservados. Tal como se puede observar, existe un conjunto de deleciones en la secuencia de *Bacillus lentus* en comparación con la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. De este modo, por ejemplo, el aminoácido equivalente para Val165 en la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* en las otras subtilisinas es isoleucina para *B. lentus* y *B. licheniformis*.

Algunos de los residuos identificados para la sustitución son residuos conservados, mientras que otros no lo están. En el caso de residuos que no están conservados, la sustitución de uno o más aminoácidos se limita a sustituciones que producen una variante que tiene una secuencia de aminoácidos que no corresponde con la hallada en la naturaleza. En el caso de residuos conservados, dichas sustituciones no deberían dar lugar a la secuencia natural. Las variantes de

proteasas de la presente invención incluyen las formas maduras de variantes de proteasa, así como las formas pro- y prepro- de dichas variantes de proteasa. Las formas prepro- son la construcción preferida ya que facilita la expresión, secreción y maduración de las variantes de proteasas.

5 “Prosecuencia” se refiere a una secuencia de aminoácidos unida a la parte N-terminal de la forma madura de una proteasa, que cuando se elimina da lugar a la aparición de la forma “madura” de la proteasa. Muchas enzimas proteo-
líticas se encuentran en la naturaleza como productos de proenzima traduccionales y, en ausencia de procesado post-
traduccional, se expresan de esta manera. Una prosequencia preferida para la producción de variantes de proteasas es
10 la supuesta prosequencia de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, aunque se pueden utilizar otras prosequencias de proteasa.

Una “secuencia señal” o “presequencia” se refiere a cualquier secuencia de aminoácidos unida a la parte N-terminal de una proteasa o a la parte N-terminal de una preproteasa que puede participar en la secreción de las formas madura o pro de la proteasa. Esta definición de secuencia señal es funcional, y significa que incluye todas las secuencias de
15 aminoácidos codificadas por la parte N-terminal del gen de proteasa que participan en la realización de la secreción de la proteasa en condiciones nativas. La presente invención utiliza dichas secuencias para realizar la secreción de las variantes de proteasas tal como se define en la presente invención. Una posible secuencia señal comprende los primeros siete residuos de aminoácidos de la secuencia señal de subtilisina de *Bacillus subtilis* fusionados a los restantes de la secuencia señal de la subtilisina de *Bacillus lentus* (ATCC 21536).

20 Una forma “prepro” de una variante de proteasa consiste en la forma madura de la proteasa que tiene una prosequencia unida operativamente al extremo amino de la proteasa y una secuencia “pre” o “señal” unida operativamente al extremo amino de la prosequencia.

25 “Vector de expresión” se refiere a una construcción de ADN que contiene una secuencia de ADN que está unida operativamente a una secuencia de control adecuada capaz de realizar la expresión de dicho ADN en un huésped adecuado. Dichas secuencias de control incluyen un promotor para realizar la transcripción, una secuencia operadora opcional para controlar dicha transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión a ribosoma de ARNm adecuados y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. El vector puede ser un plásmido, una
30 partícula de fago, o simplemente un potencial inserto genómico. Una vez se transforma en un huésped adecuado, el vector se puede replicar y funcionar independientemente del genoma huésped, o puede, en algunos casos, integrarse en el propio genoma. En la presente memoria, “plásmido” y “vector” se utilizan a menudo indistintamente ya que el plásmido es la forma más habitualmente utilizada de vector en la actualidad. Sin embargo, la presente invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión que realizan funciones equivalentes y que son conocidas o se
35 conocerán en la técnica.

Las “células huésped” utilizadas en la presente invención en general son huéspedes procariotas o eucariotas que preferiblemente se han manipulado mediante los métodos descritos en la Patente de Estados Unidos RE 34,606 y/o la Patente de Estados Unidos 5,441,882 para volverlos incapaces de secretar endoproteasa enzimáticamente activa.
40 Una célula huésped útil para expresar proteasa es la cepa de *Bacillus* BG2036 que es deficiente en proteasa neutra enzimáticamente activa y proteasa alcalina (subtilisina). La construcción de la cepa BG2036 se describe en detalle en la Patente de Estados Unidos 5,264,366. Otras células huésped para expresar proteasas incluyen *Bacillus subtilis* I168 (también descrita en la Patente de Estados Unidos RE 34,606, Patente de Estados Unidos 5,441,882 y Patente de Estados Unidos 5,264,366), así como cualquier cepa de *Bacillus* adecuada, tal como *B. licheniformis*, *B. lentus*,
45 *etc.* Una célula huésped particularmente útil es la cepa de *Bacillus* BG2864. La construcción de la cepa BG2864 se describe en detalle en D. Naki, C. Paech, G. Ganshaw, V. Schellenberger. Appl Microbiol Biotechnol (1998) 49: 290-294.

Las células huésped se transforman o transfectan con vectores construidos utilizando técnicas de ADN recombinante. Dichas células huésped transformadas son capaces de replicar vectores que codifican las variantes de proteasa o expresar la variante de proteasa deseada. En el caso de vectores que codifican la forma pre- o prepro- de la variante de proteasa, dichas variantes, cuando se expresan, se secretan habitualmente a partir de la célula huésped en el medio de la célula huésped.

55 “Unida operativamente”, cuando describe la relación entre dos regiones de ADN, simplemente significa que están funcionalmente relacionadas entre sí. Por ejemplo, una prosequencia está unida operativamente a un péptido si actúa como secuencia señal, participando en la secreción de la forma madura de la proteína que está implicada más probablemente en la división de la secuencia señal. Un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia; un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia
60 codificante si se sitúa para permitir la traducción.

Los genes que codifican la proteasa precursora natural se pueden obtener según los métodos generales conocidos por los expertos en la materia. Los métodos comprenden generalmente sintetizar sondas marcadas que tienen supuestas secuencias que codifican regiones de la proteasa de interés, la preparación de bibliotecas genómicas a partir de organismos que expresan la proteasa y el cribado de las bibliotecas por el gen de interés mediante la hibridación a las sondas. A continuación, los clones que se hibridan de forma positiva se mapean y secuencian.

ES 2 336 092 T3

A continuación, la proteasa clonada se utiliza para transformar una célula huésped con el fin de expresar la proteasa. El gen de proteasa se liga a continuación en plásmidos con un alto número de copias. Este plásmido se replica en huéspedes en el sentido de que contiene los elementos conocidos necesarios para la replicación del plásmido: un promotor unido operativamente al gen en cuestión (que se puede suministrar como el propio promotor homólogo del gen si es reconocido, es decir, transcrito, por el huésped), una terminación de la transcripción y la región de poliadetilación (necesaria para la estabilidad del ARNm transcrito por el huésped del gen de proteasa en ciertas células huésped eucariotas) que es exógena o es suministrada por la región terminadora endógena del gen de proteasa y, de-seablemente, un gen de selección, tal como un gen de resistencia a antibiótico que permite el mantenimiento continuo del cultivo de células huésped infectadas por plásmido mediante el crecimiento en medio que contiene antibiótico. Los plásmidos con un alto número de copias también contienen un origen de replicación para el huésped, permitiendo así que se generen amplias cantidades de plásmido en el citoplasma sin limitaciones cromosómicas. Sin embargo, se encuentra en el alcance de la presente invención integrar múltiples copias del gen de proteasa en el genoma huésped. Esto se facilita mediante organismos procariontes y eucariotas que son particularmente susceptibles a recombinación homóloga.

