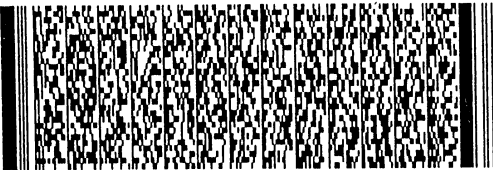
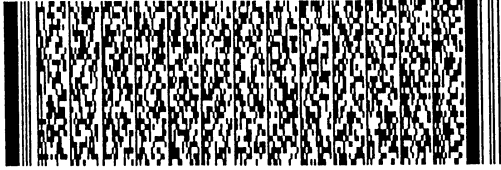


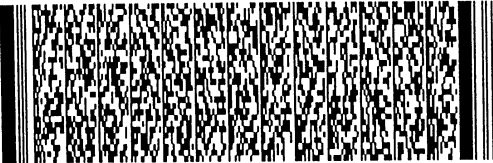
申請日期：88.1.14	案號：87117614	公告本
類別：C12N ^{15/57} , 9/54, C11D ^{3/86} , A23K ^{1/65}		

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書		585912
一、發明名稱	中文	經淨電荷改變之多重取代蛋白酶變異體，其用於清潔劑
	英文	MULTIPLY-SUBSTITUTED PROTEASE VARIANTS WITH ALTERED NET CHARGE FOR USE IN DETERGENTS
二、發明人	姓名 (中文)	1. 亞洛卡倫 傑 保羅斯 2. 佛克 史奇蘭伯格 3. 詹姆士 提 凱利斯二世 4. 克里斯丁 派奇
	姓名 (英文)	1. AYROOKARAN J. POULOSE 2. VOLKER SCHELLENBERGER 3. JAMES T. KELLIS, JR. 4. CHRISTIAN PAECH
	國籍	1. 美國 2. 德國 3. 美國 4. 美國
	住、居所	1. 美國加州貝蒙特市渥克佛德路2848號 2. 美國加州帕羅亞多市摩倫諾大道914號 3. 美國加州柏特拉谷市坦歐克路111號 4. 美國加州達利市第二大道240號
三、申請人	姓名 (名稱) (中文)	1. 美商吉安克國際公司
	姓名 (名稱) (英文)	1. GENENCOR INTERNATIONAL, INC.
	國籍	1. 美國
	住、居所 (事務所)	1. 美國紐約州羅徹斯特市南溫頓路1870號劍橋廣場4區
	代表人 姓名 (中文)	1. 韋恩. 曲. 皮奇爾
	代表人 姓名 (英文)	1. WAYNE H. PITCHER
 		

申請日期：	案號：
類別：	

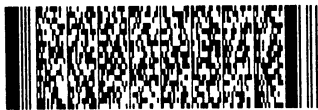
(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書		
一、 發明名稱	中 文	
	英 文	
二、 發明人	姓 名 (中文)	5. 喬安娜 耐德亨利 6. 唐納 皮 那其 7. 凱瑟林 迪 可利爾 8. 羅伯特 姆 卡德威爾
	姓 名 (英文)	5. JOANNE NADHERNY 6. DONALD P. NAKI 7. KATHERINE D. COLLIER 8. ROBERT M. CALDWELL
	國 籍	5. 美國 6. 美國 7. 美國 8. 美國
	住、居所	5. 美國加州舊金山市亞古洛六區681號 6. 美國加州舊金山市第十五街4816號 7. 美國加州紅木市威明頓路915號 8. 美國加州貝蒙特市康提紐透司路1056號
三、 申請人	姓 名 (名稱) (中文)	
	姓 名 (名稱) (英文)	
	國 籍	
	住、居所 (事務所)	
	代表人 姓 名 (中文)	
	代表人 姓 名 (英文)	
		

本案已向

國(地區)申請專利	申請日期	案號	主張優先權
美國 US	1997/10/23	08/956,323	有
美國 US	1997/10/23	08/956,564	有
美國 US	1997/10/23	08/956,324	有

有關微生物已寄存於	寄存日期	寄存號碼
-----------	------	------



五、發明說明 (1)

