



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 29 577 T2** 2006.02.02

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 025 241 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 29 577.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/22572**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 956 181.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/020770**

(86) PCT-Anmeldetag: **23.10.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **29.04.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **09.08.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **30.03.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **02.02.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/57** (2006.01)

C12N 9/54 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

A23K 1/165 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

956323 **23.10.1997** **US**

956324 **23.10.1997** **US**

956564 **23.10.1997** **US**

(73) Patentinhaber:

**The Procter & Gamble Company, Cincinnati, Ohio,
US; Genencor International, Inc., Palo Alto, Calif.,
US**

(74) Vertreter:

derzeit kein Vertreter bestellt

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**SCHELLENBERGER, Volker, Palo Alto, US;
KELLIS, T., James, Portola Valley, US; PAECH,
Christian, Palo Alto, US; NADHERNY, Joanne, San
Francisco, US; NAKI, P., Donald, San Francisco,
US; POULOSE, J., Ayrookaran, Belmont, US;
COLLIER, D., Katherine, Redwood City, US;
CALDWELL, M., Robert, Redwood City, US;
BAECK, C., Andre, B-2820 Bonheiden, BE**

(54) Bezeichnung: **MEHRFACH SUBSTITUIERTE PROTEASEVARIANTEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**Verwandte Anmeldungen**

[0001] Die Anmeldung ist eine „Continuation-in-part“-Anmeldung der U.S.-Patentanmeldung 08/956,323, eingereicht am 23. Oktober 1998, der U.S.-Patentanmeldung 08/956,564, eingereicht am 23. Oktober 1998 und der U.S.-Patentanmeldung 08/956,324, eingereicht am 23. Oktober 1998, die allesamt hiermit in ihrer Gänze in diese Unterlagen aufgenommen werden.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Serinproteasen sind eine Untergruppe der Carbonylhydrolasen. Sie umfassen verschiedene Klassen von Enzymen mit einem breiten Spektrum von Spezifitäten und biologischen Funktionen. Stroud, R., Sci. Amer., 131:74-88. Trotz ihrer funktionalen Verschiedenartigkeit haben sich der katalytischen Maschinerie von Serinproteasen wenigstens zwei genetisch unterschiedliche Familien von Enzymen bedient: 1) die Subtilisine und 2) die aus Säugetieren stammenden, mit Chymotrypsin verwandten und homologen bakteriellen Serinproteasen (z.B. Trypsin und S. gresius-Trypsin). Diese beiden Familien von Serinproteasen zeigen bemerkenswert ähnliche Katalysemechanismen. Kraut, J. (1977), Annu. Rev. Biochem., 46:331-358. Darüber hinaus bringt, obwohl die Primärstruktur keine Verwandtschaft aufweist, die Tertiärstruktur von diesen zwei Enzymfamilien eine konservierte katalytische Triade von Aminosäuren, welche aus Serin, Histidin und Asparat besteht, zusammen.

[0003] Subtilisine sind Serinproteasen (MG ungefähr 27.500), die in großen Mengen durch eine große Vielzahl von Bacillus-Spezies und anderer Mikroorganismen sekretiert werden. Die Proteinsequenz von Subtilisin ist aus wenigstens neun unterschiedlichen Bacillus-Spezies bestimmt worden. Markland, F.S. et al. (1983), Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 364:1537-1540. Es ist über die dreidimensionale kristallographische Struktur von Subtilisinen aus Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus licheniformis und mehreren natürlichen Varianten von B. lentus berichtet worden. Diese Untersuchungen zeigen, dass obwohl Subtilisin mit den Serinproteasen aus Säugetieren genetisch nicht verwandt ist, es eine ähnliche Struktur im Bereich des aktiven Zentrums aufweist. Die Röntgen-Kristallstrukturen von Subtilisin, das kovalent gebundene Peptidinhibitoren (Robertus, J.D. et al. (1972), Biochemistry, 11:2439-2449) oder Produktkomplexe (Robertus, J.D. et al., (1976), J. Biol. Chem., 251:1097-1103) enthält, haben ebenfalls Informationen über das aktive Zentrum und die mutmaßliche Substratbindungsspalte von Subtilisin geliefert. Zusätzlich ist eine große Anzahl von kinetischen und chemischen, Biol. Chem., 244:5333-5338) und eine umfassende ortsspezifische Mutagenese ausgeführt worden (Wells und Estell (1988) TIBS 13:291-297).

Zusammenfassung der Erfindung

[0004] Es ist ein Gegenstand, hier Proteasevarianten bereitzustellen, die eine Aminosäuresubstitution an einer Position eines Rests, welche Position 103 von Bacillus amyloliquefaciens-Subtilisin entspricht, und eine Aminosäuresubstitution an einer Position eines Rests, welche Position 245 von Bacillus amyloliquefaciens-Subtilisin entspricht, und eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen an Positionen von Resten, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Positionen von Resten entsprechend den Positionen 1, 3, 4, 8, 10, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 27, 33, 37, 38, 42, 43, 48, 55, 57, 58, 61, 62, 68, 72, 75, 76, 77, 78, 79, 86, 87, 89, 97, 98, 99, 101, 102, 104, 106, 107, 109, 111, 114, 116, 117, 119, 121, 123, 126, 128, 130, 131, 133, 134, 137, 140, 141, 142, 146, 147, 158, 159, 160, 166, 167, 170, 173, 174, 177, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 192, 194, 198, 203, 204, 205, 206, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 222, 224, 227, 228, 230, 232, 237, 238, 240, 242, 243, 244, 246, 247, 248, 249, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 265, 268, 269, 270, 271, 272, 274 und 275 von Bacillus amyloliquefaciens-Subtilisin, enthalten, wobei, wenn eine Substitution an einer Position, die der Position eines Rests 103 entspricht, mit einer Substitution an einer Position, die der Position eines Rests 76 entspricht, kombiniert wird, es auch eine Substitution an einer oder mehreren anderen Positionen von Resten als den Positionen von Resten, die den Positionen 27, 99, 101, 104, 107, 209, 123, 128, 166, 204, 206, 210, 216, 217, 218, 222, 260, 265 oder 274 von Bacillus amyloliquefaciens-Subtilisin entsprechen, gibt.

[0005] Obwohl eine jegliche Kombination der oben aufgelisteten Aminosäuresubstitutionen eingesetzt werden kann, umfassen die bevorzugten Proteasevariante-Enzyme, die für die Erfindung nützlich sind, die Substitution von Aminosäureresten in den folgenden Kombinationen von Positionen. Alle der Positionen von Resten entsprechen Positionen von Bacillus amyloliquefaciens-Subtilisin:

- (1) eine Proteasevariante, welche Substitutionen der Aminosäurereste an Position 236 umfasst;

(2) eine Proteasevariante, die Substitutionen der Aminosäurereste an den Positionen 103 und 245 und an einer oder mehreren der folgenden Positionen 1, 9, 12, 61, 62, 68, 76, 97, 98, 101, 102, 104, 109, 130, 131, 159, 170, 183, 185, 205, 209, 210, 211, 212, 213, 215, 217, 222, 230, 232, 248, 252, 257, 260, 261, 270 und 275 umfasst; oder

(3) eine Proteasevariante, die Substitutionen der Aminosäurereste an den Positionen 103, 236 und 245 und an einer oder mehreren der folgenden Positionen 1, 9, 12, 61, 62, 68, 76, 97, 98, 101, 102, 104, 109, 130, 131, 159, 183, 185, 205, 209, 210, 211, 212, 213, 215, 217, 230, 232, 243, 248, 252, 257, 260, 270 und 275 umfasst.

[0006] Mehr bevorzugte Proteasevarianten sind Substitutionssätze, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Positionen von Resten, welche Positionen in Tabelle 1 von *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin entsprechen:

Tabelle 1

[illegible]

19	76	103	104																
13	76	103	104																
19	76	103	104																
76	103	104	184																
76	103	104	252																
76	103	104	259																
76	103	104	251																
76	86	103	104																
72	76	103	104	185															
76	103	104	237	274															
76	103	104	160																
76	103	104	228																
55	76	103	104	240															
76	103	104	254																
76	103	104	204																
76	103	104	204																
43	76	103	104																
76	103	104	159																
10	76	103	104	177															
58	76	103	104																
76	103	104	270																

[illegible]

[illegible]

76	77	103	104	133	185	251													
76	103	104	159	206	244														
4	76	103	104	188															
4	76	103	104	158															
76	77	103	104	185															
76	103	104	206	251															
48	76	103	104	111	159														
68	76	103	104	159	236														
42	76	103	104	159															
12	62	76	103	104	159														
42	76	103	104	159															
76	103	104	146	159															
76	103	104	159	238															
76	103	104	159	224															
76	103	104	212	268	271														
76	89	103	104																
76	87	103	104	212	271														
76	103	104	212	245	271														
76	103	104	134	141	212	271													
76	103	104	212	236	243	271													
76	103	104	109	245															

[illegible]

76	103	104	173	222															
76	103	104	222	263															
21	76	103	104	222	237	263													
76	103	104	109	222															
76	103	104	109	222	271														
61	76	103	104	222															
76	103	104	137	222															
76	103	104	109	222	248														
76	103	104	222	249															
68	76	103	104	159	236	245	261												
68	76	103	104	141	159	236	245	255											
68	76	103	104	159	236	245	247												
68	76	103	104	159	174	204	236	245											
68	76	103	104	159	204	236	245												
68	76	103	104	133	159	218	236	245											
68	76	103	104	159	232	236	245												
68	76	103	104	159	194	203	236	245											
12	76	103	104	222	245														
76	103	104	232	245															
24	68	76	103	104	159	232	236	245											
68	103	104	159	232	236	245	252												

68	76	103	104	159	213	232	236	245	260			
12	76	103	104	222	244	245						
12	76	103	222	210	245							
12	76	103	104	130	222	245						
22	68	76	103	104								
68	76	103	104	184								
68	103	104	159	232	236	245	248	252				
68	103	104	159	232	236	245						
68	103	104	140	159	232	236	245	252				
43	68	103	104	159	232	236	245	252				
43	68	103	104	159	232	236	245					
43	68	103	104	159	232	236	245	252				
68	87	103	104	159	232	236	245	252	275			
12	76	103	104	130	222	245	248	262				
12	76	103	104	130	215	222	245					
12	76	103	104	130	222	227	245	262				
12	76	103	104	130	222	245	261					
76	103	104	130	222	245							
12	76	103	104	130	218	222	245	262	269			
12	57	76	103	104	130	222	245	251				
12	76	103	104	130	170	185	222	243	245			

12	76	103	104	130	222	245	268
12	76	103	104	130	222	210	245
68	103	104	159	232	236	245	257
68	103	104	116	159	232	236	245
68	103	104	159	232	236	245	248
10	68	103	104	159	232	236	245
68	103	104	159	203	232	236	245
68	103	104	159	232	236	237	245
68	76	79	103	104	159	232	236
68	103	104	159	183	232	236	245
68	103	104	159	174	206	232	236
68	103	104	159	188	232	236	245
68	103	104	159	230	232	236	245
68	98	103	104	159	232	236	245
68	103	104	159	215	232	236	245
68	103	104	159	232	236	245	248
68	76	103	104	159	232	236	245
68	76	103	104	159	210	232	236
68	76	103	104	159	232	236	245
76	103	104	232	236	245	257	
68	103	104	159	232	236	245	275

[illegible]

27	68	76	103	104	159	232	236	245				
68	76	103	104	116	159	170	185	232	236	245		
61	68	103	104	159	232	236	245	248	252			
43	68	103	104	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	212	232	236	245	248	252			
68	103	104	99	159	184	232	236	245	248	252		
103	104	159	232	236	245	248	252					
68	103	104	159	209	232	236	245	248	252			
68	103	104	109	159	232	236	245	248	252			
20	68	103	104	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	209	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	232	236	245	248	252	261			
68	103	104	159	185	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	210	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	185	210	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	212	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	213	232	236	245	248	252			
68	103	104	213	232	236	245	248	252				
68	103	104	159	215	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	216	232	236	245	248	252			
20	68	103	104	159	232	236	245	248	252			

68	103	104	104	159	173	232	236	245	248	252			
68	103	104	104	159	232	236	245	248	251	252			
68	103	104	104	159	206	232	236	245	248	252			
68	103	104	104	159	232	236	245	248	252				
55	68	103	104	104	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	104	159	232	236	245	248	252	255			
68	103	104	104	159	232	236	245	248	252	256			
68	103	104	104	159	232	236	245	248	252	260			
68	103	104	104	159	232	236	245	248	252	257			
68	103	104	104	159	232	236	245	248	252	258			
8	68	103	104	104	159	232	236	245	248	252	269		
68	103	104	104	116	159	232	236	245	248	252	260		
68	103	104	104	159	232	236	245	248	252	261			
68	103	104	104	159	232	236	245	248	252	261			
68	76	103	104	104	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	104	232	236	245	248	252					
103	104	159	159	232	236	245	248	252					
68	103	104	104	159	232	236	245	248	252				
18	68	103	104	104	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	104	159	232	236	245	248	252				
68	76	101	103	104	104	159	213	218	232	236	245	260	