El gen puede ser un gen de *B. lentus* natural. Alternativamente, se puede producir un gen sintético que codifica una proteasa precursora natural o mutante. En dicha aproximación, se determina el ADN y/o la secuencia de aminoácidos de la proteasa precursora. Los múltiples fragmentos de ADN sintéticos solapantes de de cadena sencilla se sintetizan a continuación, que tras la hibridación y la unión producen ADN sintético que codifica la proteasa precursora. Un ejemplo de construcción de gen sintético se indica en el ejemplo 3 de la Patente de Estados Unidos 5,204,015.

Una vez se ha clonado el gen de la proteasa precursora natural o sintética, se realizan una serie de modificaciones para aumentar el uso del gen más allá de la síntesis de la proteasa precursora natural. Dichas modificaciones incluyen la producción de proteasas recombinantes tal como se describe en la Patente de Estados Unidos RE 34,606; 5,741,694; 6,190,900; 6,197,567; 5,972,682; 5,185,258; 5,700,676 y Publicación EPO No. 0 251 446 y la producción de variantes de proteasas descritas en la presente invención.

El siguiente método de mutagénesis de cassette se puede utilizar para facilitar la construcción de las variantes de proteasas de la presente invención, aunque se pueden utilizar otros métodos. En primer lugar, el gen natural que codifica la proteasa se obtiene y se secuencia total o parcialmente. A continuación, se rastrea la secuencia por un punto en el que se desea hacer una mutación (delección, inserción o sustitución) de uno o más aminoácidos en la enzima codificada. Las secuencias que flanquean este punto se evalúan por la presencia de sitios de restricción para sustituir un segmento corto del gen por un grupo de oligonucleótidos que cuando se expresan codificará varios mutantes. Dichos sitios de restricción son preferiblemente sitios únicos en el gen de proteasa para facilitar la sustitución del segmento del gen. Sin embargo, se puede utilizar cualquier sitio de restricción adecuado que no sea demasiado redundante en el gen de proteasa, siempre que los fragmentos de generados mediante digestión por restricción se puedan reensamblar en la secuencia más adecuada. Si los sitios de restricción no están presentes en los puntos en una distancia adecuada desde el punto seleccionado (de 10 a 15 nucleótidos), dichos sitios se generan sustituyendo nucleótidos en el gen, de manera que ni el marco de lectura ni los aminoácidos codificados se cambian en la construcción final. La mutación del gen con el fin de cambiar su secuencia para conformar la secuencia deseada se realiza mediante la extensión del cebador M13 según los métodos generalmente conocidos. La tarea de localizar regiones flanqueantes adecuadas y evaluar los cambios necesarios para llegar a dos secuencias de sitios de restricción adecuadas se realiza por rutina mediante la redundancia del código genético, un mapa de enzimas de restricción del gen y un amplio número de diferentes enzimas de restricción. Cabe indicar que si está disponible un sitio de restricción flanqueante conveniente, el método anterior necesita utilizarse sólo en relación a la región flanqueante que no contiene un sitio.

Una vez se ha clonado el ADN natural o el ADN sintético, los sitios de restricción que flanquean las posiciones a mutar se digieren con las enzimas de restricción afines y un conjunto de cassettes de oligonucleótidos complementarios terminales se ligan en el gen. La mutagénesis se simplifica mediante este método, ya que todos los oligonucleótidos se pueden sintetizar para tener los mismos sitios de restricción y no son necesarios enlazadores sintéticos para crear los sitios de restricción.

Las variantes de proteasas expresadas tras la transformación de los huéspedes adecuados se pueden cribar por enzimas aislados o recuperados que muestran las características deseadas, por ejemplo, mejor rendimiento de lavado, especificidad de sustrato, estabilidad a la oxidación, perfiles de actividad de pH y similares.

Tal como se utiliza en la presente invención, actividad proteolítica se define como el grado de hidrólisis de enlaces peptídicos por miligramo de enzima activa. Existen muchos procedimientos conocidos para medir la actividad proteolítica (K. M. Kalisz, "Microbial Proteinases," *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, A. Fiechter ed., 1988). Otros métodos de ejemplo para determinar la actividad proteolítica incluyen los diversos ensayos espectrofotométricos que miden la conversión de sustratos seleccionados indirectamente mediante la medición del cambio en la absorción mediante la proteasa añadida a una concentración predeterminada de sustrato. Los sustratos de ejemplo incluyen dimetil caseína, succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, y queratina (Véase la Patente de Estados Unidos No. 60/344,702).

ES 2 336 092 T3

Además o alternativamente a la actividad proteolítica modificada, las variantes de enzimas de la presente invención pueden presentar otras propiedades modificadas, tales como Km, kcat, relación kcat/Km y/o especificidad de sustrato modificada y/o perfil de actividad de pH modificado. Estas enzimas se pueden ajustar al sustrato concreto que se anticipa para que esté presente, por ejemplo, en la preparación de péptidos o para procesos hidrofóbicos, tales como usos en lavandería.

Se puede definir un cambio en la especificidad de sustrato como la diferencia entre la relación de kcat/Km de la enzima precursora y la del mutante. La relación kcat/Km es una medida de la eficacia catalítica. Las carbonil hidrolasas procariotas con mayor o menor relación de kcat/Km se describen en los ejemplos. En general, el objetivo será asegurar un mutante que tenga una mayor relación kcat/Km (más elevada numéricamente) para un sustrato determinado, permitiendo así el uso de la enzima para actuar más eficazmente en un sustrato diana. Un incremento en la relación de kcat/Km para un sustrato puede estar acompañado por una reducción en la relación de kcat/Km para otro sustrato. Esto es un cambio en la especificidad de sustrato y los mutantes que muestran dichos cambios son útiles cuando los precursores no son deseables, por ejemplo, para evitar una hidrólisis no deseada de un sustrato concreto en una mezcla de sustratos.

kcat y Km se pueden medir según procedimientos conocidos o tal como se describe en el ejemplo 18 de la Patente de Estados Unidos No. 5,441,882.

La estabilidad a la oxidación es un objetivo adicional que se puede llevar a cabo por la variante de proteasa descrita en los ejemplos. La estabilidad puede aumentar o disminuir según se desee para varios usos. Una mayor estabilidad se puede conseguir mediante la eliminación de uno o más residuos de metionina, triptófano, cisteína o lisina y, opcionalmente, sustituyendo otros residuo de aminoácido que no es metionina, triptófano, cisteína o lisina. Las sustituciones opuestas dan lugar a una menor estabilidad a la oxidación. El residuo sustituido puede ser alanilo, pero también son adecuados residuos neutros.

La estabilidad, por ejemplo, la termoestabilidad, es un objetivo adicional que se puede lleva a cabo por la variante de proteasa descrita en los ejemplos. La estabilidad se puede aumentar o disminuir según se desee para varios usos. Una mayor estabilidad se puede conseguir mediante la sustitución de uno o más residuos identificados en la presente solicitud y, opcionalmente, sustituyendo otro residuo de aminoácido que no sean éstos. La termoestabilidad mantiene la actividad enzimática con el tiempo a una temperatura determinada. Una mayor termoestabilidad implica el mantenimiento de una mayor cantidad de actividad enzimática por la variante en comparación con la proteasa precursora. Por ejemplo, se mide un mayor nivel de actividad enzimática de la variante en comparación con el precursor a una temperatura determinada, habitualmente la temperatura de trabajo.

