РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2012 116 529** (13) **A**

(51) МПК
C12N 15/09 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21)(22) Заявка: **2012116529/10, 24.09.2010**

Приоритет(ы):
(30) Конвенционный приоритет:
25.09.2009 EP 09171308.1

(43) Дата публикации заявки: **27.10.2013** Бюл. № **30**

(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на национальной фазе: **25.04.2012**

(86) Заявка PCT:
EP 2010/064171 (24.09.2010)

(87) Публикация заявки PCT:
WO 2011/036263 (31.03.2011)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр.3, ООО "Юридическая фирма Городисский и Партнеры"

(71) Заявитель(и):
НОВОЗИМС А/С (DK)

(72) Автор(ы):
КНЕТЦЕЛЬ Юрген Карстен Франц (DK),
ХОКАУФ Мариа Норман (DK),
БАЙЕР Ларс (DK),
БЕНИ Астрид (DK)

(54) ВАРИАНТЫ СУБТИЛАЗ

(57) Формула изобретения

1. Вариант исходного субтилизина, включающий замены 9{R,K,H}, 15{G,A,S,T,M}, 68{G,A,S,T,M}, 218{D,S,G,V} и 245{R,K,H}, где данный вариант дополнительно включает, по меньшей мере, одну из следующих модификаций: 61{D,E}, 62{D,E}, 76{D,E}, *97aG, 98{G,S}, 99G, 101G, 120{V,Q,D}, 131{T,S}, 137H, 194P, 228V, 230V, 261D, где указанные положения соответствуют положениям в последовательности зрелого полипептида SEQ ID NO:2 [BPN'].

2. Вариант по п.1, где указанный вариант включает замену G61E.

3. Вариант по п.1, где указанный вариант включает замену A98S.

4. Вариант по п.1, где указанный вариант включает замену S99G.

5. Вариант по п.1, где указанный вариант включает следующие замены S9R, A15T, G61E, V68A, A98S, S99G, N218D и Q245R.

5. Вариант по п.5, где исходный субтилизин является полипептидом, включающим аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% идентичность с последовательностью SEQ ID NO:1.

7. Вариант по п.1, где исходный субтилизин принадлежит к подгруппе I-S2.

8. Вариант по п.1, где указанный вариант обладает одним или несколькими улучшенными свойствами по сравнению с исходным субтилизином, где улучшенные свойства включают моющую способность, стабильность, каталитическую активность и эффективность мытья посуды.

RU 2012116529 A

RU 2012116529 A

9. Выделенный полинуклеотид, кодирующий вариант по любому из пп.1-8.

10. Конструкт нуклеиновой кислоты, включающий полинуклеотид по п.9.

11. Вектор экспрессии, включающий конструкт нуклеиновой кислоты по п.11.

12. Клетка-хозяин, содержащая конструкт нуклеиновой кислоты по п.11.

13. Чистящая или моющая композиция, предпочтительно композиция для стирки или мытья посуды, содержащая вариант по любому из пп.1-8.

14. Способ получения варианта по п.1 путем введения следующих замен в исходный субтилизин:

i. замену остатка в положении 9 остатками {R, K, H};

ii. замену остатка в положении 15 остатками {G, A, S, T, M};

iii. замену остатка в положении 68 остатками {G, A, S, T, M};

iv. замену остатка в положении 245 остатками {R, K, H}; и

v. замену остатка в положении 218 остатками {D, S, G или V},

и одной или нескольких из следующих модификаций: замену остатка в положении 61 остатками {D, E}, замену остатка в положении 62 остатками {D, E}, замену остатка в положении 76 остатками {D, E}, включение остатка G в положение 97, замену остатка в положении 98 остатками {G, S}, замену остатка в положении 99 остатком G, замену остатка в положении 101 остатком G, замену остатка в положении 120 остатками {V, Q, D}, замену остатка в положении 131 остатками {T, S}, замену остатка в положении 137 остатком H, замену остатка в положении 194 остатком P, замену остатка в положении 228 остатком V, замену остатка в положении 230 остатком V, замену остатка в положении 261 остатком D, где указанные положения соответствуют положениям в последовательности зрелого полипептида SEQ ID NO:2 [BPN'].

15. Способ по п.14, где в исходном субтилизине осуществляют следующие замены:

i. замену остатка S в положении 9 остатком R;

ii. замену остатка A в положении 15 остатком T;

iii. замену остатка V в положении 68 остатком A;

iv. замену остатка Q в положении 245 остатком R;

v. замену остатка N в положении 218 остатками {D, S, G или V}

и одну или несколько из следующих модификаций: замену остатка G в положении 61 остатком E, замену остатка N в положении 62 остатком D, замену остатка N в положении 76 остатком D, вставку остатка G в положение 97, замену остатка A в положении 98 остатком S, замену остатка S в положении 99 остатком G, замену остатка S в положении 101 остатком G, замену остатка H в положении 120 остатком D, замену остатка P в положении 131 остатком T, замену остатка Q в положении 137 остатком H, замену остатка A в положении 194 остатком P, замену остатка A в положении 228 остатком V, замену остатка A в положении 230 остатком V, замену остатка N в положении 261 остатком D.

16. Способ по п.14 или 15, где исходный субтилизин принадлежит к подгруппе I-S2, предпочтительно, где исходный субтилизин включает аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% идентичность с последовательностью SEQ ID NO:1.

RU 2012116529 A

RU 2012116529 A