68	103	104	159	228	232	236	245	248	252			
33	68	76	103	104	159	232	236	245	248	252		
68	76	89	103	104	159	210	213	232	236	245	260	
61	68	76	103	104	159	232	236	245	248	252		
103	104	159	205	210	232	236	245					
61	68	103	104	130	159	232	236	245	248	252		
61	68	103	104	133	137	159	232	236	245	248	252	
61	103	104	133	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	232	236	245	248	252				
68	103	104	159	218	232	236	245	248	252			
61	68	103	104	459	160	232	236	245	248	252		
3	61	68	76	103	104	232	236	245	248	252		
61	68	103	104	159	167	232	236	245	248	252		
97	103	104	159	232	236	245	248	252				
98	103	104	159	232	236	245	248	252				
99	103	104	159	232	236	245	248	252				
101	103	104	159	232	236	245	248	252				
102	103	104	159	232	236	245	248	252				
103	104	106	159	232	236	245	248	252				
103	104	109	159	232	236	245	248	252				
103	104	159	232	236	245	248	252	261				

62	103	104	159	232	236	245	248	252				
103	104	159	184	232	236	245	248	252				
103	104	159	166	232	236	245	248	252				
103	104	159	217	232	236	245	248	252				
20	62	103	104	159	213	232	236	245	248	252		
62	103	104	159	213	232	236	245	248	252			
103	104	159	206	217	232	236	245	248	252			
62	103	104	159	206	232	236	245	248	252			
103	104	130	159	232	236	245	248	252				
103	104	131	159	232	236	245	248	252				
27	103	104	159	232	236	245	248	252				
38	103	104	159	232	236	245	248	252				
38	76	103	104	159	213	232	236	245	260			
68	76	103	104	159	213	232	236	245	260	271		
68	76	103	104	159	209	213	232	236	245	260		
68	76	103	104	159	210	213	232	236	245	260		
68	76	103	104	159	205	213	232	236	245	260		
68	76	103	104	159	210	232	236	245	260			
68	103	104	159	213	232	236	245	260				
76	103	104	159	213	232	236	245	260				
68	103	104	159	209	232	236	245					

68	103	104	159	210	232	236	245						
68	103	104	159	230	232	236	245						
68	103	104	159	126	232	236	245						
68	103	104	159	205	232	236	245						
68	103	104	159	210	232	236	245						
103	104	159	230	236	245								
68	103	104	159	232	236	245	260						
103	104	159	232	236	245								
68	103	104	159	174	232	236	245	257					
68	103	104	159	194	232	236	245	257					
68	103	104	159	209	232	236	245	257					
103	104	159	232	236	245	257							
68	76	103	104	159	213	232	236	245	260	261			
68	103	104	159	232	236	245	257	261					
103	104	159	213	232	236	245	260						
103	104	159	210	232	236	245	248	252					
103	104	159	209	232	236	245	257						
68	76	103	104	159	210	213	232	236	245	260			
12	103	104	159	209	213	232	236	245	260				
103	104	209	232	236	245	257							
103	104	159	205	210	213	232	236	245	260				

103	104	159	205	209	232	236	245	260				
68	103	104	159	205	209	210	232	236	245			
103	104	159	205	209	210	232	236	245	257			
103	104	159	205	209	232	236	245	257				
68	103	104	159	205	209	210	232	236	245	260		
103	104	159	205	209	210	232	236	245				
103	104	159	209	210	232	236	245					
103	104	159	205	210	232	236	245					
68	103	104	128	159	232	236	245					
48	103	104	159	230	236	245						
48	68	103	104	159	209	232	236	245				
48	68	103	104	159	232	236	245	248	252			
48	68	103	104	159	232	236	245	257	261			
102	103	104	159	212	232	236	245	248	252			
12	102	103	104	159	212	232	236	245	248	252		
101	102	103	104	159	212	232	236	245	248	252		
98	102	103	104	159	212	232	236	245	248	252		
102	103	104	159	213	232	236	245	248	252			
103	104	131	159	232	236	245	248	252				
103	104	159	184	232	236	245	248	252				
103	104	159	232	236	244	245	248	252				

62	103	104	159	213	232	236	245	248	252	256		
12	62	103	104	159	213	232	236	245	248	252		
101	103	104	159	185	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	206	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	213	232	236	245	248	252			
98	102	103	104	159	232	236	245	248	252			
101	102	103	104	159	232	236	245	248	252			
98	102	103	104	159	212	232	236	245	248	252		
98	102	103	104	159	212	232	236	248	252			
62	103	104	109	159	213	232	236	245	248	252		
62	103	104	159	212	213	232	236	245	248	252		
62	101	103	104	159	212	213	232	236	245	248	252	
103	104	159	232	245	248	252						
103	104	159	230	245								
62	103	104	130	159	213	232	236	245	248	252		
101	103	104	130	159	232	236	245	248	252			
101	103	104	128	159	232	236	245	248	252			
62	101	103	104	159	213	232	236	245	248	252		
62	103	104	128	159	213	232	236	245	248	252		
62	103	104	128	159	213	232	236	245	248	252		
101	103	104	159	232	236	245	248	252	260			

101	103	104	131	159	232	236	245	248	252			
98	101	103	104	159	232	236	245	248	252			
99	101	103	104	159	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	212	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	209	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	210	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	205	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	230	236	245						
101	103	104	159	194	232	236	245	248	252			
76	101	103	104	159	194	232	236	245	248	252		
101	103	104	159	230	232	236	245	248	252			
62	103	104	159	185	206	213	232	236	245	248	252	271

[0007] Die am meisten bevorzugten Proteasevarianten sind diejenigen, die in Tabelle 3 gezeigt sind.

[0008] Es ist ein weiterer Gegenstand, DNA-Sequenzen, die solche Proteasevarianten kodieren, wie auch Expressionsvektoren, die solche abgewandelten DNA-Sequenzen enthalten, bereitzustellen.

[0009] Noch weiter besteht ein anderer Gegenstand der Erfindung darin, Wirtszellen, die mit solchen Vektoren transformiert sind, wie auch Wirtszellen, die in der Lage sind, eine derartige DNA zu exprimieren, um Proteasevarianten entweder intrazellulär oder extrazellulär herzustellen, bereitzustellen.

[0010] Es wird des weiteren eine Reinigungszusammensetzung bereitgestellt, welche eine Proteasevariante der Erfindung umfasst.

[0011] Zusätzlich wird ein Tierfutter bereitgestellt, welches eine Proteasevariante der Erfindung umfasst.

[0012] Ebenfalls bereitgestellt wird eine Zusammensetzung für die Behandlung eines Gewebes, welche eine Proteasevariante der Erfindung umfasst.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0013] Die **Fig. 1A** - 1C zeigen die DNA- und Aminosäuresequenz für *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin

und eine partielle Restriktionskarte dieses Gens.

[0014] [Fig. 2](#) zeigt die konservierten Aminosäurereste zwischen den Subtilisinen aus *Bacillus amyloliquefaciens* (BPN') und *Bacillus lentus* (Wildtyp).

[0015] Die [Fig. 3A](#) und [Fig. 3B](#) zeigen die Aminosäuresequenz von vier Subtilisinen. Die obere Zeile repräsentiert die Aminosäuresequenz von Subtilisin aus *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin (manchmal auch als Subtilisin BPN' bezeichnet). Die zweite Zeile zeigt die Aminosäuresequenz von Subtilisin aus *Bacillus subtilis*. Die dritte Zeile zeigt die Aminosäuresequenz von Subtilisin aus *Bacillus licheniformis*. Die vierte Zeile zeigt die Aminosäuresequenz von Subtilisin aus *Bacillus lentus* (auch bezeichnet als Subtilisin 309 in PCT WO89/06276). Das Symbol * bezeichnet das Fehlen von speziellen Aminosäureresten verglichen mit dem Subtilisin BPN'.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0016] Proteasen sind Carbonylhydrolasen, die allgemein wirksam werden, um Peptidbindungen von Proteinen oder Peptiden zu spalten. Wie hier verwendet, bedeutet „Protease“ eine in der Natur vorkommende Protease oder eine rekombinante Protease. In der Natur vorkommende Proteasen umfassen α -Aminoacylpeptidhydrolase, Peptidylaminosäurehydrolase, Acylaminohydrolase, Serincarboxypeptidase, Metallo-carboxypeptidase, Thioproteinase, Carboxylproteinase und Metalloproteinase. Es werden Serin-, Metallo-, Thiol- und saure Proteasen mit umfasst wie auch Endo- und Exoproteasen.

[0017] Die Erfindung umfasst Proteaseenzyme, die in der Natur nicht vorkommende Carbonylhydrolasevarianten (Proteasevarianten) mit einer unterschiedlichen proteolytischen Aktivität, Stabilität, Substratspezifität, pH-Profil und/oder Leistungseigenschaft verglichen mit der Vorläufer-Carbonylhydrolase, von welcher die Aminosäuresequenz der Variante abgeleitet ist, sind. Speziell weisen solche Proteasevarianten eine Aminosäuresequenz auf, die in der Natur nicht gefunden wird, die durch Substitution einer Mehrzahl von Aminosäureresten einer Vorläufer-Protease durch unterschiedliche Aminosäuren abgeleitet ist. Die Vorläufer-Protease kann eine in der Natur vorkommende Protease oder rekombinante Protease sein.

[0018] Die Proteasevarianten, die hier nützlich sind, umfassen die Substitution einer jeglichen der neunzehn, in der Natur vorkommenden L-Aminosäuren an den bezeichneten Aminosäurerestpositionen. Solche Substitutionen können bei einem jeglichen Vorläufer-Subtilisin (prokaryotisch, eukaryotisch, aus Säugetieren u.s.w.) vorgenommen werden. In dieser gesamten Anmeldung wird auf verschiedene Aminosäuren mittels der üblichen Ein- und Drei-Buchstaben-Codes Bezug genommen. Solche Codes werden in Dale, M.W. (1989), *Molecular Genetics of Bacteria*, John Wiley & Sons, Ltd., Anhang B, identifiziert.

[0019] Die Proteasevarianten, die hier nützlich sind, sind vorzugsweise von einem *Bacillus*-Subtilisin abgeleitet. Die Proteasevarianten sind von *Bacillus lentus*-Subtilisin und/oder Subtilisin 309 abgeleitet.

[0020] Subtilisine sind bakterielle oder pilzliche Proteasen, die allgemein wirksam werden, um Peptidbindungen von Proteinen oder Peptiden zu spalten. Wie hier verwendet, bedeutet „Subtilisin“ ein in der Natur vorkommendes Subtilisin oder ein rekombinantes Subtilisin. Eine Reihe von in der Natur vorkommenden Subtilisinen wird bekanntermaßen von verschiedenen mikrobiellen Spezies produziert und oftmals sekretiert. Aminosäuresequenzen von den Mitgliedern dieser Reihe sind nicht vollständig homolog. Jedoch zeigen die Subtilisine in dieser Reihe die gleiche oder eine ähnliche Art von proteolytischer Aktivität. Diese Klasse von Serinproteasen weist eine gemeinsame Aminosäuresequenz auf, die eine katalytische Triade definiert, die diese von der mit Chymotrypsin verwandten Klasse von Serinproteasen unterscheidet. Die Subtilisine und mit Chymotrypsin verwandten Serinproteasen weisen beide eine katalytische Triade auf, die Aspartat, Histidin und Serin umfasst. Bei den mit Subtilisin verwandten Proteasen ist die relative Reihenfolge von diesen Aminosäuren, gelesen vom Amino- zum Carboxyterminus, Aspartat-Histidin-Serin. Bei den mit Chymotrypsin verwandten Proteasen ist die relative Reihenfolge jedoch Histidin-Aspartat-Serin. So bezieht sich Subtilisin hier auf eine Serinprotease, die die katalytische Triade von mit Subtilisin verwandten Proteasen aufweist. Beispiele umfassen, sind aber nicht beschränkt auf die hier in [Fig. 3](#) identifizierten Subtilisine. Im Allgemeinen und für die Zwecke der Erfindung entspricht die Nummerierung der Aminosäuren in Proteasen den Nummern, die der in [Fig. 1](#) aufgeführten Sequenz von reifem *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin zugewiesen wurden.

[0021] „Rekombinantes Subtilisin“ oder „rekombinante Protease“ beziehen sich auf ein Subtilisin oder eine Protease, bei dem bzw. der die das Subtilisin oder die Protease kodierende DNA-Sequenz so modifiziert ist, dass eine abgewandelte (oder mutierte) DNA-Sequenz hergestellt wird, die die Substitution, Deletion oder In-

sertion von einer oder mehreren Aminosäuren in der in der Natur vorkommenden Aminosäuresequenz kodiert. Geeignete Verfahren, um solche Modifikationen herzustellen, und die mit jenen, die hier offenbart werden, kombiniert werden können, umfassen jene, die in dem U.S.-Patent RE 34,606, U.S.-Patent 5,204,015 und U.S.-Patent 5,185,258, U.S.-Patent 5,700,676, U.S.-Patent 5,801,038 und U.S.-Patent 5,763,257 offenbart werden.