Las variantes de proteasas descritas en la presente invención pueden mostrar una mejor rendimiento de lavado en condiciones de lavado específicas. Por ejemplo, las variantes de proteasas pueden mostrar un rendimiento de lavado diferente en diferentes condiciones de lavado, por ejemplo, temperatura, dureza del agua y/o concentraciones de detergente tal como se indica por el rendimiento determinado mediante varios ensayos conocidos en la técnica, por ejemplo, WO 99/34011 ("An Improved Method of Assaying for a Preferred enzyme and/or Preferred Detergent composition.", publicada el 8 de julio de 1999).

En el caso de subtilisina de Bacillus o sus formas pre, prepro y pro, las mutaciones en las posiciones descritas anteriormente producen mutantes que presentan cambios en las características descritas anteriormente o en el procesado de la enzima. Cabe indicar que estos números de posiciones de aminoácidos son los asignados a la subtilisina de *B. amyloliquefaciens* mostrada en la Fig. 1. Debe entenderse que una delección o inserción en la dirección N-terminal a partir de una posición determinada desplazará las posiciones de aminoácido relativas, de manera que un residuo no ocupará su posición numérica original o de tipo salvaje. Además, las diferencias alélicas y la variación ente varias especies procariotas darán lugar a desplazamientos de las posiciones, de manera que la posición 169 en dichas subtilisinas no serán ocupadas por glicina. En dichos casos, las nuevas posiciones para glicina se considerarán equivalentes y comprendidas en la designación glicina+169. La nueva posición para glicina+169 se identifica fácilmente mediante el rastreo de la subtilisina en cuestión para una región homóloga a glicina+169 en la figura 1.

Se pueden mutar uno o más, habitualmente hasta aproximadamente 10, residuos de aminoácidos. Sin embargo, no existe un límite en el número de mutaciones que deben realizarse a parte de considerar la práctica comercial.

Las enzimas de la presente invención se pueden obtener como sales. Está claro que el estado de ionización de una proteína dependerá del pH del medio circundante, si está en solución, o de la solución a partir de la que se prepara, si está en forma sólida. Se preparan habitualmente proteínas ácidas como, por ejemplo, las sales de amonio, sodio o potasio; proteínas básicas, tales como cloruros, sulfatos o fosfatos. Por consiguiente, la presente solicitud incluyen tanto formas eléctricamente neutras como sales de las variantes de proteasas designadas y el término proteasa se refiere al esqueleto orgánico estructural independientemente del estado de ionización.

Las variantes de proteasa son particularmente útiles en el procesado de alimentos y en la limpieza. Las carbonil hidrolasas, incluyendo variantes de proteasas y proteasas precursoras, se producen mediante fermentación tal como se ha descrito en la presente invención y se recuperan mediante técnicas adecuadas. Véase, por ejemplo, K. Anstrup, 1974, *Industrial Aspects of Biochemistry*, ed. B. Spencer pp. 23-46.

ES 2 336 092 T3

En un aspecto de la presente invención, el objetivo es asegurar que una variante de proteasa tenga un rendimiento de lavado alterado, preferiblemente mejorado, en comparación con una proteasa precursora en por lo menos una formulación de detergente y/o bajo por lo menos un conjunto de condiciones de lavado. Se formulan con detergentes y otros tensoactivos según métodos conocidos *per se* para su uso en procesos industriales, especialmente lavandería. En el último caso, las enzimas se combinan con detergentes, reforzadores (builders), lejía y/o agentes blanqueadores fluorescentes conocidos en la técnica para enzimas proteolíticas. Entre los detergentes adecuados se incluyen alquil benceno sulfonatos lineales, alquil sulfato etoxilado, alcohol lineal sulfatado o alcohol lineal etoxilado. Las composiciones se pueden formular en forma granular o líquida. Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos 3,623,957; 4,404,128; 4,381,247; 4,404,115; 4,318,818; 4,261,868; 4,242,219; 4,142,999; 4,111,855; 4,011,169; 4,090,973; 3,985,686; 3,790,482; 3,749,671; 3,560,392; 3,558,498; y 3,557,002.

Existe un conjunto de condiciones de lavado, incluyendo formulaciones de detergente variantes, volumen de lavado de agua, temperatura de agua de lavado y longitud de del tiempo de lavado a las que se puede exponer una variante de proteasa. Por ejemplo, las formulaciones de detergente utilizadas en diferentes áreas tienen concentraciones diferentes de sus componentes pertinentes presentes en el agua de lavado. Por ejemplo, un detergente europeo contiene habitualmente aproximadamente 3000-8000 ppm de componentes de detergente en el agua de lavado, mientras que un detergente japonés contiene habitualmente menos de 800 ppm, por ejemplo 667 ppm de componentes de detergente en el agua de lavado. En Norteamérica, concretamente en los Estados Unidos, un detergente contiene habitualmente aproximadamente de 800 a 2000 ppm, por ejemplo 975 ppm de componentes de detergente presentes en el agua de lavado.

Un sistema con una concentración baja de detergente incluye detergentes en los que están presentes menos de aproximadamente 800 ppm de componente del detergente en el agua de lavado. Los detergentes japoneses se consideran habitualmente como un sistema con una concentración baja de detergente, ya que presentan aproximadamente 667 ppm de componentes del detergente presentes en el agua de lavado.

Una concentración media de detergente incluye detergentes en los que están presentes ente aproximadamente 800 ppm y aproximadamente 2000 ppm de componentes del detergente en el agua de lavado. Los detergentes norteamericanos están considerados generalmente como sistemas con una concentración media de detergente, ya que tienen aproximadamente 975 ppm de componentes del detergente presentes en el agua de lavado. Brasil tiene habitualmente aproximadamente 1500 ppm de componentes del detergente presentes en el agua de lavado.

Un sistema con una concentración elevada de detergente incluye detergentes en los que están presentes más de aproximadamente 2000 ppm de componentes del detergente en el agua de lavado. Los detergentes europeos se consideran habitualmente como un sistema con una concentración elevada de detergente, ya que presentan aproximadamente 3000-8000 ppm de componentes del detergente presentes en el agua de lavado.

Los detergentes latinoamericanos son generalmente detergentes con reforzadores de fosfato con elevada espuma de jabón y el rango de detergentes utilizados en Latinoamérica puede encontrarse tanto en concentraciones medias como elevadas de detergente, ya que varían desde 1500 ppm hasta 6000 ppm de componentes del detergente en el agua de lavado. Tal como se ha mencionado anteriormente, Brasil habitualmente utiliza aproximadamente 1500 ppm de componentes del detergente presentes en el agua de lavado. Sin embargo, otros puntos geográficos de detergentes con reforzadores de fosfato con elevada espuma de jabón, no limitadas a otros países latinoamericanos, pueden tener sistemas con una concentración elevada de detergente de hasta aproximadamente 6000 ppm de componentes del detergente presentes en el agua de lavado.

En vista de lo anterior, es evidente que las concentraciones de composiciones de detergente en soluciones de lavado habituales a lo largo del mundo varían desde menos de aproximadamente 800 ppm de composición de detergente (“puntos geográficos con concentración baja de detergente”), por ejemplo, aproximadamente 667 ppm en Japón, hasta ente aproximadamente 800 ppm y 2000 ppm (“puntos geográficos con concentración media de detergente”), por ejemplo aproximadamente 975 ppm en EEUU y 1500 ppm en Brasil, hasta más de aproximadamente 2000 ppm (“puntos geográficos con concentración elevada de detergente”), por ejemplo de aproximadamente 4500 ppm a aproximadamente 5000 ppm en Europa y aproximadamente 6000 ppm en puntos geográficos con reforzadores de fosfato con elevada espuma de jabón.