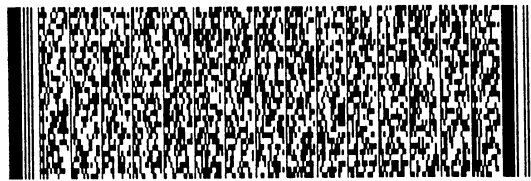
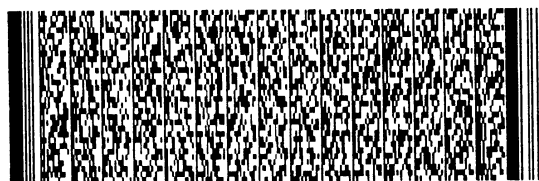
相關申請案

本案為美國專利案08/956,323，公告於1998年10月23日，美國專利案08/956,564，公告於1998年10月23日，及美國專利案08/956,324，公告於1998年10月23日之部份續篇，以上均以全文列為本案參考用。

發明背景

由於蛋白酶是羧基水解酶之亞群。其含有各類具有大範圍特異性及生物功能之酵素。Stroud, R. Sci. Amer., 131:74-88。除了其功能的多樣性，絲胺酸蛋白酶之催化機制經由至少二個遺傳上不同酵素族所研討：1) 枯草桿菌蛋白酶及2) 與哺乳動物胰凝乳蛋白酶有關及同源的細菌絲胺酸蛋白酶(如胰蛋白酶及*S. gresius*胰蛋白酶)。此二族絲胺酸蛋白酶有顯著相似之催化機制。Kraut, J. (1977), Annu. Rev. Biochem., 46:331-358。再者，雖然此二酵族之一級結構是不相關的，而其三級結構則一起形成由絲胺酸、組胺酸及天冬胺酸所組成之胺基酸固有之催化組。

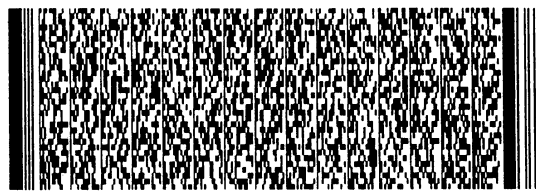
枯草桿菌蛋白酶為絲胺酸蛋白酶(約MW 27,500)，其自各種芽孢桿菌屬及其他有機體中被大量分泌。枯草桿菌蛋白酶之蛋白質序列已自至少9種不同的芽孢桿菌中被決定。Seizen et al. (1983), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 364:1537-1540。由解澱粉芽孢桿菌，地衣芽孢桿菌及許多遲緩芽孢桿菌之天然變異體所得之枯草桿菌蛋白酶三度空間結晶結已有所報告。這些研究顯示，雖然枯草



五、發明說明 (2)

桿菌蛋白酶和哺乳動物絲胺酸蛋白酶在遺傳上無關，但其仍有相似的活性位置結構。含有枯草桿菌蛋白酶x-射線結晶結構之共價鍵結的肽抑制劑(Robertus, J.D., et al. (1972), Biochemistry, 11:2439-2449)或產物抑制劑(Robertus, J.D., et al. (1976), J. Biol. Chem., 251:1097-1103)在關於枯草桿菌蛋白酶活性位置及推想的受質結合裂口方面，也有提供資訊。此外，也有關於枯草桿菌蛋白酶的許多動力學及化學修飾研究(Svendson, B. (1976), Carlsberg Res. Commun., 41:237-291; Markland, F.S. Id.)以及至少一種報告是其中在枯草桿菌蛋白酶第222殘基上之甲硫胺酸，側鏈被過氧化氫轉化成甲硫胺酸-亞砷(Stauffer, D.C., et al. (1965), J. Biol. Chem., 244:5333-5338)且已進行充份的位置特異的突變作用(Wells and Estell (1988) TIBS 13:291-297)。

在發展蛋白酶變異體以應用於清潔劑調和物上的共同課題是各樣的洗滌條件，包括變化可使蛋白酶變異體可於其中使用之清潔劑調和物。例如，清潔劑調和物應用於不同領域時其在洗液中相關組份之濃度是不同的。例如，歐洲的清潔劑在洗液中通常清潔劑組份約4500-5000 ppm，而日本的清潔劑在洗液中只有約667 ppm組份。在北美，特別是在美國，洗液中清潔劑組份通常為約975 ppm。令人驚訝地，一種合理的設計蛋白酶變異體，使其可應用於低清潔劑濃度系統，高清潔濃度系統，及/或中清潔劑濃度



五、發明說明 (3)