[0022] „Nicht-humane Subtilisine“ und die DNA, die diese kodiert, können aus vielen prokaryotischen und eukaryotischen Organismen erhalten werden. Geeignete Beispiele von prokaryotischen Organismen umfassen gramnegative Organismen, wie *E. coli* oder *Pseudomonas*, und grampositive Bakterien, wie *Micrococcus* oder *Bacillus*. Beispiele von eukaryotischen Organismen, aus welchen Subtilisin und deren Gene erhalten werden können, umfassen Hefe, wie *Saccharomyces cerevisiae*, Pilze, wie *Aspergillus*-Spezies.

[0023] Eine „Proteasevariante“ hat eine Aminosäuresequenz, die von der Aminosäuresequenz einer „Vorläufer-Protease“ abgeleitet ist. Die Vorläufer-Proteasen umfassen in der Natur vorkommende Proteasen und rekombinante Proteasen. Die Aminosäuresequenz der Proteasevariante ist von der Aminosäuresequenz der Vorläufer-Protease „abgeleitet“ durch die Substitution, Deletion oder Insertion von einer oder mehreren Aminosäuren der Vorläufer-Aminosäuresequenz. Solche Modifikationen erfolgen an der „Vorläufer-DNA-Sequenz“, welche die Aminosäuresequenz der Vorläufer-Protease kodiert, anstelle einer Manipulation des Vorläufer-Proteaseenzyms per se. Geeignete Methoden für eine derartige Manipulation der Vorläufer-DNA-Sequenz umfassen Methoden, die hier offenbart werden, wie auch Verfahren, die den Fachleuten auf diesem Gebiet bekannt sind (siehe beispielsweise EP 0 328299, WO89/06279 und die U.S.-Patente und Anmeldungen, auf die hier bereits Bezug genommen worden ist).

[0024] Es werden hier spezielle Substitutionen, welche Position 103 entsprechen, in Kombination mit einer oder mehreren der folgenden Substitutionen, die den Positionen 1, 3, 4, 8, 10, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 27, 33, 37, 38, 42, 43, 48, 55, 57, 58, 61, 62, 68, 72, 75, 76, 77, 78, 79, 86, 87, 89, 97, 98, 99, 101, 102, 104, 106, 107, 109, 111, 114, 116, 117, 119, 121, 123, 126, 128, 130, 131, 133, 134, 137, 140, 141, 142, 146, 147, 158, 159, 160, 166, 167, 170, 173, 174, 177, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 192, 194, 198, 203, 204, 205, 206, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 222, 224, 227, 228, 230, 232, 236, 237, 238, 240, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 265, 268, 269, 270, 271, 272, 274 und 275 von *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin entsprechen, identifiziert.

[0025] Bevorzugte Varianten sind diejenigen, die Kombinationen von Substitutionen an Positionen von Resten, die Positionen von *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin in Tabelle 1 entsprechen, aufweisen. Mehr bevorzugte Varianten sind diejenigen, die Kombinationen von Substitutionen an Positionen von Resten, welche Positionen von *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin in Tabelle 3 entsprechen, aufweisen.

[0026] Weitere bevorzugte Varianten sind jene, die Kombinationen von Substitutionen an Positionen von Resten, die Positionen von *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin in Tabelle 2 entsprechen, aufweisen.

Tabelle 2

76	103	104	222	245															
76	103	104	222	249															
68	103	104	159	232	236	245	252												
68	76	103	104	159	213	232	236	245	260										
22	68	76	103	104															
68	103	104	159	232	236	245	248	252											
68	103	104	159	232	236	245													
68	103	104	140	159	232	236	245	252											
43	68	103	104	159	232	236	245	252											
43	68	103	104	159	232	236	245												
12	76	103	104	130	222	245	261												
76	103	104	130	222	245														
68	103	104	159	232	236	245	257												
68	76	103	104	159	210	232	236	245											
68	103	104	159	224	232	236	245	257											
76	103	104	159	232	236	245	257												
68	76	103	104	159	211	232	236	245											
12	68	76	103	104	159	214	232	236	245										
68	76	103	104	159	215	232	236	245											

12	68	76	103	104	159	232	236	245			
20	68	76	103	104	159	232	236	245	259		
68	76	87	103	104	159	232	236	245	260		
68	76	103	104	159	232	236	245	261			
12	48	68	76	103	104	159	232	236	245		
76	103	104	159	192	232	236	245				
76	103	104	147	159	232	236	245	248	251		
12	68	76	103	104	159	232	236	245	272		
68	76	103	104	159	183	206	232	236	245		
68	76	103	104	159	206	232	236	245			
68	76	103	104	159	206	232	236	245			
27	68	76	103	104	159	232	236	245			
68	103	104	159	212	232	236	245	248	252		
103	104	159	232	236	245	248	252				
68	103	104	159	209	232	236	245	248	252		
68	103	104	109	159	232	236	245	248	252		
20	68	103	104	159	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	209	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	210	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	212	232	236	245	248	252		

68	103	104	159	213	232	236	245	248	252			
68	103	104	213	232	236	245	248	252				
68	103	104	159	215	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	216	232	236	245	248	252			
20	68	103	104	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	232	236	245	248	252	255			
68	103	104	159	232	236	245	248	252	256			
68	103	104	159	232	236	245	248	252	260			
68	103	104	159	228	232	236	245	248	252			
68	76	89	103	104	159	210	213	232	236	245	260	
68	103	104	159	218	232	236	245	248	252			

[0027] Diese Aminosäurepositionsnummern beziehen sich auf jene, die der in **Fig. 1** aufgeführten Sequenz von reifem *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin zugewiesen worden sind. Die Erfindung ist jedoch nicht auf die Mutation dieses speziellen Subtilisins beschränkt, sondern erstreckt sich auf Vorläufer-Proteasen, die Aminosäurereste an Positionen, die zu den jeweiligen identifizierten Resten in *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin „äquivalent“ sind, enthalten. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die Vorläufer-Protease *Bacillus lentus*-Subtilisin und die Substitutionen werden an den äquivalenten Positionen von Aminosäureresten in *B. lentus*, welche jenen, die oben aufgelistet worden sind, entsprechen, vorgenommen.

[0028] Eine Position eines Rests (einer Aminosäure) einer Vorläufer-Protease ist äquivalent zu einem Rest von *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin, wenn sie entweder homolog (d.h. entsprechend hinsichtlich der Position entweder in der Primär- oder Tertiärstruktur) oder analog zu einem bestimmten Rest oder Abschnitt jenes Rests in *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin ist (d.h. mit dem gleichen oder einem ähnlichen funktionalen Vermögen, eine Bindung oder Assoziation einzugehen, zu reagieren oder chemisch zu wechselwirken).

[0029] Um Homologie zu einer Primärstruktur zu ermitteln, wird die Aminosäuresequenz einer Vorläufer-Protease direkt mit der Primärsequenz des *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisins und insbesondere mit einem Satz von Resten, der bekanntermaßen in Subtilisinen, für welche die Sequenz bekannt ist, unveränderlich ist, verglichen. Beispielsweise zeigt **Fig. 2** hier die konservierten Reste, wie sie zwischen *B. amyloliquefaciens*-Subtilisin und *B. lentus*-Subtilisin bestehen. Nach gegenseitiger Ausrichtung anhand von Homologie („Alignment“) der konservierten Reste, wobei erforderliche Insertionen und Deletionen, um die gegenseitige Ausrichtung anhand von Homologie („Alignment“) aufrecht zu erhalten (d.h. Vermeiden der Beseitigung von konservierten Resten durch willkürliche Deletion und Insertion), zugelassen werden, werden die Reste, die

zu bestimmten Aminosäuren in der Primärsequenz von *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin äquivalent sind, definiert. Eine Ausrichtung anhand von Homologie („Alignment“) von konservierten Resten sollte vorzugsweise 100% von solchen Resten bewahren. Jedoch ist auch eine Ausrichtung anhand von Homologie („Alignment“) von mehr als 75% oder von so wenig wie 50% der konservierten Reste adäquat, um äquivalente Reste zu definieren. Die Konservierung der katalytischen Triade, Asp32/His64/Ser221, sollte beibehalten werden. Siezen et al. (1991) *Protein Eng.* 4(7):719-737, zeigen die Ausrichtung anhand von Homologie („Alignment“) einer großen Anzahl von Serinproteasen. Siezen et al. beziehen sich auf die Einstufung als Subtilasen oder Subtilisin-artige Serinproteasen.

[0030] Beispielsweise sind in [Fig. 3](#) die Aminosäuresequenz von Subtilisin aus *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* (carlsbergensis) und *Bacillus lentus* gegenseitig anhand von Homologie ausgerichtet („Alignment“), um das maximale Ausmaß von Homologie zwischen Aminosäuresequenzen zu ermöglichen. Ein Vergleich von diesen Sequenzen zeigt, dass es eine Anzahl von konservierten Resten, die in jeder Sequenz enthalten sind, gibt. Diese konservierten Reste (wie beispielsweise zwischen BPN' und *B. lentus*) sind in [Fig. 2](#) angegeben.

[0031] Diese konservierten Reste können dementsprechend verwendet werden, um die entsprechenden äquivalenten Aminosäurereste von *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin in anderen Subtilisinen, wie beispielsweise Subtilisin aus *Bacillus lentus* (PCT-Veröffentlichung Nr. WO 89/06279, veröffentlicht am 13. Juli 1989), das hier bevorzugte Protease-Vorläufer-Enzym, oder dem Subtilisin, das als PB92 bezeichnet wird (EP 0 328 299), das zu dem bevorzugten *Bacillus lentus*-Subtilisin hochgradig homolog ist, zu definieren. Die Aminosäuresequenz von bestimmten von diesen Subtilisinen sind in den [Fig. 3A](#) und [Fig. 3B](#) gegenüber der Sequenz von *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin anhand von Homologie ausgerichtet („Alignment“), um die maximale Homologie von konservierten Resten herzustellen. Wie ersehen werden kann, gibt es eine Anzahl von Deletionen in der Sequenz von *Bacillus lentus* verglichen mit dem *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin. So ist beispielsweise die äquivalente Aminosäure für Val165 in *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin in den anderen Subtilisinen Isoleucin für *B. lentus* und *B. licheniformis*.

[0032] „Äquivalente Reste“ können auch durch Bestimmung der Homologie auf der Ebene der Tertiärstruktur für eine Vorläufer-Protease, deren Tertiärstruktur durch Röntgenkristallographie bestimmt worden ist, definiert werden. Äquivalente Reste werden als diejenigen definiert, bei denen die Atomkoordinaten von zwei oder mehreren der Hauptkettenatome eines bestimmten Aminosäurerests der Vorläufer-Protease und von *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin (N gegenüber N, CA gegenüber CA, C gegenüber C und O gegenüber O) nach der gegenseitigen Ausrichtung anhand von Homologie („Alignment“) innerhalb von 0,13 nm und vorzugsweise 0,1 nm liegen. Die gegenseitige Ausrichtung anhand von Homologie („Alignment“) wird erreicht, nachdem das beste Modell so orientiert und positioniert worden ist, dass die maximale Überlappung der Atomkoordinaten von Nicht-Wasserstoff-Proteinatomen der fraglichen Protease mit dem *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin erhalten wird. Das beste Modell ist das kristallographische Modell, das den niedrigsten R-Faktor für experimentelle Beugungsdaten bei der höchsten verfügbaren Auflösung liefert.

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

[0033] Äquivalente Reste, die funktional analog zu einem bestimmten Rest von *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin sind, werden als jene Aminosäuren der Vorläufer-Protease definiert, die eine solche Konformation annehmen können, dass sie die Proteinstruktur, die Substratbindung oder die Katalyse in einer definierten Weise und einer Weise, die einem bestimmten Rest des *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin zugeschrieben wird, entweder verändern, modifizieren oder dazu beitragen. Ferner sind sie jene Reste der Vorläufer-Protease (für welche eine Tertiärstruktur durch Röntgenkristallographie erhalten worden ist), die eine analoge Position einnehmen in dem Ausmaß, dass, obwohl die Hauptkettenatome des gegebenen Rests die Äquivalenzkriterien auf der Grundlage der Einnahme einer homologen Position möglicherweise nicht erfüllen, die Atomkoordinaten von wenigstens zwei der Seitenkettenatome des Rests innerhalb von 0,13 nm der entsprechenden Seitenkettenatome von *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin liegen. Die Koordinaten der dreidimensionalen Struktur von *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin sind in der EPA-Veröffentlichung Nr. 0 251 446 (äquivalent zu dem U.S.-Patent 5,182,204, dessen Offenbarung in diese Unterlagen unter Bezugnahme aufgenommen wird) angegeben und können, wie oben erläutert, verwendet werden, um äquivalente Reste auf der Ebene der Tertiärstruktur zu bestimmen.