Las concentraciones de las soluciones de lavado habituales se determinan empíricamente. Por ejemplo, en los EEUU, una máquina de lavado habitual contiene un volumen de aproximadamente 64,4 L de solución de lavado. Por consiguiente, con el fin de obtener una concentración de aproximadamente 975 ppm de detergente en la solución de lavado, deben añadirse aproximadamente 62,79 g de composición de detergente a los 64,4 L de solución de lavado. Esta cantidad es la cantidad habitual medida en el agua de lavado por el consumidor utilizando la copa de medición proporcionada con el detergente.

Como ejemplo adicional, diferentes puntos geográficos utilizan diferentes temperaturas de lavado. La temperatura del agua de lavado en Japón es inferior habitualmente a la utilizada en Europa. Por ejemplo, la temperatura en el agua de lavado europea es generalmente del orden de 30 a 50 grados centígrados, habitualmente aproximadamente 40 grados centígrados. La temperatura en el agua de lavado de Norteamérica y/o Japón es generalmente inferior al agua de lavado europea, por ejemplo del orden de 10 a 30 grados centígrados, habitualmente aproximadamente de 20 grados centígrados.

ES 2 336 092 T3

Como ejemplo adicional, diferentes puntos geográficos utilizan diferente dureza del agua. La dureza del agua se describe habitualmente como granos por galón de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mezclados. La dureza es una medida de la cantidad de calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}) en el agua. La mayoría del agua en los Estados Unidos es dura, pero el grado de dureza varía. El agua moderadamente dura (60-120 ppm) a dura (121-181 ppm) tiene de 60 a 181 partes por millón (partes por millón convertido a granos por galón US es ppm # dividido por 17,1 igual a granos por galón) de minerales para la dureza.

Agua	Granos por galón	Partes por millón
blanda	menos de 1,0	menos de 17
ligeramente dura	de 1,0 a 3,5	de 17 a 60
moderadamente dura	de 3,5 a 7,0	de 60 a 120
dura	de 7,0 a 10,5	de 120 a 180
muy dura	más de 10,5	más de 180

La dureza del agua europea es habitualmente 10-20 granos por galón de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mezclados, por ejemplo, aproximadamente 15 granos por galón de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mezclados. La dureza del agua en Norteamérica es habitualmente superior a la dureza del agua japonesa, pero inferior a la dureza del agua europea, por ejemplo, entre 3 y 10 granos, 3-8 granos o aproximadamente 6 granos. La dureza del agua japonesa es habitualmente inferior a la dureza del agua norteamericana, habitualmente inferior a 4, por ejemplo, 3 granos por galón de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mezclados.

Por consiguiente, un aspecto de la presente invención incluye una variante de proteasa que muestra una mejor rendimiento de lavado en por lo menos un conjunto de condiciones de lavado. Otro aspecto de la presente invención incluye una variante de proteasa que muestra una mejor rendimiento de lavado en más de una condición de lavado, por ejemplo, en condiciones europeas, japonesas o norteamericanas.

En base a los resultados del cribado obtenidos con las variantes de proteasas, las mutaciones indicadas en subtilisina de *Bacillus* son importantes en la actividad proteolítica, el rendimiento y/o estabilidad de estas enzimas y el rendimiento de la limpieza o el lavado de dichas variantes de enzimas.

Muchas de estas variantes de proteasa de la presente invención son útiles en la formulación de varias composiciones de detergente o formulaciones para el cuidado persona, tales como champús o lociones. Un conjunto de compuestos conocidos son tensoactivos adecuados útiles en composiciones que comprenden los mutantes de proteasas de la invención. Éstos incluyen detergentes no iónicos, aniónicos, catiónicos o zwitteriónicos, tal como se describe en US 4,404,128 de Barry J. Anderson y US 4,261,868 de Jiri Flora, *et al.* Una formulación de detergente adecuada es la descrita en el Ejemplo 7 de la Patente de Estados Unidos 5,204,015.

La técnica es familiar con las diferentes formulaciones que se pueden utilizar como composiciones de limpieza. Además de las habituales composiciones de limpieza, se comprende fácilmente que las variantes de proteasas de la presente invención se pueden utilizar para cualquier objetivo en que se utilicen proteasas nativas o de tipo salvaje. De este modo, se pueden utilizar estas variantes, por ejemplo, en aplicaciones de pastillas de jabón o jabón líquido, formulaciones para lavar los platos, soluciones o productos para limpiar las lentes de contacto, hidrólisis de péptidos, tratamiento de residuos, aplicaciones textiles, como enzimas de división por fusión en la producción de proteínas, etc. Las variantes de la presente invención pueden comprender un mayor rendimiento en una composición de detergente (en comparación con el precursor). Tal como se utiliza en la presente invención, un mayor rendimiento en un detergente se define como el incremento del lavado de ciertas manchas sensibles a enzimas, tales como hierba o sangre, determinada mediante evaluación visual después de un ciclo de lavado estándar.

ES 2 336 092 T3

Las proteasas de la presente invención se pueden formular en detergentes en polvo o líquidos conocidos que tienen un pH entre 6,5 y 12,0 a niveles de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5% (preferiblemente 0,1% a 0,5%) en peso. Estas composiciones de limpieza detergentes también pueden incluir otras enzimas, tales como proteasas, amilasas, celulasas, lipasas o endoglicosidasas conocidas, así como reforzadores y estabilizantes.

La adición de proteasas de la presente invención a composiciones de limpieza convencionales no crea ninguna limitación especial de uso. En otras palabras, cualquier temperatura y pH adecuados para el detergente es también adecuado para las presentes composiciones, siempre y cuando el pH se encuentre en el intervalo anterior, y la temperatura por debajo de la temperatura de desnaturalización de proteasa descrita. Además, las proteasas de la presente invención se pueden utilizar en una composición de limpieza sin detergentes, de nuevo solas o en combinación con reforzadores y estabilizantes.

La presente invención también se refiere a composiciones de limpieza que contienen las variantes de proteasa de la presente invención. Las composiciones de limpieza pueden contener adicionalmente aditivos que se utilizan habitualmente en composiciones de limpieza. Éstos se pueden seleccionar entre, pero sin limitación, agentes blanqueadores, reforzadores, enzimas y catalizadores blanqueadores. Sería fácilmente evidente para un experto en la materia saber que aditivos son adecuados para la inclusión en las composiciones. La lista proporcionada aquí no pretende ser exhaustiva y sólo debería tomarse como ejemplo de aditivos adecuados. También será fácilmente evidente para un experto en la materia utilizar aquellos aditivos que son compatibles con las enzimas y otros componentes en la composición, por ejemplo, tensoactivo.

Cuando está presente, la cantidad de aditivo presente en la composición de limpieza es de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 99,9%, preferiblemente de aproximadamente 1% a aproximadamente 95%, más preferiblemente de aproximadamente 1% a aproximadamente 80%.

Las variantes de proteasas de la presente invención se pueden incluir en alimentación animal, tal como parte de los aditivos de la alimentación animal, tal como se describe en, por ejemplo, US 5,612,055; US 5,314,692; y US 5,147,642.