系統，以及以上各型式清潔劑濃度系統，此方法已被發展出來了。

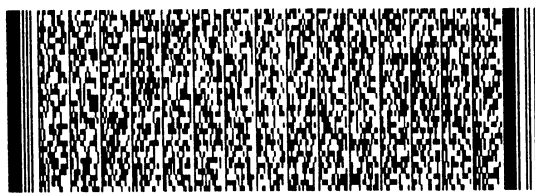
發明要點

本發明在此的一個主題是提出一種蛋白酶變異體，其中在一個以上殘基位置上含有胺基酸之置換，如此改變該位置之電荷，使電荷較前軀體蛋白酶較具陰性或少陽性，且因此蛋白酶變異體在低清潔劑濃度系統中較前軀體蛋白酶更為有效。低清潔劑濃度系統是指洗液系統其中清潔劑組份少於約800 ppm。

在此的另一主題是提出蛋白酶變異體，其在一個以上殘基位置上含有胺基酸之置換作用，如此可改變該位置上之電荷，使其較前軀體蛋白酶更具陽性或少陰性，且因此蛋白酶變異體高清潔劑濃度系統中較前軀體蛋白酶更為有效。高清潔劑濃度系統是指洗液系統其中清潔劑組份大於約2000 ppm。

本發明在此的另一主題是提出蛋白酶變異體，其在一個以上殘基位置上含有胺基酸之置換作用，如此可改變該位置上之電荷，使其較前軀體蛋白酶更具陽性或少陰性，且因此蛋白酶變異體在中清潔劑濃度系統中較前軀體蛋白酶更為有效。中清潔劑濃度系統是指洗液中清潔劑組份介於約800 ppm及約2000 ppm之間。

此中另一主題是提出蛋白酶變異體，其在一個以上殘基位置上含有胺基酸之置換，如此可改變該位置處之電荷，使其較前軀體蛋白酶更陰性或少陽性，且因此蛋白酶變異



五、發明說明 (4)

體在中清潔劑濃度系統中較前軀體蛋白酶更為有效。中清潔劑濃度系統是洗液中清潔劑組份在約800 ppm及約2000 ppm之間。

進一步的目的是提出編碼此蛋白酶變異體之DNA序列，以及含有此變異體DNA序列之表現載體。

又進一步，本發明另一主題是提出以此載體所轉形之宿主細胞，以及可表現此DNA，於細胞內或細胞外產製蛋白酶變異體之宿主細胞。

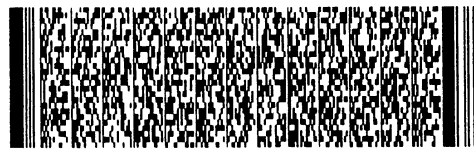
在此進一步提出含有本發明蛋白酶變異體之清潔劑組成物。

另外，在此提出含有本發明蛋白酶變異體之動物飼料。

在此也提出處理織品之組成物，其中含有本發明之蛋白酶變異體。

在此進一步提出產製蛋白酶變異體之方法，其在低、中及高清潔劑濃度系統中較前軀體蛋白酶更為有效，包括：

- a) 在一個以上殘基位置上置換胺基酸，其中置換作用可改變該位置上之電荷使電荷較前軀體蛋白酶更具陽性或少陰性；
- b) 在一個以上殘基位置上置換胺基酸，其中置換作用可改變該位置上之電荷使電荷較前軀體蛋白酶更具陰性或少陽性；
- c) 測試變異體以決定其在高、中及低清潔劑濃度系統中較前軀體蛋白酶之效力；及
- d) 依必要重覆步驟a)-c)以產生在低，中及高清潔劑濃度



五、發明說明 (5)

系統中較前軀體蛋白酶更為有效之蛋白酶變異體，其中a)及b)步驟可以任何次序進行。

附圖說明

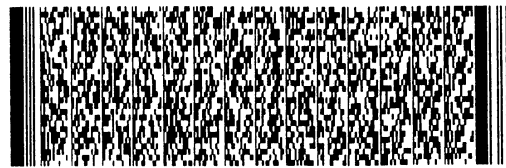
圖1A-B示出解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶之DNA及胺基酸序列，及此基因之部份限制與與圖。