[0034] Einige der hinsichtlich einer Substitution identifizierten Reste sind konservierte Reste, wohingegen andere dies nicht sind. In dem Falle von Resten, die nicht konserviert sind, ist die Substitution von einer oder meh-

rerer Aminosäuren auf Substitutionen beschränkt, die eine Variante erzeugen, die eine Aminosäuresequenz aufweist, die keiner, die in der Natur gefunden wird, entspricht. In dem Falle von konservierten Resten sollten solche Substitutionen nicht zu einer in der Natur vorkommenden Sequenz führen. Die Proteasevarianten der Erfindung umfassen die reifen Formen von Proteasevarianten wie auch die Pro- und Präpro-Formen von solchen Proteasevarianten. Die Präpro-Formen sind die bevorzugten Konstruktion, da diese die Expression, Sekretion und Reifung der Proteasevarianten vereinfacht.

[0035] „Prosequenz“ bezieht sich auf eine Sequenz von Aminosäuren, die an den N-terminalen Abschnitt der reifen Form einer Protease gebunden ist, die, wenn sie entfernt wird, zu dem Auftreten der „reifen“ Form der Protease führt. Viele proteolytische Enzyme werden in der Natur als translationale Proenzym-Produkte gefunden und werden bei Fehlen einer posttranslationalen Prozessierung auf diese Weise exprimiert. Eine bevorzugte Prosequenz für die Herstellung von Proteasevarianten ist die mutmaßliche Prosequenz von *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin, obwohl andere Protease-Prosequenzen verwendet werden können.

[0036] Eine „Signalsequenz“ oder „Präsequenz“ bezieht sich auf eine jegliche Sequenz von Aminosäuren, die an den N-terminalen Abschnitt einer Protease oder an den N-terminalen Abschnitt einer Proprotease gebunden ist und die an der Sekretion der reifen Form oder Pro-Formen der Protease teilnehmen kann. Die Definition der Signalsequenz ist eine funktionale, was bedeutet, dass diese alle jene durch den N-terminalen Abschnitt des Proteasegens kodierten Aminosäuresequenzen umfasst, die an der Bewirkung der Sekretion der Protease unter nativen Bedingungen teilnehmen. Die Erfindung setzt solche Sequenzen ein, um die Sekretion der Proteasevarianten, wie hier definiert, zu bewirken. Eine mögliche Signalsequenz umfasst die ersten sieben Aminosäurereste der Signalsequenz aus *Bacillus subtilis*-Subtilisin, fusioniert mit dem Rest der Signalsequenz des Subtilisins aus *Bacillus lentus* (ATCC 21536).

[0037] Eine „Präpro“-Form einer Proteasevariante besteht aus der reifen Form der Protease, die eine Prosequenz, die funktional oder operativ mit dem Aminoterminus der Protease verknüpft ist, und eine „Prä“- oder „Signal“sequenz, die funktional oder operativ mit dem Aminoterminus der Prosequenz verknüpft ist, aufweist.

[0038] „Expressionsvektor“ bezieht sich auf ein DNA-Konstrukt, welches eine DNA-Sequenz enthält, die funktional oder operativ mit einer geeigneten Kontrollsequenz, die in der Lage ist, die Expression der DNA in einem geeigneten Wirt zu bewirken, verknüpft ist. Solche Kontrollsequenzen umfassen einen Promotor, um die Transkription zu bewirken, eine optionale Operatorsequenz, um eine solche Transkription zu kontrollieren, eine Sequenz, welche geeignete mRNA-Ribosomenbindungsstellen kodiert, und Sequenzen, die die Termination von Transkription und Translation kontrollieren. Ein Vektor kann ein Plasmid, ein Phagenpartikel oder einfach ein potentiell genomisches Insert sein. Ist damit einmal ein geeigneter Wirt transformiert, kann der Vektor replizieren und unabhängig von dem Wirtsgenom funktionieren oder kann in einigen Fällen sich in das Genom selbst integrieren. In den vorliegenden Unterlagen werden „Plasmid“ und „Vektor“ manchmal gegeneinander austauschbar verwendet, da das Plasmid gegenwärtig die am häufigsten verwendete Vektorform ist. Die Erfindung soll jedoch solche anderen Formen von Expressionsvektoren, die äquivalenten Funktionen dienen und die in diesem Fachgebiet bekannt sind oder werden, mit umfassen.

[0039] Die „Wirtszellen“, die im Rahmen der Erfindung verwendet werden, sind allgemein prokaryotische oder eukaryotische Wirtsorganismen, die vorzugsweise durch die in dem U.S.-Patent RE 34,606 offenbarten Methoden manipuliert worden sind, um diese unfähig zu machen, enzymatisch aktive Endoprotease zu sekretieren. Eine bevorzugte Wirtszelle für die Expression einer Protease ist der *Bacillus*-Stamm BG2036, der hinsichtlich der enzymatisch aktiven neutralen Protease und der alkalischen Protease (Subtilisin) einen Defekt aufweist. Die Konstruktion des Stamms BG2036 wird detailliert in dem U.S.-Patent 5,264,366 beschrieben. Andere Wirtszellen für die Expression von Protease umfassen *Bacillus subtilis* 1168 (auch in dem U.S.-Patent RE 34,606 und dem U.S.-Patent 5,264,366, deren Offenbarung in diese Unterlagen unter Bezugnahme aufgenommen wird, beschrieben) wie auch einen jeglichen geeigneten *Bacillus*-Stamm, wie z.B. *B. licheniformis*, *B. lentus* u.s.w.

[0040] Wirtszellen werden mit Vektoren, die unter Verwendung von Techniken der in vitro-DNA-Rekombination konstruiert worden sind, transformiert oder transfiziert. Solche transformierten Wirtszellen sind in der Lage, entweder Vektoren, welche die Proteasevarianten kodieren, zu replizieren oder die gewünschte Proteasevariante zu exprimieren. In dem Falle von Vektoren, welche die Prä- oder Präpro-Form der Proteasevariante kodieren, werden solche Varianten, wenn sie exprimiert werden, typischerweise aus der Wirtszelle in das Wirtszellmedium sekretiert.

[0041] „Funktional verknüpft“ oder „operativ verknüpft“, wenn dies die Beziehung zwischen zwei DNA-Regi-

onen beschreibt, bedeutet einfach, dass sie in funktionaler Beziehung zueinander stehen. Beispielsweise ist eine Präsequenz funktional mit einem Peptid verknüpft, wenn sie als Signalsequenz wirkt, indem sie an der Sekretion der reifen Form des Proteins, welche höchstwahrscheinlich eine Abspaltung der Signalsequenz mit umfasst, teilnimmt. Ein Promotor ist funktional oder operativ mit einer kodierenden Sequenz verknüpft, wenn er die Transkription der Sequenz kontrolliert; eine Ribosomenbindungsstelle ist funktional oder operativ mit einer kodierenden Sequenz verknüpft, wenn sie so positioniert ist, dass sie eine Translation erlaubt.

[0042] Die die in der Natur vorkommende Vorläufer-Protease kodierenden Gene können gemäß den allgemeinen Methoden, die den Fachleuten auf diesem Gebiet bekannt sind, erhalten werden. Die Methoden umfassen im allgemeinen das Synthetisieren von markierten Sonden, die mutmaßliche Sequenzen aufweisen, die Regionen der Protease von Interesse kodieren, Herstellen von genomischen Bibliotheken aus Organismen, die die Protease exprimieren, und Screenen der Bibliotheken auf das Gen von Interesse durch Hybridisierung mit den Sonden. Positiv hybridisierte Klone werden dann kartiert und sequenziert.

[0043] Die klonierte Protease wird dann verwendet, um eine Wirtszelle zu transformieren, um die Protease zu exprimieren. Das Proteasegen wird dann in ein Plasmid mit hoher Kopienzahl („high copy number“-Plasmid) kloniert. Dieses Plasmid repliziert in Wirten in dem Sinne, dass es die wohlbekannten Elemente enthält, die für die Plasmidreplikation erforderlich sind: einen Promotor, der funktional oder operativ mit dem fraglichen Gen verknüpft ist (der als der eigene homologe Promotor des Gens bereitgestellt werden kann, sofern er durch den Wirt erkannt, d.h. transkribiert wird), eine Transkriptionsterminations- und Polyadenylierungsregion (notwendig für die Stabilität der durch den Wirt von dem Proteasegen in bestimmten eukaryotischen Wirtszellen transkribierten mRNA), die exogen ist oder durch die endogene Terminatorregion des Proteasegens bereitgestellt wird, und wünschenswerterweise ein der Selektion dienendes Gen, wie ein Antibiotikumresistenzgen, das ein kontinuierliches Halten von durch das Plasmid infizierten Wirtszellen in Kultur durch Kultivierung in Antibiotikum enthaltenden Medium ermöglicht. Plasmide mit hohen Kopienzahlen enthalten auch einen Replikationsstartpunkt für den Wirt, wodurch ermöglicht wird, dass große Anzahlen von Plasmiden in dem Zytoplasma ohne chromosomale Einschränkungen erzeugt werden. Es liegt jedoch innerhalb des hiesigen Umfangs, eine Mehrzahl von Kopien des Proteasegens in ein Wirtsgenom zu integrieren. Dies wird durch prokaryotische und eukaryotische Organismen, die gegenüber einer homologen Rekombination besonders empfänglich sind, vereinfacht.

[0044] Das Gen kann ein natürliches *B. lentus*-Gen sein. Alternativ kann ein synthetisches Gen, welches eine in der Natur vorkommende oder mutierte Vorläufer-Protease kodiert, hergestellt werden. Bei einem solchen Ansatz wird die DNA- und/oder Aminosäuresequenz der Vorläufer-Protease bestimmt. Danach wird eine Mehrzahl von überlappenden synthetischen einzelsträngigen DNA-Fragmenten synthetisiert, welche nach Hybridisierung und Ligation eine synthetische DNA, die die Vorläufer-Protease kodiert, produzieren. Ein Beispiel für die Konstruktion eines synthetischen Gens wird in Beispiel 3 des U.S.-Patents 5,204,015, dessen Offenbarung in diese Unterlagen unter Bezugnahme aufgenommen wird, erläutert.

[0045] Ist einmal das in der Natur vorkommende oder synthetische Vorläufer-Protease-Gen kloniert, wird eine Anzahl von Modifikationen vorgenommen, um die Verwendung des Gens über die Synthese der in der Natur vorkommenden Vorläufer-Protease hinaus zu verbessern. Solche Modifikationen umfassen die Herstellung von rekombinanten Proteasen, wie in dem U.S.-Patent RE 34,606 und der EPA-Veröffentlichung Nr. 0 251 446 offenbart, und die Produktion von Proteasevarianten, die hier beschrieben wird.

[0046] Das folgende Kassetten-Mutagenese-Verfahren kann verwendet werden, um die Konstruktion der Proteasevarianten der Erfindung zu vereinfachen, obwohl andere Methoden verwendet werden können. Zuerst wird das in der Natur vorkommende Gen, welches die Protease kodiert, erhalten und vollständig oder teilweise sequenziert. Dann wird die Sequenz hinsichtlich einer Stelle, an welcher gewünscht wird, eine Mutation (Deletion, Insertion oder Substitution) von einer oder mehreren Aminosäuren in dem kodierten Enzym vorzunehmen, gescreent. Die diese Stelle flankierenden Sequenzen werden auf die Anwesenheit von Restriktionsstellen für das Ersetzen eines kurzen Abschnitts des Gens durch einen Oligonukleotidpool, der bei einer Expression verschiedene Mutanten kodieren wird, hin ausgewertet. Solche Restriktionsstellen sind vorzugsweise einmalig vorkommende Stellen innerhalb des Proteasegens, um das Ersetzen des Genabschnitts zu erleichtern. Es kann jedoch eine jegliche geeignete Restriktionsstelle, die in dem Proteasegen nicht übermäßig redundant ist, verwendet werden, vorausgesetzt, dass die durch Restriktionsverdau erzeugten Genfragmente in der korrekten Abfolge erneut zusammengefügt werden können. Wenn Restriktionsstellen nicht an Stellen innerhalb eines geeigneten Abstands von der ausgewählten Stelle (10 bis 15 Nukleotide) vorhanden sind, werden solche Stellen durch Ersetzen von Nukleotiden in dem Gen derart, dass weder das Leseraster noch die kodierten Aminosäuren in dem endgültigen Konstrukt verändert werden, erzeugt. Eine Mutation des Gens, um dessen Se-

quenz zu verändern, damit diese mit der gewünschten Sequenz übereinstimmt, erfolgt durch M13-Primer-Verlängerung gemäß allgemein bekannten Methoden. Die Aufgabe, geeignete flankierende Regionen zu lokalisieren und die benötigten Änderungen auszuwerten, um zu zwei geeigneten Restriktionsstellensequenzen zu gelangen, wird durch die Redundanz des genetischen Codes, eine Restriktionsenzymkarte des Gens und die große Anzahl von unterschiedlichen Restriktionsenzymen zur Routine. Es ist anzumerken, dass, wenn eine geeignete flankierende Restriktionsstelle zur Verfügung steht, die obige Methode nur in Verbindung mit der flankierenden Region, die keine Stelle enthält, verwendet werden muss.