Una composición para el tratamiento de un tejido puede incluir variantes de proteasa de la presente invención, La composición se puede utilizar para tratar, por ejemplo, seda o lana, tal como se describe en publicaciones, tales como RE 216,034; EP 134,267; US 4,533,359; y EP 344,259.

Los siguientes ejemplos se presentan a modo de ejemplo y no deben interpretarse como una limitación del alcance de las reivindicaciones.

Ejemplo 1

Se produjeron un gran número de variantes de proteasa y se purificaron utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica. Todas las mutaciones se realizaron en subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*. En la Tabla 1 se muestran las variantes. Algunas de estas son variantes de la invención. Se proporcionan otras con propósito ilustrativo.

Para construir las bibliotecas saturadas de sitio GG36 y variantes específicas de sitio, se realizaron tres reacciones de PCR: dos PCRs para introducir el codón mutado de interés en GG36 y una PCR de fusión para construir el vector de expresión que incluye la mutación o mutaciones deseadas.

Se numeran los codones de GG36 de interés según la numeración de BPN' (enumerados en las Figuras 1A-C y 3A-B).

Para la construcción de bibliotecas saturadas de sitio

El procedimiento de mutagénesis se basó en la estrategia de mutaciones de región específica (Teplyakov *et al.*, 1992) en la cual se realizó la creación de todas las posibles mutaciones a la vez en un codón de ADN específico utilizando un conjunto de cebadores de oligonucleótidos complementarios directos e inversos con una longitud de 30-40 nucleótidos que incluyen una secuencia NNS de ADN triple de diseño específico ((A,C,T o G), (A,C,T o G), (C o G)) que corresponde con la secuencia del codón a mutar y garantiza la incorporación aleatoria de nucleótidos en ese codón.

Para la construcción de variantes específicas de sitio

El cebador mutagénico directo e inverso incluye las tres mutaciones deseadas en el centro del cebador con ~15 bases de secuencias homólogas en ambos lados. Estas mutaciones, que cubren el codón de interés, son específicas para el aminoácido deseado y se sintetizan por diseño.

ES 2 336 092 T3

El segundo conjunto de cebadores utilizado para construir las bibliotecas y variantes contiene el sitio de digestión *ApaI* de pVS08 junto con su secuencia de nucleótidos flanqueantes.

5 *Cebadores ApaI*

Cebador *ApaI* directo:

GTGTGTGGGCCCATCAGTCTGACGACC

10

Cebador *ApaI* inverso:

GTGTGTGGGCCCTATTCGGATATTGAG

15

Se realizó la introducción de la mutación o mutaciones en moléculas GG36 utilizando Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity de Invitrogen (Carlsbad, CA, Cat. n° 11304-102) junto con ADN de molde de pVS08 y cebador mutagénico directo y cebador *ApaI* inverso para la reacción 1, o cebador mutagénico inverso y cebador *ApaI* directo para la reacción 2.

20

Se llevó a cabo la construcción del vector de expresión que incluía la mutación mutaciones deseadas mediante una PCR de fusión utilizando un fragmento de PCR de ambas reacciones 1 y 2, cebador *ApaI* directo e inverso y Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity de Invitrogen (Cat. n° 11304-102).

25

Se realizaron todas las PCRs según el protocolo de Invitrogen proporcionado con las polimerasas, excepto por el número de ciclos: 20 en lugar de 30. Se realizaron dos reacciones PCR separadas utilizando Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity de Invitrogen (Cat. n° 11304-102): se purificó el fragmento de 5,6 Kb lineal amplificado (utilizando el kit de purificación de PCR Qiagen® Qiaquick Cat. n° 28106) y se digirió con enzima de restricción *ApaI* para crear extremos cohesivos en ambos lados del fragmento de fusión:

30

- 35 μ L de fragmento de ADN purificado
- 4 μ L de tampón React® 4 (Invitrogen®: 20 mM de Tris-HCl, 5 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, pH 7,4)
- 1 μ L de *ApaI*, 10 unidades/ml (Invitrogen® Cat. n° 15440-019)

35

Condiciones de reacción: 1 hora, 30°C.

40

Se realizó una digestión adicional con *DpnI* de Invitrogen para extraer el ADN de la plantilla pVS08:

- 40 μ L de fragmento de ADN digerido con *ApaI*
- 1 μ L de *DpnI*, 4 unidades/ μ L (Invitrogen® Cat. n° 15242-019)

45

Condiciones de reacción: 16-20 horas, 37°C.

50

La unión del fragmento digerido y purificado doble da como resultado ADN circular nuevo que contiene la mutación deseada que se transformó directamente a *Bacillus subtilis* competente:

- 30 μ L de fragmento de ADN purificado digerido con *ApaI* y *DpnI*
- 8 μ L de tampón T4 ADN Ligasa (Invitrogen® Cat. n° 46300-018)
- 1 μ L de T4 ADN Ligas, 1 unidad/ μ L (Invitrogen® Cat. n° 15224-017)

55

Condiciones de reacción: 16-20 horas, 16°C.

60

Se transformaron mezclas de unión a *Bacillus subtilis* BG2864 (Naki *et al.*, 1997) utilizando el procedimiento de Anagnostopoulos y Spizizen (1961) y se seleccionaron según la resistencia al cloramfenicol y actividad proteasa.

65

ES 2 336 092 T3

Método para la producción de proteínas

Se inocularon 1-50 μ l de cultivo de glicerol en medio Mops (Frederick C. Neidhardt *et al.*, 1974) que contenía una fuente de nitrógeno (Glucosa y Maltodextrina, 10,5 y 17,5 g/l), una fuente de nitrógeno (Urea, 3,6 g/l), y nutrientes esenciales, tales como fosfato (0,5 g/l) y sulfato (0,5 g/l) y se suplementa además con elementos traza (Fe, Mn, Zn, Cu, Co, 1-4 mg/ml). El medio se tamponó con una mezcla de MOPS/tricina dando lugar a un pH que varía de 7 a 8. Se incubó el cultivo de 1 a 5 días a 37°C/220 rpm (Infors HT® Multitron II).

10 Referencias

Protein engineering of the high-alkaline serine protease PB92 from *Bacillus alcalophilus*: functional and structural consequences of mutation at the S4 substrate binding pocket. **Teplyakov A V**, van der **Laan J M**, **Lammers A A**, **Kelders H**, **Kalk K H**, **Misset O**, **Mulleners L J**, **Dijkstra B W**. *Protein Eng.* 1992 Jul; 5 (5): 413-20.

Selection of a subtilisin-hyper producing *Bacillus* in a highly structured environment de D. **Naki**, C. **Paech**, G. **Ganshaw**, V. **Schellenberger** en *Appl Microbiol Biotechnol* (1998) 49: 290-294

Requirements for transformation in *Bacillus subtilis* de **Anagnostopoulos, C.** y **Spizizen, J.** in *J. Bacterio*/81, 741-746 (1961).

Culture Medium for Enterobacteria de Frederick C. **Neidhardt**, Philip L. **Bloch** y David F. **Smith** en *Journal of Bacteriology*, Sept 1974. p736-747 Vol. 119. No. 3.