圖2示出來自解澱粉芽孢桿菌(BPN)'及遲緩芽孢桿菌(野生型)之枯草桿菌蛋白酶間之固有的胺基酸殘基。

圖3A及3B示出四種枯草桿菌蛋白酶的胺基酸序列。上方之線代表解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶之胺基酸序列(有時也稱為枯草桿菌蛋白酶BPN')。第二線代表枯草桿菌之枯草桿菌蛋白酶胺基酸序列。第三線示出地衣芽孢桿菌之枯草桿菌蛋白酶胺基酸序列。第四線示出遲緩芽孢桿菌之枯草桿菌蛋白酶胺基酸序列(在PCT WO 89/06276中也稱為枯草桿菌蛋白酶309)。符號*表示和枯草桿菌蛋白酶BPN'，比較下無特異的胺基酸殘基。

發明詳細明

如上述，某些區域有特定的洗滌條件，且因此使用不同型式之清潔劑。例如日本使用低清潔劑濃度系統，而歐洲使用高清潔劑濃度系統。如先前所述，美洲使用中清潔劑濃度系統。吾等發現不同的蛋白酶變異體在這些不同的清潔劑調和物中有最適宜之操作。然而，由於這些觀察結果，吾等可預期將無法找到可在所有三型式清潔劑中均操作功能良好之清潔劑。令人驚訝地，事實上並非如此。合理地設計一種蛋白酶變異體，使其可應用於低清潔劑濃度系



五、發明說明 (6)

統或高清潔劑濃度系統或甚至中清潔劑濃度系統，以及設計一種可在三型清潔劑濃度系統中均操作良好的方法已發展出來了。

吾等發現，為了產製在低清潔劑濃度系統中較為有效之蛋白酶變異體，必須以負電荷殘基或中性殘基取代正電荷殘基，及/或以負電荷殘基取代中性殘基。相反的，為了產生在高清潔劑濃度系統中較為有效之蛋白酶變異體，必須以正電荷或中性電荷取代負電荷殘基，及/或以正電荷殘基取代中性殘基。再者，吾等發現，許多可用於低清潔劑濃度系統及/或高清潔劑濃度系統之蛋白酶變異體，在中清潔劑濃度系統也是有效的。為了平衡這些變化，將可能可產生在低清潔劑濃度系統，低及中清潔劑濃度系統，中及高清潔劑濃度系統，高清潔劑濃度系統，或所有三種清潔劑濃度系統中均操作良好之蛋白酶變異體。

任何胺基酸側鏈所有之電荷為pH之函數關係。酸性殘基；Asp及Glu一旦去質子化可分別在pH 4及5以上時獲得一個負電荷。His在去質子化作用時於pH 7以上時會失去一個正電荷。賴胺酸及精胺酸側鏈一旦高至pH 10會呈正電荷，而一旦Lys側鏈被去質子化會失去其電荷。一旦在pH 10以上，Tyr會去質子化而獲得一個負電荷。

酵素分子pH值改變時或當荷電殘基移去或加入時會喪失或獲得電荷。將在特定pH值下呈負電荷之殘基，以未荷電或正電荷殘基取代，可使正電荷增加，其中淨電荷分別增加+1或+2，或將未荷電殘基以正電荷者取代，其中淨電荷



五、發明說明 (7)

可增加+1。同樣的，未荷電殘基以負電荷者取代可增加負電荷，造成-1之淨變化，或以未荷電或負電荷者取代正電荷殘基，造成-1或-2分別之淨變化。

低清潔劑濃度系統包括其中在洗液中清潔劑組份少於約800 ppm之清潔劑。日本清潔劑通常為相當低清潔劑濃度系統，因其在洗液中之清潔劑約667 ppm。

中清潔劑濃度包括其中洗液內之清潔劑組份介於約800 ppm及約2000 ppm之間。北美的清潔劑通常被視為中清潔劑濃度系統，因其在洗液中之清潔劑組份為約975 ppm。巴西在洗液中之清潔劑組份約1500 ppm。

高清潔劑濃度系統包括其中洗液內清潔劑組份大於約2000 ppm者。歐洲清潔劑通常被視為高清潔劑濃度系統，因其在洗液中之清潔劑組份為約4500-5000 ppm。

拉丁美洲之清潔劑通常是高肥皂泡之磷酸鹽組份清潔劑，且在拉丁美洲使用的清潔劑範圍屬於中及高清潔劑濃度內，因其清潔劑組份在洗液中由約1500 ppm至6000 ppm。如上述，巴西之清潔劑組份在洗液中通常有約1500 ppm。然而，其他高肥皂泡磷酸鹽組份清潔劑區域，並不限於其他拉丁美洲國家，也有高清潔劑濃度系統，其中清潔劑組份在洗液中可高達約6000 ppm。