[0047] Ist die in der Natur vorkommende DNA oder synthetische DNA einmal kloniert, werden die Restriktionsstellen, die die zu mutierenden Positionen flankieren, mit den diese erkennenden Restriktionsenzymen verdaut und eine Mehrzahl von zu den End-Termini komplementären Oligonukleotidkassetten wird an das Gen ligiert. Die Mutagenese wird durch diese Methode vereinfacht, da alle Oligonukleotide so synthetisiert werden können, dass sie die gleichen Restriktionsstellen aufweisen und keine synthetischen Linker erforderlich sind, um die Restriktionsstellen zu erzeugen.

[0048] Wie hier verwendet, wird proteolytische Aktivität als die Hydrolysegeschwindigkeit von Peptidbindungen pro Milligramm aktives Enzym definiert. Viele wohlbekannte Verfahren existieren für die Messung von proteolytischer Aktivität (K.M. Kalisz, „Microbial Proteinases“, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, A. Fiechter, Hrsg., 1988). Zusätzlich zu oder als Alternative zu modifizierter proteolytischer Aktivität können die Enzymvarianten der Erfindung andere modifizierte Eigenschaften aufweisen, wie K_m , K_{cat} , K_{cat}/K_m -Verhältnis und/oder modifizierte Substratspezifität und/oder modifiziertes pH-Aktivitätsprofil. Diese Enzyme können für das jeweilige Substrat, von dem antizipiert wird, dass es beispielsweise in dem Präparat von Peptiden vorhanden ist, oder für hydrolytische Verfahren, wie Waschanwendungen, maßgeschneidert werden.

[0049] Unter einem Aspekt der Erfindung besteht das Ziel darin, eine Proteasevariante mit veränderten, vorzugsweise verbesserten Wascheigenschaften verglichen mit einer Vorläufer-Protease in wenigstens einer Waschmittelformulierung und/oder unter wenigstens einem Satz von Waschbedingungen zu erzielen.

[0050] Es gibt verschiedene Waschbedingungen, einschließlich unterschiedlicher Waschmittelformulierungen, Waschwasservolumen, Waschwassertemperatur und Länge der Waschkdauer, denen eine Proteasevariante möglicherweise ausgesetzt ist. Beispielsweise haben Waschmittelformulierungen, die in verschiedenen Gebieten verwendet werden, unterschiedliche Konzentrationen an ihren relevanten Bestandteilen, die in dem Waschwasser vorhanden sind. Beispielsweise weist ein europäisches Waschmittel typischerweise ungefähr 4500-5000 ppm Waschmittelbestandteile in dem Waschwasser auf, während ein japanisches Waschmittel typischerweise ungefähr 667 ppm Waschmittelbestandteile im Waschwasser aufweist. In Nordamerika, insbesondere in den Vereinigten Staaten, weist ein Waschmittel typischerweise ungefähr 975 ppm Waschmittelbestandteile auf, die in dem Waschwasser vorhanden sind.

[0051] Ein System mit niedriger Waschmittelkonzentration umfasst Waschmittel, wo weniger als ungefähr 800 ppm Waschmittelbestandteile in dem Waschwasser vorhanden sind. Japanische Waschmittel werden typischerweise als System mit niedriger Waschmittelkonzentration angesehen, da bei diesen ungefähr 667 ppm Waschmittelbestandteile im Waschwasser vorhanden sind.

[0052] Eine mittlere Waschmittelkonzentration umfasst Waschmittel, wo zwischen 800 ppm und ungefähr 2000 ppm Waschmittelbestandteile in dem Waschwasser vorhanden sind. Nordamerikanische Waschmittel werden im allgemeinen als Systeme mit mittlerer Waschmittelkonzentration angesehen, da bei diesen ungefähr 975 ppm Waschmittelbestandteile im Waschwasser vorhanden sind. In Brasilien sind ungefähr 1500 ppm Waschmittelbestandteile im Waschwasser vorhanden.

[0053] Ein System mit hoher Waschmittelkonzentration umfasst Waschmittel, wo mehr als ungefähr 2000 ppm Waschmittelbestandteile in dem Waschwasser vorhanden sind. Europäische Waschmittel werden im allgemeinen als Systeme mit hoher Waschmittelkonzentration angesehen, da bei diesen ungefähr 4500-5000 ppm Waschmittelbestandteile im Waschwasser vorhanden sind.

[0054] Die lateinamerikanischen Waschmittel sind im allgemeinen hochkonzentrierte Seifenlauge-Phosphat-BUILDER-Waschmittel und der Bereich von Waschmitteln, die in Lateinamerika verwendet werden, kann sowohl unter die mittleren als auch hohen Waschmittelkonzentrationen fallen, da sie von 1500 ppm bis 6000 ppm Waschmittelbestandteile im Waschwasser reichen. Wie oben erwähnt, sind in Brasilien typischerweise ungefähr 1500 ppm Waschmittelbestandteile im Waschwasser vorhanden. Jedoch kann es in anderen Gegenden mit hochkonzentrierten Seifenlauge-Phosphat-BUILDER-Waschmitteln, die nicht auf andere lateinamerikanische

Länder beschränkt sind, Systeme mit hoher Waschmittelkonzentration bis zu ungefähr 6000 ppm Waschmittelbestandteilen im Waschwasser geben.

[0055] Im Lichte des Vorangegangenen ist offensichtlich, dass Konzentrationen von Waschmittelzusammensetzungen in typischen Waschlösungen in der ganzen Welt von weniger als ungefähr 800 ppm Waschmittelzusammensetzung („Gegenden mit niedrigen Waschmittelkonzentrationen“), beispielsweise ungefähr 667 ppm in Japan, bis zwischen ungefähr 800 ppm bis ungefähr 2000 ppm („Gegenden mit mittleren Waschmittelkonzentrationen“), beispielsweise ungefähr 975 ppm in den Vereinigten Staaten und ungefähr 1500 ppm in Brasilien, bis mehr als ungefähr 2000 ppm („Gegenden mit hohen Waschmittelkonzentrationen“), beispielsweise ungefähr 4500 ppm bis ungefähr 5000 ppm in Europa und ungefähr 6000 ppm in Ländern mit hochkonzentrierte Seifenlauge-Phosphat-Builder-Zusammensetzungen variieren.

[0056] Die Konzentrationen der typischen Waschlösungen werden empirisch bestimmt. Beispielsweise enthält in den Vereinigten Staaten eine typische Waschmaschine ein Volumen von ungefähr 64,4 l Waschlösung. Dementsprechend müssen, um eine Konzentration von ungefähr 975 ppm Waschmittel innerhalb der Waschlösung zu erhalten, ungefähr 62,79 g Waschmittelzusammensetzung zu den 64,4 l Waschlösung hinzugegeben werden. Diese Menge ist die typische Menge, die in das Waschwasser durch den Verbraucher unter Verwendung des Messbechers, der mit dem Waschmittel bereitgestellt wird, abgemessen wird.

[0057] Als ein weiteres Beispiel verwenden unterschiedliche Gegenden unterschiedliche Waschtemperaturen. Die Temperatur des Waschwassers in Japan ist typischerweise niedriger als jene, die in Europa verwendet wird.

[0058] Dementsprechend umfasst ein Aspekt der Erfindung eine Proteasevariante, die unter wenigstens einem Satz von Waschbedingungen verbesserte Wascheigenschaften zeigt.

[0059] Unter einem anderen Aspekt der Erfindung ist festgestellt worden, dass Substitutionen an Positionen, die 103 und 245 entsprechen, in Kombination mit einer oder mehreren Substitutionen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Positionen entsprechend 1, 3, 4, 8, 10, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 27, 33, 37, 38, 42, 43, 48, 55, 57, 58, 61, 62, 68, 72, 75, 76, 77, 78, 79, 86, 87, 89, 97, 98, 99, 101, 102, 104, 106, 107, 109, 111, 114, 116, 117, 119, 121, 123, 126, 128, 130, 131, 133, 134, 137, 140, 141, 142, 146, 147, 158, 159, 160, 166, 167, 170, 173, 174, 177, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 192, 194, 198, 203, 204, 205, 206, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 222, 224, 227, 228, 230, 232, 236, 237, 238, 240, 242, 243, 244, 246, 247, 248, 249, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 265, 268, 269, 270, 271, 272, 274 und 275 von *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin, bei der Verbesserung der Wascheigenschaften des Enzyms von Bedeutung sind.

[0060] Diese Substitutionen werden vorzugsweise in *Bacillus lentus* (rekombinant oder vom nativen Typ)-Subtilisin vorgenommen, obwohl die Substitutionen in einer jeglichen *Bacillus*-Protease vorgenommen werden können.

[0061] Basierend auf den Screening-Ergebnissen, die mit den Proteasevarianten erhalten wurden, sind die angegebenen Mutationen in *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin wichtig für die proteolytische Aktivität, Leistungseigenschaften und/oder Stabilität von diesen Enzymen und die Reinigungs- oder Wascheigenschaften von solchen Enzymvarianten.

[0062] Viele der Proteasevarianten der Erfindung sind nützlich bei der Formulierung von verschiedenen Waschmittelzusammensetzungen oder Körperpflegeformulierungen, wie Shampoos oder Lotionen. Eine Anzahl von bekannten Verbindungen sind geeignete grenzflächenaktive Mittel oder Tenside, die in Zusammensetzungen, welche die Proteasemutanten der Erfindung umfassen, nützlich sind. Diese umfassen nichtionische, anionische, kationische oder zwitterionische Detergentien, wie in US 4,404,128 von Barry J. Anderson und U.S. 4,261,868 von Jiri Flora et al. offenbart. Eine geeignete Waschmittelformulierung ist jene, die in Beispiel 7 des U.S.-Patents 5,204,015 (das zuvor unter Bezugnahme aufgenommen wurde) beschrieben wird. Dieses Fachgebiet ist vertraut mit den verschiedenen Formulierungen, die als Reinigungs- oder Waschzusammensetzungen verwendet werden können. Es versteht sich natürlich, dass zusätzlich zu typischen Reinigungs- oder Waschzusammensetzungen die Proteasevarianten der Erfindung für einen jeglichen Zweck, zu dem native oder Wildtyp-Proteasen verwendet werden, verwendet werden können. So können diese Varianten beispielsweise in Seifenstück- oder Flüssigseife-Anwendungen, Geschirrspülformulierungen, Kontaktlinsenreinigungslösungen oder -produkten, Peptidhydrolyse, Abfall/Abwasserbehandlung, Textilanwendungen, als Fusion-Spaltungs-Enzyme bei der Proteinherstellung u.s.w. verwendet werden. Die Varianten der Erfindung kön-

nen verbesserte Leistungseigenschaften in einer Waschmittelzusammensetzung (verglichen mit dem Vorläufer) umfassen. Wie hier verwendet, werden verbesserte Leistungseigenschaften in einem Waschmittel als eine verbesserte Reinigung von bestimmten Enzym-empfindlichen Flecken, wie Gras oder Blut, definiert, wie durch die übliche Auswertung nach einem Standard-Waschzyklus bestimmt.

[0063] Proteasen der Erfindung können zu bekannten pulverförmigen und flüssigen Waschmitteln mit einem pH zwischen 6,5 und 12,0 mit Konzentrationen von ungefähr 0,01 bis ungefähr 5% (vorzugsweise 0,1% bis 0,5%), bezogen auf das Gewicht, formuliert werden. Diese Detergenzien enthaltenden Reinigungszusammensetzungen können auch andere Enzyme, wie bekannte Proteasen, Amylasen, Cellulasen, Lipasen oder Endoglycosidasen, wie auch Builder und Stabilisatoren umfassen.

[0064] Die Zugabe von Proteasen der Erfindung zu herkömmlichen Reinigungszusammensetzungen bewirkt keinerlei spezielle Einschränkung hinsichtlich der Verwendung. In anderen Worten ist eine jegliche Temperatur und ein jeglicher pH, der für das Waschmittel geeignet ist, auch für die vorliegenden Zusammensetzungen geeignet, solange der pH innerhalb des obigen Bereichs liegt und die Temperatur unterhalb der Denaturierungstemperatur der beschriebenen Protease liegt. Zusätzlich können Proteasen der Erfindung in einer Reinigungszusammensetzung ohne Detergenzien, wieder entweder allein oder in Kombination mit Buildern und Stabilisatoren verwendet werden.

[0065] Die Erfindung betrifft auch Reinigungszusammensetzungen, die die Proteasevarianten der Erfindung enthalten. Die Reinigungszusammensetzungen können zusätzlich Additive oder Zusatzstoffe enthalten, die in Reinigungszusammensetzungen üblicherweise verwendet werden. Diese können ausgewählt werden aus, sind aber nicht beschränkt auf Bleichen, grenzflächenaktive(n) Substanzen oder Tenside, Builder, Enzyme und Bleichkatalysatoren. Für die Fachleute auf diesem Gebiet wäre leicht ersichtlich, welche Additive oder Zusatzstoffe für eine Aufnahme in die Zusammensetzungen geeignet sind. Die hier bereitgestellte Liste ist keinesfalls erschöpfend und sollte nur als Beispiele für geeignete Additive oder Zusatzstoffe aufgefasst werden. Für die Fachleute auf diesem Gebiet ist ebenfalls leicht ersichtlich, nur jene Additive oder Zusatzstoffe zu verwenden, die mit den Enzymen und anderen Bestandteilen in der Zusammensetzung, beispielsweise den Tensiden, verträglich sind.