TABLA 1

30	GG36						
	R45N	G118E	E27IR				
35	R45N	P14R					
	R45N	N204R					
40	D181N	G118D					
	R45N	G258R					
	R170S	N204R					
45	R45N	S216R					
	R170S	R14R					
	R170S	G61R					
50	R170S	S49R					
	R170S	S216R					
	R170S	S128R					
55	R170S	G258R					
	R170S	A1R					
	R170S	G100R					
60	R45N	S128R					
	R45N	G61R					
	R45N	A1R					
65	D181N	G258D					

ES 2 336 092 T3

E271T	S49E						
E271T	T66E						
E271T	G102E						
E271T	G100E						
E271T	S128E						
K27T	G100E						
K251G	S87K						

Ejemplo 2

Las variantes de proteasa producidas en el ejemplo 1 se analizaron por su rendimiento en dos tipos de detergente y condiciones de lavado utilizando un ensayo "microswatch" descrito en "An improved method of assaying for a preferred enzyme and/or preferred detergent composition", U.S. Serie No. 09/554,992 [WO 99/34011].

Las tablas 2 y 3 indican las variantes de proteasas analizadas y los resultados del análisis en dos detergentes diferentes. Para la columna A y C, el material ensayado se produjo mediante el crecimiento de las cepas transformantes en una placa MTP. Para las columnas B y D, el material ensayado se produjo mediante el crecimiento de las cepas transformantes en un matraz de agitación (250 ml). Para las columnas A y B, el detergente fue 7,6 g/l de Ariel Regular filtrado (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, USA), en una solución que contenía una dureza de 15 granos por galón de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mezclado, y se utilizaron 0,5 ppm de enzima en cada pocillo a 40°C (condiciones europeas). Para las columnas C y D, el detergente fue 0,67 g/l de Tide Opal filtrado (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, USA), en una solución que contenía una dureza de 3 granos por galón de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mezclado, y se utilizaron 0,5 ppm de enzima en cada pocillo a 20°C (condiciones japonesas). Se calculó un índice de rendimiento mediante la siguiente fórmula:

El rendimiento de lavado de la variante dividido por el rendimiento de lavado de GG36 (tipo salvaje).

Se promediaron cuatro valores del rendimiento hasta llegar a los valores de la tabla 2.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 336 092 T3

TABLA 2

5	GG36	1,00
	R170S-A1R	2,09
	GG36	1,00
10	R170S-G61R	2,03
	R170S-N204R	1,79
	R45N-G118E-E271R	1,75
15	D181N-G118D	1,54
	R45N-N204D	1,47
	K251G-S87K	1,39
20	R45N-P14R	1,28
	R45N-G258R	1,23
25	R170S-S216R	1,21
	R45N-S216R	1,05
	R170S-P14R	1,03
30	R45N-A1R	1,01
	R170S-S49R	0,93
	R45N-G61R	0,87
35	D181N-G258D	0,81
	R45N-S128R	0,80
40	R170S-S128R	0,63
	R170S-G258R	0,36
	E271T-S49E	0,34
45	E271T-G100E	*
	E271T-T66E	*
	E271T-G102E	*
50	R170S-G100R	*
	E271T-S128E	*
	K27T-G100E	*
55	* el nivel de proteasa es demasiado bajo para realizar un test de rendimiento fiable	

60

65

ES 2 336 092 T3

TABLA 3

5	Variante	Índice de rendimiento
	GG36	1,00
	E271T-G100E	3,22
10	E271T-S128E	2,33
	K251G-S87K	2,06
	K27T-G100E	2,04
15	R170S-G100R	1,79
	R170S-A1R	1,55
	E271T-T66E	1,43
20	R170S-S128R	0,85
	R170S-S49R	0,80
	R170-N204R	0,77
25	R170S-P14R	0,76
	R45N-A1R	0,75
30	R170S-G61R	0,67
	R170S-S216R	0,61
	R45N-P14R	0,53
35	R45N-G258R	0,53
	R170S-G258R	0,45
	R45N-G61R	0,43
40	R45N-S216R	0,32
	R45N-N204R	0,31
45	D181N-G258D	0,28
	D181N-G118D	0,28
	R45N-G118E-E271R	0,25
50	R45N-S128R	0,22
	E271T-T66E	*
55	* el nivel de proteasa es demasiado bajo para realizar un test de estudio fiable ¹ GG36 es la proteasa del tipo salvaje de <i>Bacillus lentus</i> (SEC ID NO. 4)	

60 Como resultado de los análisis descritos anteriormente, algunas variantes mostraron un índice de rendimiento superior al de la proteasa de tipo salvaje GG36. Por ejemplo, las variantes R45N-G118E-E271 R, R45N-P14R, R45N-N204R, D181NG118D y R45N-G258R mostraron unos índice de rendimiento de 1,75, 1,28, 1,28, 1,24 y 1,23 respectivamente (Tabla 2), en un ensayo “microswatch” (WO 99/34011) en condiciones europeas (dureza de 15 granos por galón de Ca²⁺/Mg²⁺ mezclados, 40 grados centígrados, 0,5 ppm). Las variantes R170S-A1P, R170S-G61R, R170S-N204R, K251G-S87K, y R170SS216R mostraron índices de rendimiento de 2,09, 2,03, 1,79, 1,54, 1,47, 1,39, y 1,21 respectivamente (Tabla 3). Las variantes E271T-G100E, E271T-G102E, E271T-S128E, K27T-G100E, R170S-G100R, y E271T-S49E mostraron índices de rendimiento de 3,22, 1,85, 2,33, 2,04, 1,79 y 1,43 respectivamente (Columna Tabla 3), en un ensayo en placa de 96 pocillos de microtitulación Microswatch (WO 99/34011) en condiciones

ES 2 336 092 T3

- US 5700676 E [0071]
- US 09554992 B [0126]
- EP 0251446 A [0071]

5 Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción

- **Stroud**, R. *Sci. Amer.*, vol. 131, 74-88 [0001]
- **Kraut**, J. *Annu. Rev. Biochem.*, 1977, vol. 46, 331-358 [0001]
- 10 • **Markland**, F. S. *et al. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1983, vol. 364, 1537-1540 [0002]
- **Robertus**, J. D. *et al. Biochemistry*, 1972, vol. 11, 2439-2449 [0002]
- 15 • **Robertus**, J. D. *et al. J. Biol. Chem.*, 1976, vol. 251, 1097-1103 [0002]
- **Svendsen**, B. *Carlsberg Res. Commun.*, 1976, vol. 41, 237-291 [0002]
- **Stauffer**, D. C. *et al. J. Biol. Chem.*, 1965, vol. 244, 5333-5338 [0002]
- 20 • **Wells; Estell**. *TIBS*, 1988, vol. 13, 291-297 [0002]
- **Dale**, M. W. *Molecular Genetics of Bacteria. John Wiley & Sons, Ltd, 1989* [0011]
- 25 • **Teplyakov**, A V *et al. Protein Eng.*, July 1992, vol. 5 (5), 413-20 [0052]
- **Siezen** *et al. Protein Eng.*, 1991, vol. 4 (7), 719-737 [0056]
- **D. Naki; C. Paech; G. Ganshaw; V. Schellenberger**. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, vol. 49, 290-294 [0065]
- 30 • **Microbial Proteinases. K. M. Kalisz. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. 1988** [0075]
- **K. Anstrup. Industrial Aspects of Biochemistry. 1974, 23-46** [0085]
- 35 • **Teplyakov A V ; van der Laan J M ; Lammers A A; Kelders H; Kalk KH; Misset O; Mulleners L J; Dijkstra B W.** Protein engineering of the high-alkaline serine protease PB92 from *Bacillus alcalophilus*: functional and structural consequences of mutation at the S4 substrate binding pocket. *Protein Eng.*, July 1992, vol. 5 (5), 413-20 [0122]
- 40 • **D. Naki; C. Paech; G. Ganshaw; V. Schellenberger.** Selection of a subtilisin-hyper producing Bacillus in a highly structured environment. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, vol. 49, 290-294 [0123]
- **Anagnostopoulos, C. ; Spizzen, J.** Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 1961, vol. 81, 741-746 [0124]
- 45 • **Frederick C. Neidhardt; Philip L. Bloch; David F. Smith.** Culture Medium for Enterobacteria. *Journal of Bacteriology*, September 1974, vol. 119 (3), 736-747 [0125]