基於上述，可明顯知道全世界典型洗液中清潔劑組成中之濃度可由少於約800 ppm清潔劑組成物("低清潔劑濃度區域")，如在日本之約667 ppm，至約800 ppm至約2000 ppm之間("中清潔劑濃度區域")，如在美國的約975 ppm及



五、發明說明 (8)

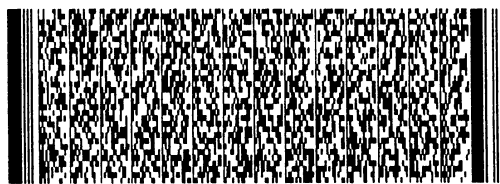
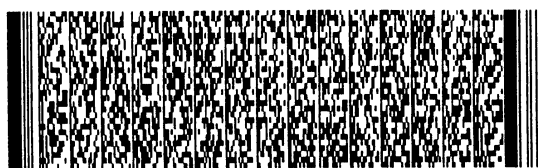
在巴西的約1500 ppm，至大於約2000 ppm(高清潔劑濃度區域)，如在歐洲的約4500 ppm至約5000 ppm，及在高肥皂水磷酸鹽組份區域的約6000 ppm。

典型洗液之濃度由實驗來決定。例如在美國，典型的洗衣機可保有約64.4升洗液之體積。因此，為了在洗液內得到約975 ppm之清潔劑濃度，在64.4升洗液中必須加入約62.79克清潔劑組成物。此劑量是消費者利用清潔劑所提供之計量杯蓋量入洗液內之典型劑量。

蛋白酶為羧基水解酶，其通常作用以解離蛋白質或肽之肽鍵。如此中所用，"蛋白酶"表示自然之蛋白酶或重組體蛋白酶。自然生成的蛋白酶包括 α -胺基醯基肽水解酶，肽基胺基酸水解酶，醯基胺基水解酶，絲胺酸羧基肽酶，金屬羧基肽酶，硫醇蛋白酶，羧基蛋白酶及金屬蛋白酶。絲胺酸，金屬，硫醇及酸性蛋白酶包括在內，以及內及外-蛋白酶。

本發明包括蛋白酶酵素，其為非天然生成之羧基水解酶變異體(蛋白質變異體)，當和變異體胺基酸序列衍生出處之前軀體羧基水解酶比較，其具有不同的蛋白水解活性，穩定性，受質特異性，pH概況及/或操作特性。特言之，此種蛋白酶變異體有自然界未見之胺基酸序列，其由不同胺基酸置換前軀體蛋白酶許多胺基酸殘基而衍生。前軀體蛋白酶可為自然生成之蛋白酶或重組體蛋白酶。

此中 useful 之蛋白酶變異體包括在所設計之胺基酸殘基位置上置換19個自然生成之L-胺基酸上任一者。此種置換作

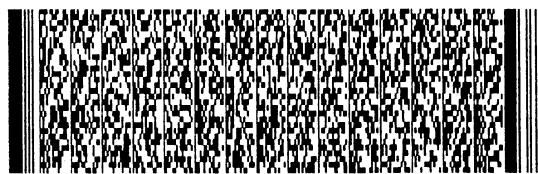


五、發明說明 (9)

用可在任何前軀體枯草桿菌蛋白酶上進行(原核細胞，真核細胞，哺乳動物等)。在本申請案中，對各種胺基酸之參考乃經由一般的一字及三字碼來說明。此種密碼在 Dale, M.W. (1989), Molecular Genetics of Bacteria, John Wiley & Sons, Ltd., Appendix B 中鑑知。

此中可用的蛋白酶變異體較好是衍生自枯草桿菌。較好，蛋白酶變異體是衍生自遲緩芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶及/或枯草桿菌蛋白酶309。