[0066] Wenn vorhanden, beträgt die Menge von vorhandenen Zusatzstoffen oder Additiven in der Reinigungszusammensetzung ungefähr 0,01% bis ungefähr 99,9%, vorzugsweise ungefähr 1% bis ungefähr 95%, mehr bevorzugt ungefähr 1% bis ungefähr 80%.

[0067] Die Proteasevarianten der Erfindung können in Tierfutter Eingang finden, wie als Teil von Tierfutterzusätzen, wie beispielsweise in U.S. 5,612,055, U.S. 5,314,692 und U.S. 5,147,642 beschrieben.

[0068] Ein Aspekt der Erfindung ist eine Zusammensetzungen für die Behandlung eines Gewebes, die Proteasevarianten der Erfindung umfasst. Die Zusammensetzung kann verwendet werden, um beispielsweise Seide oder Wolle zu behandeln, wie in Veröffentlichungen, wie RD 216,034, EP 134,267, U.S. 4,533,359 und EP 344,259 beschrieben.

[0069] Das Folgende wird beispielhaft aufgeführt und soll nicht als eine Beschränkung hinsichtlich des Umfangs der Ansprüche verstanden werden.

Beispiel 1

[0070] Eine große Anzahl von Proteasevarianten wurde unter Verwendung von Methoden, die in diesem Fachgebiet wohlbekannt sind, hergestellt und gereinigt. Alle Mutationen erfolgten in *Bacillus lentus* GG36-Subtilisin. Die Varianten sind in Tabelle 3 gezeigt.

[illegible]

[illegible]

N76D	S103A	V104I	S242T																
N76D	S103A	V104I	E271Q																
Q12R	N76D	S103A	V104I	S242T															
N43S	N76D	S103A	V104I	N116K	N183I														
N76D	S103A	V104I	G258R																
N76D	S103A	V104I	E271G																
G61R	N76D	S103A	V104I																
T38S	N76D	S103A	V104I	Q182R	Y263H														
N76D	S103A	V104I	Q182R	A272S															
N76D	S103A	V104I	Q109R	I246V															
N76D	S87G	S103A	V104I	Q206R	H249Q	S265G													
N76D	S103A	V104I	Q137R	N238Y	E271V														
S103A	V104I	A228T																	
N76D	S103A	V104I	Q182R	I198V															
L21M	N76D	S103A	V104I	Q182R															
N76D	S103A	V104I	M119I	Q137R															
N76D	S103A	V104I	Q137R	N248S															
A13T	N76D	S103A	V104I	Q206R															
N76D	S103A	V104I	Q206R																

N76D	S103A	V104I	S212P	G258R															
T58S	N76D	S103A	V104I	E271G															
N76D	S103A	V104I	Q206E	N261D															
V4E	N76D	S103A	V104I	Q206E															
N76D	N77D	S103A	V104I	Q206E															
N76D	S103A	V104I	A158E																
N76D	S103A	V104I	Q206E																
V4E	N76D	S103A	V104I	G159D	L217E	K251Q													
V4E	N76D	S103A	V104I	G159D	L217E	N252D													
N76D	N77D	S103A	V104I	A133T	N185D	K251T													
N76D	S103A	V104I	G159D	Q206E	V244A														
V4E	N76D	S103A	V104I	S188E															
V4E	N76D	S103A	V104I	A158E															
N76D	N77D	S103A	V104I	N185D															
N76D	S103A	V104I	Q206E	K251T															
A48T	N76D	S103A	V104I	L111M	G159D														
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H														
L42V	N76D	S103A	V104I	G159D															
Q12H	N62H	N76D	S103A	V104I	G159D														

[illegible]

V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236R														
V68A	L75R	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H													
V68A	N76D	N76D	S103A	A114V	V121I	G159D	Q236H	Q245R											
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H													
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y209S	Q236H	T253K												
V68A	N76D	S103A	V104I	N117K	G159D	N184S	Q236H												
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	N243I													
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	Q245L													
V68A	N76D	S103A	V104I	A142V	G159D														
V68A	N76D	S103A	V104I	N123S	G159D	Q236H	H249Y												
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	H249Q													
N76D	S103A	V104I	M222S	Q245R															
N76D	S103A	V104I	Q12R	M222S	H249R														
N76D	S103A	V104I	N173R	M222S															
N76D	S103A	V104I	M222S	Y263F															
L21M	N76D	S103A	V104I	M222S	K237R	Y263F													
N76D	S103A	V104I	Q109R	M222S															
N76D	S103A	V104I	Q109R	M222S	E271D														
G61R	N76D	S103A	V104I	M222S															

N76D	S103A	V104I	Q137R	M222S															
N76D	S103A	V104I	Q109R	M222S	N248S														
N76D	S103A	V104I	M222S	H249R															
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	Q245R	N261D												
V68A	N76D	S103A	V104I	S141N	G159D	Q236H	Q245R	T255S											
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	Q245R	R247H												
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A174V	N204D	Q236H	Q245R											
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	N204D	Q236H	Q245R												
V68A	N76D	S103A	V104I	A133V	G159D	N218D	Q236H	Q245R											
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R												
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A194I	V203A	Q236H	Q245R											
Q12R	N76D	S103A	V104I	M222S	Q245R														
N76D	S103A	V104I	A232V	Q245R															
S24T	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R											
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K												
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A										
Q12R	N76D	S103A	I104T	M222S	V244I	Q245R													
Q12R	N76D	S103A	M222S	P210T	Q245R														
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R													

T22K	V68A	N76D	S103A	V104I															
V68A	N76D	S103A	N184D																
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K											
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R													
V68A	S103A	V104I	N140D	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K											
N43S	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K											
N43K	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R												
N43D	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K											
V68A	S87G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K	R275S										
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R	N248S	L262M											
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	A215V	M222S	Q245R												
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	V227A	Q245R	L262S											
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	A215T	M222S	Q245R												
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R	N261D												
N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R														
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	N218D	M222S	Q245R	L262S	N269D										
Q12R	S57P	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R	K251Q											
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	R170S	N185D	M222S	N243D	Q245R										
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R	V268A												

Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	P210S	Q245R										
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V										
V68A	S103A	V104I	N116D	G159D	A232V	Q236H	Q245R										
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D										
R10C	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R										
V68A	S103A	V104I	G159D	V203E	A232V	Q236H	Q245R										
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	K237E	Q245R										
V68A	N76D	I79N	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R									
V68A	S103A	V104I	G159D	N183D	A232V	Q236H	Q245R										
V68A	S103A	V104I	G159D	A174V	Q206L	A232V	Q236H	Q245R									
V68A	S103A	V104I	G159D	S188C	A232V	Q236H	Q245R										
V68A	S103A	V104I	G159D	A230T	A232V	Q236H	Q245R										
V68A	A98T	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R										
V68A	S103A	V104I	G159D	A215T	A232V	Q236H	Q245R										
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248S										
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R										
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210R	A232V	Q236H	Q245R									
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V									
N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	L257V											

V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V	R275H				
N76D	S103A	V104I	L257V	R275H								
V68A	S103A	V104I	G159D	T224A	A232V	Q236H	Q245R	L257V				
N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V					
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	G211R	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	G211V	A232V	Q236H	Q245R				
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y214L	A232V	Q236H	Q245R			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A215R	A232V	Q236H	Q245R				
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R				
G20R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	S259G			
V68A	S87R	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	T260V			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N261G				
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N261W				
N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	S242P	Q245R						
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210L	A232V	Q236H	Q245R				
Q12R	A48V	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R			
N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R				Q245R			
N76D	S103A	V104I	G159D	Y192F	A232V	Q236H	Q245R					

N76D	S103A	V104I	V147I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248S	K251R			
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	A272S			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	N183K	Q206L	A232V	Q236H	Q245R			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	S256R				
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R				
K27R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	N76D	S103A	V104I	N116T	G159D	R170S	N185S	A232V	Q236H	Q245R		
G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N43D	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S212P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	S99N	G159D	N184D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	Q109R	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
G20R	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209F	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261D			
V68A	S103A	V104I	G159D	N185D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	P210R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			

V68A	S103A	V104I	G159D	P210T	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	P210S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	N185D	P210L	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	P210L	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S212A	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S212E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	T213E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	T213S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
V68A	A103V	V104I	G159D	T213E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	T213G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A215V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A215R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S216T	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S216V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S216C	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
G20A	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	N173D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			

V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	K251V	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252F				
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252L				
P55S	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252F			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T255V			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256N			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256E			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256R			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T260R			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	L257R			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	G258D			
I8V	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N269D		
V68A	S103A	V104I	N116S	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T260E		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261R			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261D			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
S103A	V104I	G159D	A232S	Q236H	Q245R	N248D	N252K					

V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236R	Q245R	N248D	N252K				
N18S	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245V	N248D	N252K				
V68A	N76D	S101T	S103A	V104I	G159D	T213R	N218S	A232V	Q236H	Q245R	T260A	
V68A	S103A	V104I	G159D	A228V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
T33S	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	N76D	E89D	S103A	V104I	G159D	P210L	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A	
G61E	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S103A	V104I	G159D	V205I	P210I	A232V	Q236H	Q245R					
G61E	V68A	S103A	V104I	S130A	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
G61E	V68A	S103A	V104I	A133S	Q137R	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
G61E	S103A	V104I	A133V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248G	N252K				
V68A	S103A	V104I	G159D	N218S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	S160V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S3L	G61E	V68A	N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	S167F	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
G97E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
A98D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				

S99E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
S101E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
S103A	V104I	S106E	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
S103A	V104I	Q109E	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261R					
S103A	V104I	Q109R	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
N62D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
S103A	V104I	G159D	N184D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
S103A	V104I	G159D	S166D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
S103A	V104I	G159D	L217E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
G20R	N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	Q206R	L217E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
N62D	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	S130G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
S103A	V104I	P131V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
K27N	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					

T38G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
T38A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A	E271G		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y209W	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210I	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	V205I	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R	T260A			
V68A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A				
N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A				
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	A230V	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	L126F	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	V205I	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	P210L	A232V	Q236H	Q245R					
S103A	V104I	G159D	A230V	Q236H	Q245R							
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	T260A					
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R							
V68A	S103A	V104I	G159D	A174V	A232V	Q236H	Q245R	L257V				

V68A	S103A	V104I	G159D	A194S	A232V	Q236H	Q245R	L257V				
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	L257V				
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V						
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A	N261W		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V	N261W				
S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A					
S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	L257V					
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210L	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A		
Q12R	S103A	V104I	G159D	Y209W	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A			
S103A	V104I	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	L257V						
S103A	V104I	G159D	V205I	P210I	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A			
S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	T260A				
V68A	S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R			
S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R	L257V			
S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	L257V				
V68A	S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R	T260A		
S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R			
S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R			
S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R	Q245R			
S103A	V104I	G159D	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R					

S103A	V104I	G159D	V205I	P210I	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	S128L	G159D	A232V	Q236H	Q245R					
A48V	S103A	V104I	G159D	A230V	Q236H	Q245R						
A48V	V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R				
A48V	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
A48V	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V	N261W			
G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
Q12R	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
G102A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S103A	V104I	P131V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	N184S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	N184G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	V244T	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	V244A	Q245R	N248D	N252K				
N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
Q12R	N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256R	
S101G	S103A	V104I	G159D	N185D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			

S101G	S103A	V104I	G159D	Q206E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	T213Q	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	N248D	N252K			
N62D	S103A	V104I	Q109R	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S103A	V104I	G159D	S212G	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S101G	S103A	V104I	G159D	S212G	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
S103A	V104I	G159D	A232V	Q245R	N248D	N252K						
S103A	V104I	G159D	A230V	Q245R								
N62D	S103A	V104I	S130G	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	S130G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	S128G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	S128L	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N62D	S101G	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S103A	V104I	S128G	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S103A	V104I	S128L	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T260A			

S101G	S103A	V104I	P131V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
A98V	S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S99G	S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	V205I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	A230V	Q236H	Q245R						
S101G	S103A	V104I	G159D	A194P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N76D	S101G	S103A	V104I	G159D	A194P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	G159D	A230V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N62D	S103A	V104I	G159D	N185D	Q206E	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	E271Q

Beispiel 2

[0071] Eine große Anzahl von Proteasevarianten, die in Beispiel 1 hergestellt worden waren, wurde auf Leistungseigenschaften bei zwei Arten von Waschmittel- und Waschbedingungen unter Verwendung eines Mikro-stoffproben („microswatch“)-Assay, der in „An improved method of assaying for a preferred enzyme and/or preferred detergent composition“, U.S. Serial Nr. 60/068,796 beschrieben wird, getestet.