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Variante de proteasa, que es una variante de una proteasa precursora de subtilisina de *Bacillus lentus* que tiene la secuencia mostrada en la figura 3, estando dicha variante **caracterizada** por tener la misma carga electrostática neta a pH 7 o el mismo punto isoeléctrico que dicha proteasa precursora, y comprender una secuencia de aminoácidos que tiene las sustituciones R170SA1R, R170S-G61R, R170S-N204R, R170S-S216R o R170S-G100R en relación a dicha proteasa precursora, donde las posiciones de dichas sustituciones son equivalentes a las posiciones especificadas en la subtilisina madura de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en la figura 3.
- 10 2. ADN que codifica una variante de proteasa según la reivindicación 1.
3. Vector de expresión que comprende el ADN según la reivindicación 2.
- 15 4. Célula huésped transformada con el vector de expresión según la reivindicación 3.
5. Composición de limpieza que comprende la variante de proteasa según la reivindicación 1.
- 20 6. Método de mejora del rendimiento del lavado de una proteasa precursora de subtilisina de *Bacillus lentus* que tiene la secuencia mostrada en la figura 3, que comprende introducir las sustituciones R170S-A1R, R170S-G61R, R170S-N204R, R170SS216R o R170S-G100R en dicha proteasa precursora para producir una variante de proteasa, donde dicha variante de proteasa tiene la misma carga electrostática neta a pH 7 o el mismo punto isoeléctrico que dicha proteasa precursora, y donde dicha variante de proteasa mejora el rendimiento de lavado en relación a dicha proteasa precursora, donde las posiciones de dichas sustituciones son equivalentes a las posiciones especificadas en la subtilisina madura de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en la figura 3.
- 25 7. Método según la reivindicación 6, que comprende modificar una secuencia de ADN que codifica dicha proteasa precursora para producir una secuencia de ADN modificada que codifica dicha variante de proteasa.
- 30 8. Método según la reivindicación 7, que comprende transformar una célula huésped con un vector que contiene dicha secuencia de ADN modificada y expresar dicha variante de proteasa a partir de la célula huésped transformada.

35

40

45

50

55

60

65

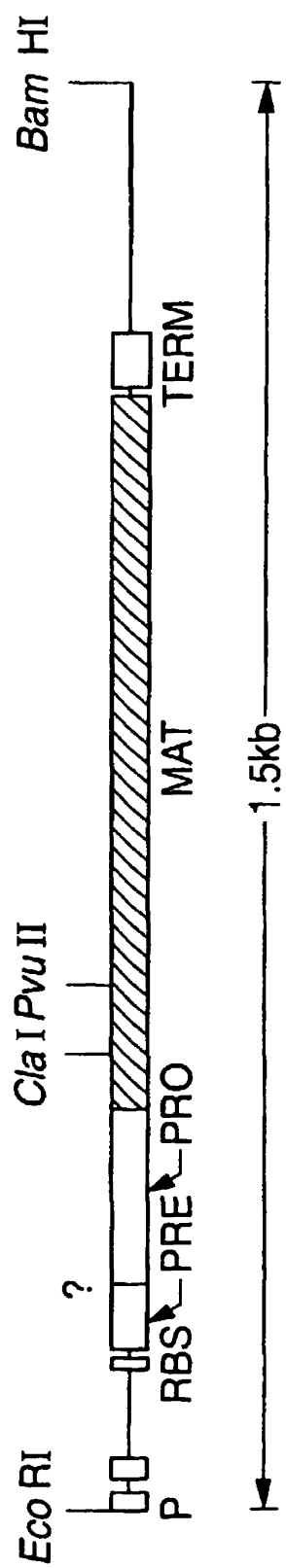


FIG. 1A

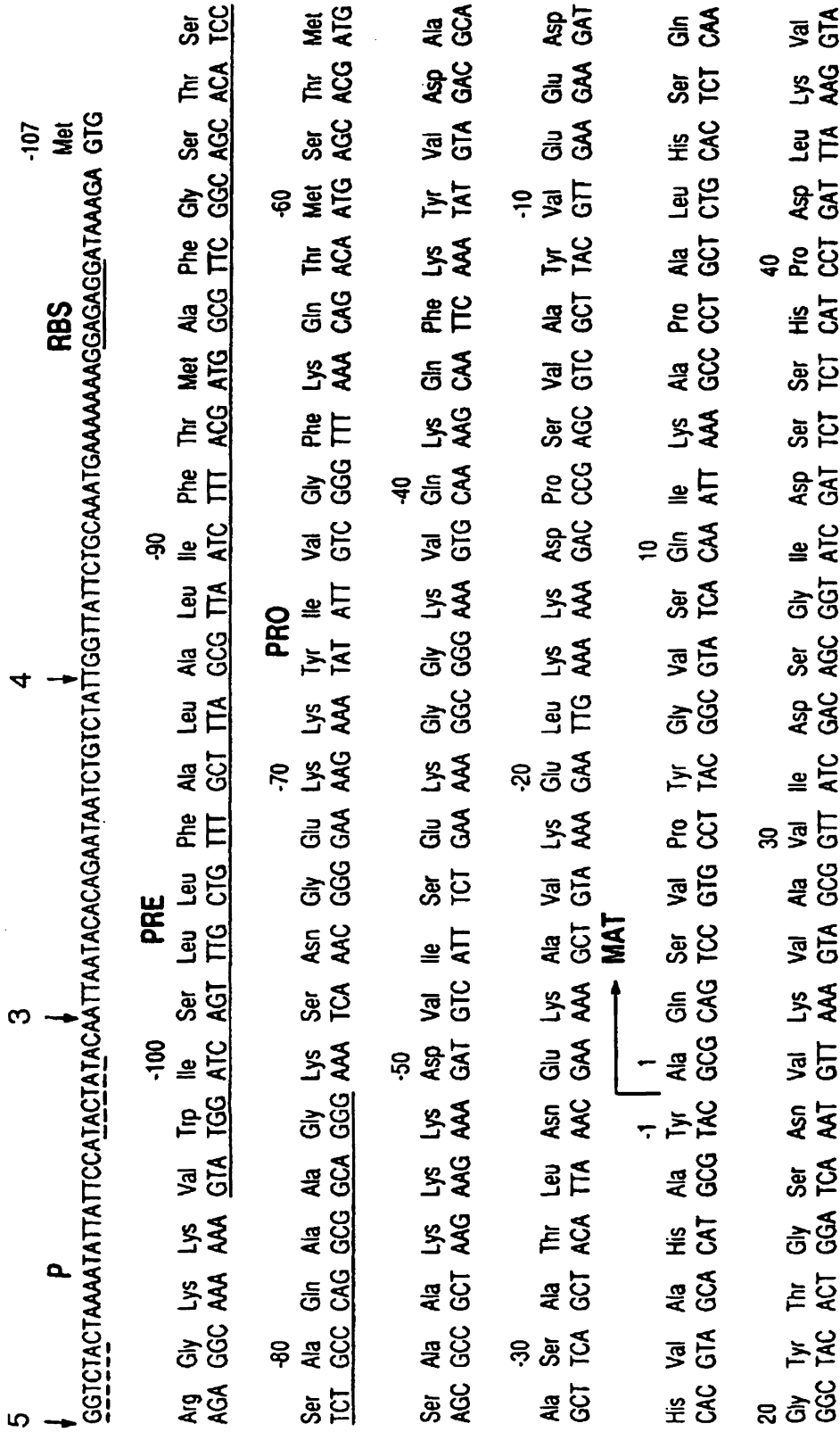


FIG.- 1B - 1

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

50 Pro Asn
 70 Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser Ala 90
 GGC ACA GTT GCG GCT CTT AAT AAC TCA ATC GGT GTA TTA GGC GTT GCG CCA AGC GCA TCA CTT TAC Tyr Ala Val Lys
 GCT GTA AAA