枯草桿菌蛋白酶為細菌性或真菌蛋白酶，其通常作用以解離蛋白質或肽之肽鍵。如此中所用之"枯草桿菌蛋白酶"表示自然生成之枯草桿菌蛋白酶或重組體枯草桿菌蛋白酶。已知可產生一系列自然生成之枯草桿菌蛋白酶，且通常由各種微生物種類分泌。此序列成員之胺基酸序列並非完全均質。然而，此系列之枯草桿菌蛋白酶呈現相同或相似之蛋白水解活性型式。此類絲胺酸蛋白酶共有可界定催化組之共同胺基酸序列，其與絲胺酸蛋白酶之胰凝乳蛋白酶相關種類有所區別。枯草桿菌蛋白酶及胰凝乳蛋白酶相關之絲胺酸蛋白酶二者均有含有天冬胺酸，組胺酸及絲胺酸之催化組。在枯草桿菌蛋白酶相關之蛋白酶中，這些胺基酸之相對次序由胺基讀至羧基末端為天冬胺酸-組胺酸-絲胺酸。在胰凝乳蛋白酶相關之蛋白酶中，相關次序卻是組胺酸-天冬胺酸-絲胺酸。因此此中之枯草桿菌蛋白酶指具有枯草桿菌相關蛋白酶之催化組之絲胺酸蛋白酶。實例包括圖3所鑑知之枯草桿菌蛋白酶，但不限於此。一般而言



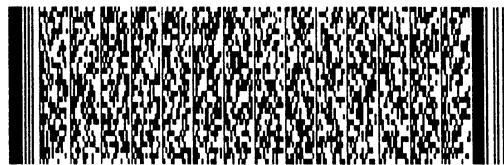
五、發明說明 (10)

且基於本發明目的，蛋白酶中胺基酸之編號相當於在成熟解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶序列中所命名之編號，示於圖1。

"重組體枯草桿菌蛋白酶"或"重組體蛋白酶"指枯草桿菌蛋白酶或蛋白酶其中編碼枯草桿菌蛋白酶或蛋白酶之DNA序列予以修飾以產生變異體(或突變體)DNA序列，其編碼自然生成胺基酸序列中一個以上胺基酸之置換，刪除或嵌入。產生此修飾作用之適合的方法，且其可與此中所揭示的組合，包括揭示於US專利RE 34,606，US專利5,204,015及US專利5,185,258，US專利5,700,676，US專利5,801,038及US專利5,763,257。

"非人類枯草桿菌蛋白酶"及編碼後之DNA可得自許多原核及真核有機體。原核有機體之適合的實例包括革蘭氏陰性有機體，如E. coli或假單胞菌，及革蘭氏陽性菌如黴球菌或芽孢桿菌。可由此中獲得枯草桿菌蛋白酶及其基因之真核細胞有機體包括真菌，如釀酒酵母菌，真菌如曲霉。

"蛋白酶變異體"具有衍自"前軀體蛋白酶"胺基酸序列之胺基酸序列。前軀體蛋白酶包括自然生成之蛋白酶及重組蛋白酶。蛋白酶變異體之胺基酸序列是"衍生自前軀體胺基酸序列一個以上胺基酸經由置換，刪除或嵌入而來之前軀體胺基酸序列。此種處理修飾屬於"前軀體DNA序列"，其編碼前軀體蛋白酶之胺基酸序列，而非前軀體蛋白酶酵素本身之操作。操作前軀體DNA序列之適合的方法包括此



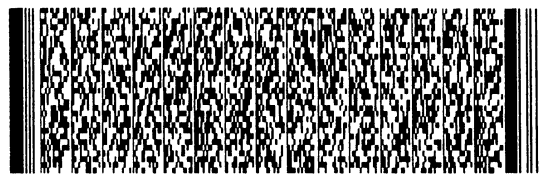
五、發明說明 (11)

中揭示之方法，以及精藝者已知之方法(如見EP 0 328299，W089/06279及此中已引為參考之US專利案及申請案)。

這些胺基酸位置編號參見圖，為成熟的解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶序列所設定的。然而本發明並不限於此特殊枯草桿菌蛋白酶之突變，而是延伸至前軀體蛋白酶，其中在"相當於"解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶之特別定義殘基上含有胺基酸殘基。在本發明之較佳具體實例中，前軀體蛋白酶是遲緩芽孢枯草桿菌蛋白酶，且在遲緩芽孢桿菌相當於上列之相當胺基酸殘基位置上有置換作用。

前軀體蛋白酶之殘基(胺基酸)位置，若其均質於(即，相當於在一級或三級結構中之位置)或類似於解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶中特異的殘基或部份，則其相當於解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶之殘基(即，具有相同或相似的功能性能力以組合，反應或化學地交互作用)。