[0072] Tabelle 4 listet die dem Assay unterzogenen Proteasevarianten und die Ergebnisse der Untersuchung in zwei unterschiedlichen Waschmitteln auf. Bei Spalte A war das Waschmittel 0,67 g/l filtriertes Ariel Ultra (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, USA) in einer Lösung, welche 3 Grain pro Gallone gemischte $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Härte enthielt, und es wurde in jeder Vertiefung 0,3 ppm Enzym bei 20°C verwendet. Bei Spalte B war das Waschmittel 3,38 g/l filtriertes Ariel Futur (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, USA) in einer Lösung, welche 15 Grain pro Gallone gemischte $\text{Ca}^{1+}/\text{Mg}^{2+}$ -Härte enthielt, und es wurde in jeder Vertiefung 0,3 ppm Enzym bei 40°C verwendet.

Tabelle 4

[illegible]

[illegible]

[illegible]

N76D	S103A	V104I	Q206R								0.33	1.02
N76D	S103A	V104I	S212P	G258R							0.38	1.06
T58S	N76D	S103A	V104I	E271G							0.84	1.26
N76D	S103A	V104I	Q206E	N261D							1.97	0.04
V4E	N76D	S103A	V104I	Q206E							1.51	0.05
N76D	N77D	S103A	V104I	Q206E							1.40	0.04
N76D	S103A	V104I	A158E								1.95	0.16
N76D	S103A	V104I	Q206E								2.41	0.88
N76D	N77D	S103A	V104I	A133T	N185D	K251T					1.34	0.03
N76D	S103A	V104I	Q206E	N261D							1.78	0.04
N76D	S103A	V104I	G159D	Q206E	V244A						2.16	0.04
V4E	N76D	S103A	V104I	S188E							1.91	0.04
V4E	N76D	S103A	V104I	A158E							2.06	0.04
N76D	S103A	V104I	Q206E	K251T							1.73	0.06
A48T	N76D	S103A	V104I	L111M	G159D						2.04	0.16
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H						3.20	0.09
L42V	N76D	S103A	V104I	G159D							1.83	0.17
Q12H	N62H	N76D	S103A	V104I	G159D						1.42	0.14
L42I	N76D	S103A	V104I	G159D							1.86	0.18
N76D	S103A	V104I	G146S	G159D							1.87	0.19

N76D	S103A	V104I	G159D	N238S								1.90	0.15
N76D	S103A	V104I	G159D	T224A								1.61	0.07
N76D	S103A	V104I	S212P	V268F	E271V							0.44	1.42
N76D	S87R	S103A	V104I	S212P	E271V							0.39	2.03
N76D	S103A	V104I	S212P	Q245L	E271V							0.62	1.79
N76D	S103A	V104I	Q109R	Q245R								0.11	1.78
N76D	S103A	V104I	Q109R	P210L								0.12	1.21
G20V	N62S	N76D	S103A	V104I								1.63	0.78
V68A	N76D	S103A	V104I	Q236H								2.37	0.44
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	E271V						2.97	0.45
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	Q245R						3.00	0.61
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	L217I	Q236H	E271V					2.71	0.12
H17Q	V68A	N76D	S103A	V104I								2.46	0.38
V68A	N76D	S103A	V104I									2.46	0.61
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236R							3.31	0.11
V68A	L75R	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H						3.06	0.14
V68A	N76D	S103A	V104I	A114V	V121I	G159D	Q236H	Q245R				3.11	0.40
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H						3.12	0.34
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y209S	Q236H	T253K					3.18	0.03
V68A	N76D	S103A	V104I	N117K	G159D	N184S	Q236H					2.78	0.06

[illegible]

V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	G211R	A232V	Q236H	Q245R			1.74	1.76
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	G211V	A232V	Q236H	Q245R			3.15	1.06
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y214L	A232V	Q236H	Q245R		2.33	1.92
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A215R	A232V	Q236H	Q245R			1.67	1.45
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R			2.16	1.72
G20R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	S259G		2.77	1.59
V68A	N76D	S87R	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	T260V		2.62	1.49
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N261G			2.92	0.68
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N261W			2.17	1.37
N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	S242P	Q245R					0.48	1.2
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210L	A232V	Q236H	Q245R			2.92	0.76
Q12R	A48V	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R		2.09	1.86
N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R						0.51	1.44
N76D	S103A	V104I	G159D	Y192F	A232V	Q236H	Q245R				1.60	1.14
N76D	S103A	V104I	V147I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248S	K251R		1.35	1.29
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	A272S		1.92	1.81
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	N183K	Q206L	A232V	Q236H	Q245R		1.17	1.53
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	S256R			2.01	1.72
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R			2.09	1.62
K27R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R			3.00	1.08

V68A	N76D	S103A	V104I	N116T	G159D	R170S	N185S	A232V	Q236H	Q245R	ND	ND
N76D	S103A	V104I	M222S	Q245R							1.01	1.23
Q12R	N76D	S103A	V104I	M222S	H249R						0.57	1.65
N76D	S103A	V104I	N173R	M222S							0.86	0.46
N76D	S103A	V104I	M222S	Y263F							1.24	0.77
L21M	N76D	S103A	V104I	M222S	K237R	Y263F					1.18	0.76
N76D	S103A	V104I	Q109R	M222S							0.52	1.16
N76D	S103A	V104I	Q109R	M222S	E271D						0.56	1.12
G61R	N76D	S103A	V104I	M222S							0.43	0.96
N76D	S103A	V104I	Q137R	M222S							0.42	1.25
N76D	S103A	V104I	M222S	H249R							1.15	1.01
Q12R	N76D	S103A	V104I	M222S	Q245R						0.53	1.46
N76D	S103A	V104I	A232V	Q245R							0.69	1.56
Q12R	N76D	S103A	I104T	M222S	V244I	Q245R					0.66	1.74
Q12R	N76D	S103A	V104I	M222S	P210T	Q245R					0.52	1.56
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R					0.70	1.61
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	A215V	M222S	Q245R				0.79	1.85
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	V227A	Q245R	L262S			0.78	1.56
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R	N261D				1.25	1.30
N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R						1.29	1.30

Q12R	S57P	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R	K251Q		1.44	0.16
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	R170S	N185D	M222S	N243D	Q245R	2.01	0.04
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R	V268A			0.77	1.60
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	P210S	Q245R			0.73	1.66
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R			2.09	0.86

ND: nicht bestimmt

Beispiel 3

[0073] Tabelle 5 listet die dem Assay unterzogenen Proteasevarianten aus Beispiel 1 und die Ergebnisse der Untersuchung in vier verschiedenen Waschmitteln auf. Es wurden an den aufgeführten Proteasevarianten die gleichen Leistungseigenschaftstests wie in Beispiel 2 ausgeführt mit den folgenden Waschmitteln. Für Spalte A war das Waschmittel 0,67 g/l filtriertes Ariel Ultra (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, USA) in einer Lösung, welche 3 Grain pro Gallone gemischte $\text{Ca}^{1+}/\text{Mg}^{2+}$ -Härte enthielt, und es wurde in jeder Vertiefung 0,3 ppm Enzym bei 20°C verwendet. Für Spalte B war das Waschmittel 3,38 g/l filtriertes Ariel Futur (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, USA) in einer Lösung, welche 15 Grain pro Gallone gemischte $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Härte enthielt, und es wurde in jeder Vertiefung 0,3 ppm Enzym bei 40°C verwendet. Für Spalte C 3,5 g/l HSP 1-Waschmittel (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, USA) in einer Lösung, welche 8 Grain pro Gallone gemischte $\text{Ca}^{1+}/\text{Mg}^{2+}$ -Härte enthielt, und es wurde in jeder Vertiefung 0,3 ppm Enzym bei 20°C verwendet. Für Spalte D 1,5 ml/l Tide KT-Waschmittel (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, USA) in einer Lösung, welche 3 Grain pro Gallone gemischte $\text{Ca}^{1+}/\text{Mg}^{2+}$ -Härte enthielt, und es wurde in jeder Vertiefung 0,3 ppm Enzym bei 20°C verwendet.

Tabelle 5

N76D	S103A	V104I											A	B	C	D
													1	1	1	1
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K						1.44	1.41	1.39	1.26
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.34	1.49	1.65	2.35
V68A	S103A	V104I	Q109R	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.05	1.41	1.20	1.19
G20R	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.81	1.72	1.66	1.31
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209F	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.19	1.38	1.60	2.02
V68A	S103A	V104I	G159D	N185D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.91	0.91	1.48	2.70
V68A	S103A	V104I	G159D	P210R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				0.93	1.39	1.23	0.80
V68A	S103A	V104I	G159D	N185D	P210L	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.67	0.86	1.41	2.88
V68A	S103A	V104I	G159D	P210L	A232V	Q236H	Q245R	Q245R	N248D	N252K	N252K		2.22	1.43	1.55	1.78
V68A	S103A	V104I	G159D	S212C	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.30	1.43	1.63	2.07
V68A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.31	1.47	1.62	2.01
V68A	S103A	V104I	G159D	S212E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.63	0.56	1.36	2.66
V68A	S103A	V104I	G159D	T213E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.75	0.50	1.27	2.78
V68A	S103A	V104I	T213S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					1.11	1.38	1.31	0.75
V68A	A103V	V104I	G159D	T213E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.27	0.15	1.12	2.01
V68A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.37	1.42	1.37	1.06
V68A	S103A	V104I	G159D	A215V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.14	1.40	1.53	1.54

V68A	S103A	V104I	G159D	A215R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					1.22	1.58	1.47	1.20
V68A	S103A	V104I	G159D	S216T	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					2.12	1.36	1.56	1.56
V68A	S103A	V104I	G159D	S216V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					1.88	1.36	1.47	1.87
V68A	S103A	V104I	G159D	S216C	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					2.24	0.33	1.07	2.89
V68A	S103A	V104I	G159D	N173D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					2.43	0.46	1.29	2.42
V68A	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					0.98	1.46	1.24	0.95
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252F						2.52	1.00	1.42	2.42
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252L						2.05	1.13	1.30	1.85
P55S	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252F					2.61	0.91	1.43	3.22
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T255V					2.18	1.36	1.58	1.72
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256N					2.14	1.46	1.59	1.65
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256E					2.46	0.77	1.33	2.58
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256R					1.31	1.52	1.46	0.94
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T260R					1.21	1.41	1.31	1.05
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	L257R					1.51	1.41	0.85	1.18
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	G258D					2.56	0.59	1.30	2.64
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261R					1.02	1.47	1.37	0.84
V68A	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K							1.04	1.50	1.32	0.73
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K						2.60	0.93	1.41	2.67
V68A	S103A	V104I	G159D	A228V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					2.31	1.38	1.53	1.57
G61E	V68A	S103A	V104I	S130A	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.83	0.25	1.33	2.44

G61E	S103A	V104I	A133V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.10	0.97	1.36	2.29
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248G	N252K					1.37	1.54	0.89	1.27
V68A	S103A	V104I	G159D	N218S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.30	1.50	1.62	1.56
G20R	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.72	1.72	1.67	1.15
V68A	N76D	E89D	S103A	V104I	G159D	P210L	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A		1.32	1.30	1.11	1.28
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.50	0.83	1.43	2.25
G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	S160V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			4.20	0.07	ND	1.28
S3L	G61E	V68A	N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			3.47	0.60	ND	1.45
G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	Y167F	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			4.32	0.79	ND	1.55
G97E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					3.14	0.41	ND	1.40
A98D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					2.71	0.68	ND	1.72
S99E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					2.97	0.68	ND	1.71
S101E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					3.50	0.27	ND	1.90
S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					2.24	1.80	ND	1.33
G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					3.35	1.33	ND	1.69
S103A	V104I	S106E	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					4.88	0.55	ND	2.71
S103A	V104I	Q109E	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					4.22	1.05	ND	2.40
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261R					5.45	2.19	ND	2.58
S103A	V104I	Q109R	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					3.76	2.16	ND	1.82
N62D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					7.42	0.13	ND	2.46
S103A	V104I	G159D	N184D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					5.43	1.36	ND	2.84

S103A	V104I	G159D	S166D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					5.12	1.21	ND	3.97
S103A	V104I	G159D	L217E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					6.38	0.95	ND	3.09
G20R	N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			3.17	2.83	ND	2.60
N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				4.38	1.92	ND	2.54
S103A	V104I	G159D	Q206R	L217E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				3.05	2.61	ND	1.10
N62D	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				4.09	2.46	ND	2.55
S103A	V104I	G159D	N184G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					2.32	2.08	ND	2.40
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	V244T	Q245R	N248D	N252K					2.34	2.04	ND	1.86
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	V244A	Q245R	N248D	N252K					2.24	2.11	ND	1.95
K27N	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					2.81	1.56	ND	2.47
T38G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					2.30	2.09	ND	1.82
N62D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					2.63	2.66	ND	1.44
Q12R	N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.01	2.78	ND	1.99
N62D	S103A	V104I	G159D	N185D	Q206E	T213R	A232V	Q236H	Q245R	Q245R	N248D	E271Q	7.74	0.94	ND	5.39
S101G	S103A	V104I	G159D	N185D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				5.14	1.41	ND	1.92
S101G	S103A	V104I	G159D	Q206E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				4.97	0.57	ND	1.36
S101G	S103A	V104I	G159D	T213Q	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.41	1.86	ND	1.01
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				4.42	0.50	ND	2.88
S101G	G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				5.86	1.20	ND	3.84
G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				5.87	2.10	ND	3.19
Q12R	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.98	2.67	ND	2.17