624 Val Leu Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu Trp Ala Ile Ala Asn Asn Met
 999 GTT CTC GGT GCT GAC GGT TCC GGC CAA TAC AGC TGG ATC ATT AAC GGA ATC GAG TGG GCG ATC GCA AAC AAT ATG
 110 Asp Ala 100

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

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

170 Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala Val Gly Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly Pro
 24 AAA TAC CCT TCT TCT GTC ATT GCA GTA GGC GCT GTT GAC AGC AGC CAA AGA GCA TCT TTC TCA AGC GTA GGA CCT
 210

199 Gly Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly
 99 GAG CTT GAT GTC ATG GCA CCT GGC GTA TCT ATC CAA AGC ACG CTT CCT GGA AAC AAA TAC GGG GCG TAC AAC GGT
 200

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

FIG.-1B - 2

ES 2 336 092 T3

Residuos conservados en subtilisinas de
Bacillus Amyloliquefaciens

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

FIG._2

FIG._3A

COMPARACIÓN DE SECUENCIAS DE SUBTILISINAS DE:

- B.amyloliquefaciens*
- B.subtilis*
- B.licheniformis*
- B.lentus*

01	10	20	30	
A Q S V P Y G V S Q I K A P A L H S Q G Y T G S N V K V A V I D S G I D S S H P P				
A Q S V P Y G I S Q I K A P A L H S Q G Y T G S N V K V A V I D S G I D S S H P P				
A Q T V P Y G I P L I K A P A D K V Q A Q G F K G A N V K V A V L D T G I Q A S H P P				
A Q S V P W G I S R V Q A P A H N R G L T G S G V K V A V L D T G I S T * H P P				
41	50	60	70	
D L K V A G G A S M V P S E T N P F Q D D N S H G T H V A G T V A A L N N S I G				
D L N V R G G A S P V P S E T N P Y Q D D G S S H G T H V A G T V I A A L N N S I G				
D L N V V G G A S P V A G E E * P S T Q D D G N G H G T H V A G T V A A L D N T T G				
D L N I R G G A S P V P G E * P S T Q D D G N G H G T H V A G T V I A A L N N S I G				
81	90	100	110	
V L G V A P S A S L Y A V K V L G A D G S G Q Y S S W I I N G I E W A I A N N M D D				
V L G V S P S A S L Y A V K V L D S T G S G Q Y S S W I I N G I E W A I S N N M D D				
V L G V A P S V S L Y A V K V L N S S G S G S Y S G I V S G I E W A T T N G M D D				
V L G V A P S A E L Y A V K V L G A S G S G S V S S I A Q G L E W A G N N G M H				
121	130	140	150	
V I N M S L G G P S G S A A L K A A V D K A V A S G V V V A A A G N E G T S S G				
V I N M S L G G P T G S S T A L K K T V V D K A V S S G I V V A A A A G N E G S S G				
V I N M S L G G A S G S T A M K Q A V V D N A Y A R G V V V A A A A G N S S G				
V A N L S L G S P S A T L E Q A V N S A T S R G V L V V A A S S G A G S				

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

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

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

FIG.-3B

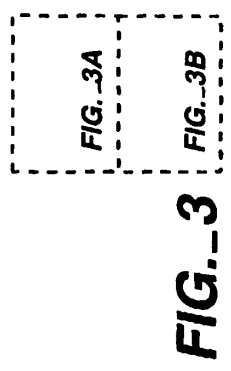


FIG.-3

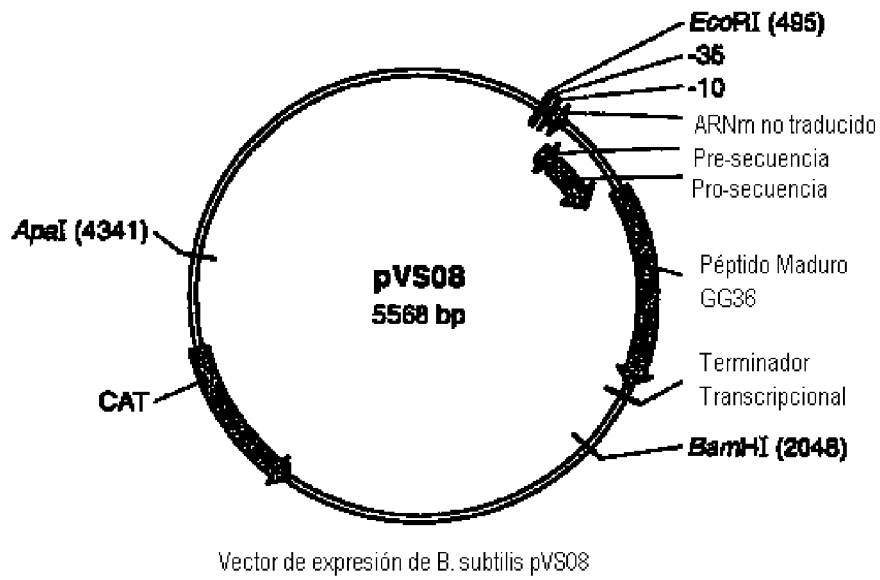


FIG._4

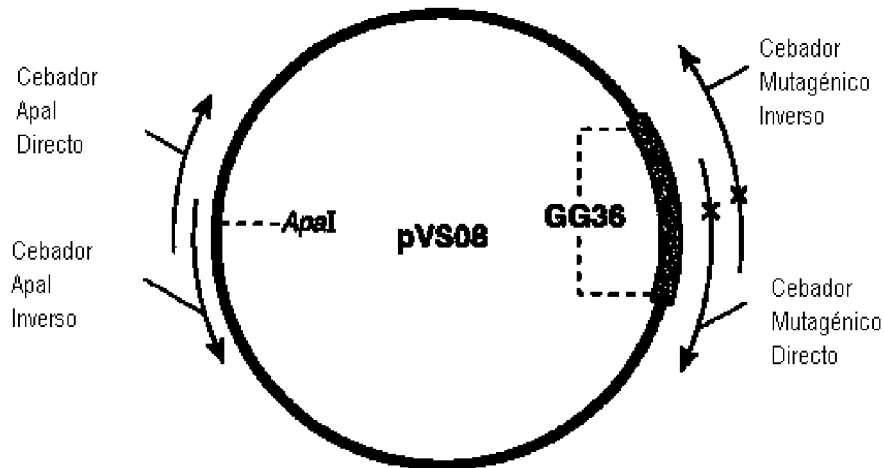


FIG._5