A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			4.02	0.41	ND	2.25
S101G	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			6.63	2.07	ND	2.08
G102A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.03	2.48	ND	2.25
N62D	S103A	V104I	Q109R	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.96	2.76	ND	2.34
S103A	V104I	G159D	A232V	Q245R	N248D	N252K							2.74	2.10	ND	1.86
S103A	V104I	G159D	A230V	Q245R									2.11	2.35	ND	1.49
N62D	S103A	V104I	S130G	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			3.42	0.71	ND	2.58
S101G	S103A	V104I	S130G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.59	1.32	ND	1.61
S101G	S103A	V104I	S128G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.30	1.23	ND	9.0
S101G	S103A	V104I	S128L	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.94	0.71	ND	1.08
N62D	S101G	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			3.17	0.83	ND	2.35
N62D	S103A	V104I	S128G	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.15	1.38	ND	1.77
N62D	S103A	V104I	S128L	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			3.07	0.07	ND	1.45
S101G	S103A	V104I	P131V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.26	1.16	ND	3.05
A98V	S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.82	1.34	ND	1.08
S99G	S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.16	1.47	ND	1.20
S101G	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.79	1.38	ND	1.01
S101G	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.15	1.18	ND	8.7
S101G	S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.47	1.23	ND	1.03
S101G	S103A	V104I	G159D	V205I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.90	1.38	ND	1.05
S101G	S103A	V104I	G159D	A230V	Q236H	Q245R							1.55	1.51	ND	1.23

S101G	S103A	V104I	G159D	A194P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.96	1.30	ND	1.10
N76D	S101G	S103A	V104I	G159D	A194P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.49	0.80	ND	1.25

ND: nicht bestimmt

Patentansprüche

1. Protease-Variante, umfassend eine Aminosäuresubstitution an einer Position eines Rests, welche Position 103 von *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin entspricht, und eine Aminosäuresubstitution an einer Position eines Rests, welche Position 245 von *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin entspricht, und eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen an Positionen von Resten, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Positionen von Resten entsprechend den Positionen 1, 3, 4, 8, 10, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 27, 33, 37, 38, 42, 43, 48, 55, 57, 58, 61, 62, 68, 72, 75, 76, 77, 78, 79, 86, 87, 89, 97, 98, 99, 101, 102, 104, 106, 107, 109, 111, 114, 116, 117, 119, 121, 123, 126, 128, 130, 131, 133, 134, 137, 140, 141, 142, 146, 147, 158, 159, 160, 166, 167, 170, 173, 174, 177, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 192, 194, 198, 203, 204, 205, 206, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 222, 224, 227, 228, 230, 232, 237, 238, 240, 242, 243, 244, 246, 247, 248, 249, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 265, 268, 269, 270, 271, 272, 274 und 275 von *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin; wobei, wenn eine Substitution an einer Position, die der Position eines Rests 103 entspricht, mit einer Substitution an einer Position, die der Position eines Rests 76 entspricht, kombiniert wird, es auch eine Substitution an einer oder mehreren anderen Positionen von Resten als den Positionen von Resten, die den Positionen 27, 99, 101, 104, 107, 109, 123, 128, 166, 204, 206, 210, 216, 217, 218, 222, 260, 265 oder 274 von *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin entsprechen, gibt.
2. Protease-Variante nach Anspruch 1, welche eine Substitution der Aminosäurereste an Position 236 umfasst.
3. Protease-Variante nach Anspruch 1, welche Substitutionen der Aminosäurereste an den Positionen 103 und 245 und an einer oder mehreren der Positionen 1, 9, 12, 61, 62, 68, 76, 97, 98, 101, 102, 104, 109, 130, 131, 159, 170, 183, 185, 205, 209, 210, 211, 212, 213, 215, 217, 222, 230, 232, 248, 252, 257, 260, 261, 270 und 275 umfasst.
4. Protease-Variante nach Anspruch 1, welche Substitutionen der Aminosäurereste an den Positionen 103, 236 und 245 und an einer oder mehreren der Positionen 1, 9, 12, 61, 62, 68, 76, 97, 98, 101, 102, 104, 109, 130, 131, 159, 183, 185, 205, 209, 210, 211, 212, 213, 215, 217, 230, 232, 243, 248, 252, 257, 260, 270 und 275 umfasst.
5. Protease-Variante nach einem der Ansprüche 1 bis 4, welche eine Substitution des Aminosäurerests an Position 159 umfasst.
6. Protease-Variante nach Anspruch 1, die von einem *Bacillus*-Subtilisin abgeleitet ist.
7. Protease-Variante nach Anspruch 6, die von einem *Bacillus lentus*-Subtilisin abgeleitet ist.
8. DNA, welche eine Protease-Variante nach Anspruch 1 kodiert.
9. Expressionsvektor, der die DNA nach Anspruch 8 kodiert.
10. Wirtszelle, die mit dem Expressionsvektor nach Anspruch 9 transformiert ist.
11. Reinigungszusammensetzung, die die Protease-Variante nach Anspruch 1 umfasst.
12. Tierfutter, umfassend die Protease-Variante nach Anspruch 1.
13. Zusammensetzung zur Behandlung eines Gewebes, umfassend die Protease-Variante nach Anspruch 1.
14. Protease-Variante nach Anspruch 1, umfassend einen Satz von Substitutionen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Positionen von Resten, welche Positionen in Tabelle 1 von *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin entsprechen.
15. Protease-Variante nach Anspruch 14, umfassend einen Satz von Substitutionen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Positionen von Resten, welche Positionen in Tabelle 3 von *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin entsprechen.
16. Protease-Variante nach Anspruch 14, umfassend einen Satz von Substitutionen, ausgewählt aus der

Gruppe bestehend aus Positionen von Resten, welche Positionen in Tabelle 2 von *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin entsprechen.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

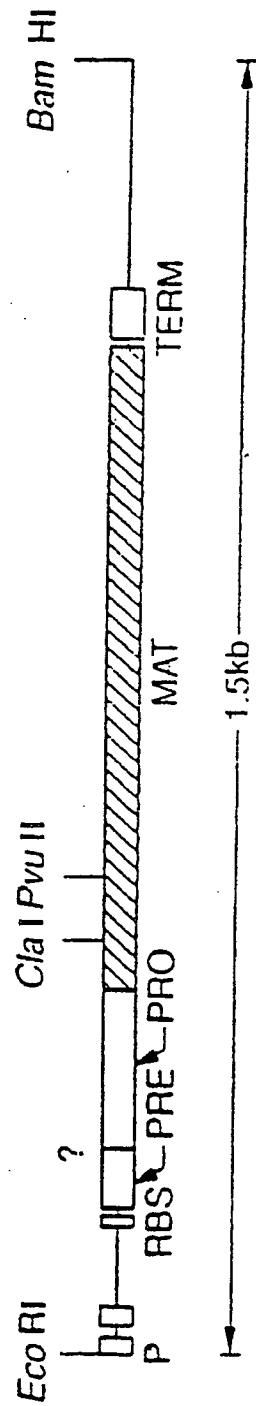


FIG. 1A

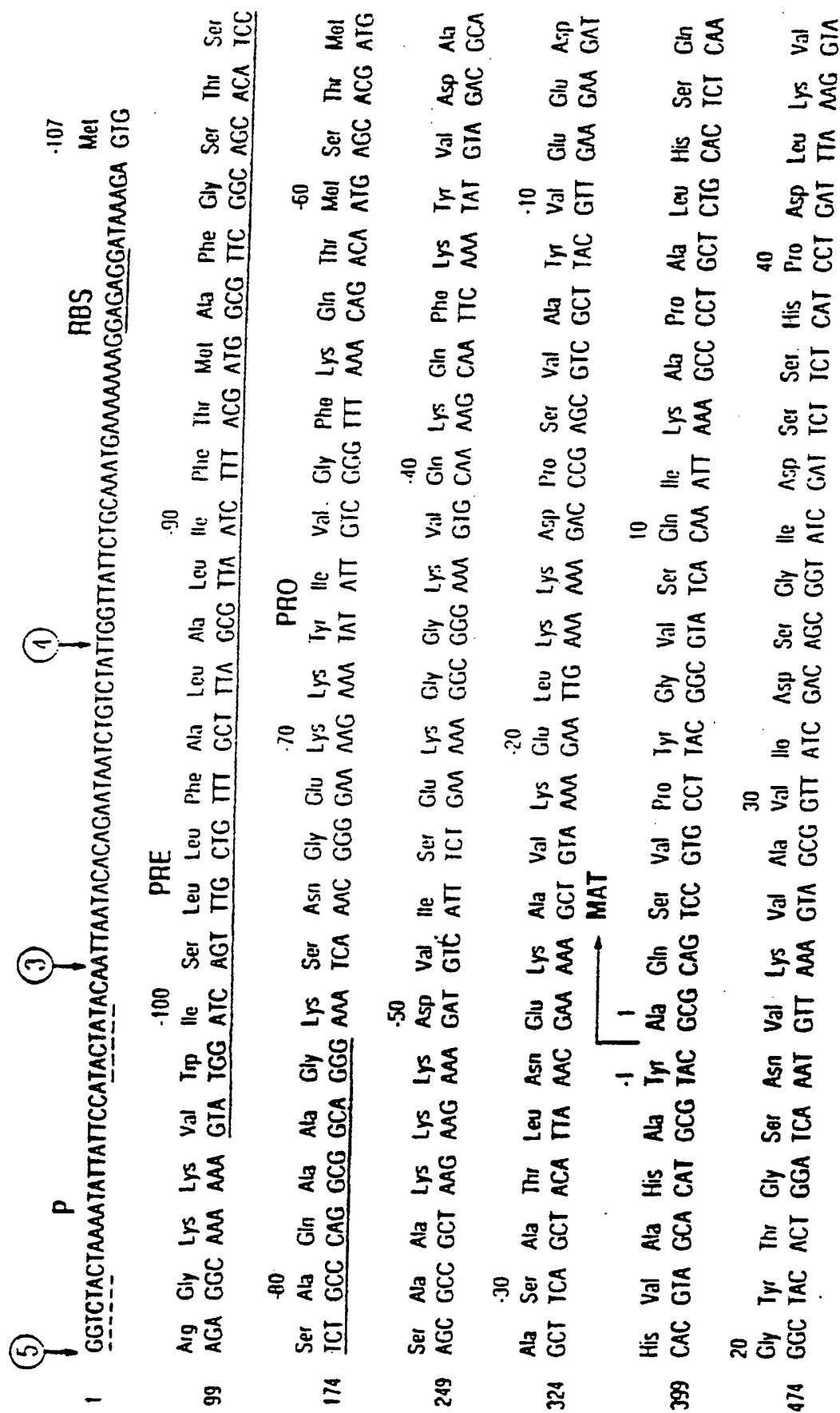


FIG. 1B-1

50
 Ala Gly Gly Ala Ser Met Val Pro Ser Glu Thr Asn Phe Gln Asp G0 Asp
 549 GCA GGC GGA GCC AGC ATG GTT CCT TCT GAA ACA AAT CCT TTC CAA GAC AAC MAC TCT CAC GGA ACT CAC GGT Val Ala

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

 100
 Asp Ala
 699 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
 GTT CTC GGT GCT GAC GGT TCC GGC CAA TAC AGC TGG ATC ATT MAC GCA ATC GAG TCG GCG ATC GCA AAC AAT ATG

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

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

 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
 924 AAA TAC CCT TCT TCT ATT GCA GTA GGC GCT GTT GAC AGC AGC MAC CAA ACA GCA TCT TTC TCA AGC GTA GGA CCI

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

 220
 Thr Ser Met Ala Ser Pro Ile Val Val Ala Gly Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Trp Thr Asn Thr
 1074 ACG TCA ATG GCA TCT CCG CAC GTT GCC GGA GCG GCT TIG ATT CTT TCT AAG CAC CCG AAC TGG ACA AAC ACT

FIG. 1B - 2

FIG. 1B-3

FIG. 1B-1

FIG. 1B-2

FIG. 1B - 3

FIG. 1B

**KONSERVIERTE RESTE IN SUBTILISINEN AUS
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

VERGLEICH VON SUBTILISIN-SEQUENZEN AUS:

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

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

FIG._3A

161 170 180 190
 S 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 A S F S S V G P E L D V M A
 S S S T V G Y P A K Y P S T I A V G A V N S S N Q R A S F S S A G S E L D V M A
 S S S T V G Y P A K Y P S T I A V G A V D S S N Q R A S F S S A G S E L D V M A
 * * * I S Y P A R Y A N A M A V G A T D Q N N R R A S F S S Q Y G A G L D I V A

 201 210 220 230
 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 N K Y G A Y N G T S M A S P H V A G A 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 A L I L S K H P N
 P G V N V Q 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 A L I L S K H P S

 241 250 260 270
 W T N T Q V R S S L E N 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 Q A A A Q
 W S N V Q I 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 R

FIG._3B

FIG._3A

FIG._3B

FIG._3