為了發展此一級結構之同質性，前軀體蛋白酶之胺基酸序列直接與解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶一級序列比較，且特別是與序列已知之枯草桿菌蛋白酶中不變之已知殘基組做比較。例如，圖2示出在解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌素及遲緩芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶間之固有殘基。一旦排列好固有殘基後，並可有必要的嵌入及刪除以維持排列(即，經由任意的刪除及嵌入避免固有殘基被消除)，再界定相當於解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶一級序列中特定胺基酸之殘基。固有殘基之排列，較好應保有此殘基達100%。然而，大於75%或少至50%固有殘基之排列也足以定



五、發明說明 (12)

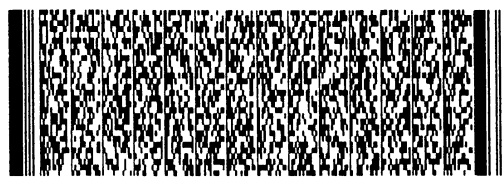
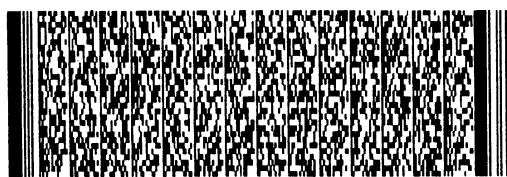
義相當的殘基。催化組，Asp32/His64/Ser221之保留應予以維持。Siezen et al. (1991) Protein Eng. 4(7):

719-737顯示許多絲胺酸蛋白酶之排列。Siezen et al. 指稱此組為枯草菌酶或類-枯草桿菌蛋白酶絲胺酸蛋白酶。

例如在圖3中，將解澱粉芽孢桿菌、枯草桿菌、地衣芽孢桿菌及遲緩芽孢桿菌之枯草桿菌蛋白酶胺基酸序列排列，使胺基酸序列間有最大之同質性。這些序列之比較顯示，在各序列中含有大量固有的殘基。這些固有的殘基(在BPN'及遲緩芽孢桿菌之間)示於圖2。

因此這些固有殘基可用來在其他枯草桿菌蛋白酶中定義相當於解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶之胺基酸殘基，如來自遲緩芽孢桿菌之枯草桿菌蛋白酶(PCT案No. W089/06279，公告於1989年7月13日)，此中較佳之蛋白酶前軀體酵素，或稱之為PB92之枯草桿菌蛋白酶(EP 0 328 299)，其與較佳之遲緩芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶有高度類似性。這些枯草桿菌蛋白酶的某些胺基酸序列，與解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶之序列於圖3A及3B中共列，以使固有的殘基有最大之同質性。如所見的，和解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶比較下，遲緩芽孢桿菌之序列中有許多的刪除。因此，例如在解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶中Val165之相當胺基酸，於遲緩芽孢桿菌及地衣芽孢桿菌中為異白胺酸。

"相當的殘基"也可在前軀體蛋白酶之三級結構層次下由決定同質性而界定，其中的三級結構係以x-射線結晶法予

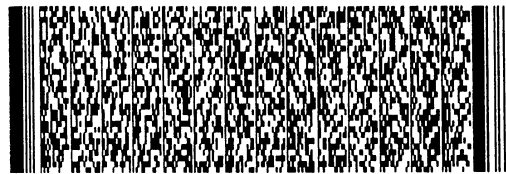


五、發明說明 (13)

以決定。相當殘基之定義是當前軀體蛋白酶及解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶之特殊胺基酸殘基主鏈原子上二個以上之原子配位(N於N, CA於CA, C於C及O於O)在0.13毫微米之內,且較好是排列後在0.1毫微米之內。在最佳模式已定向及定位後可達成排列,使討論中之蛋白質可與解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶之非氫蛋白質原子之原子配位有最大之重疊。最佳模式是在可運用之最高解析下,實驗之繞射數據可生成最低R值之結晶模型。

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

將功能上與解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶之特殊殘基類似之相當殘基定義為可選擇採用一構型之前軀體蛋白酶之胺基酸,如此其可以所定義之方式或改變,修飾或貢獻於蛋白質結構,並構入解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶之特異殘基。再者,其也可以是前軀體蛋白酶殘基中(其中已由X射線結晶學獲得三級結構)占據類似位置者,其雖然特定殘基之主鏈原子在占據類似位置之基礎上無法滿足同等之準則,然殘基側鏈原子中至少二者之原子共價與解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶之相當的側鏈原子距0.13毫微米。解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶三級結構之配位示於EPO案No. 0 251 446(相當於US專利案5,182,204,其揭示已列為此中參考),且可充作上文之概況以在三級結構水平下決定相當的殘基。



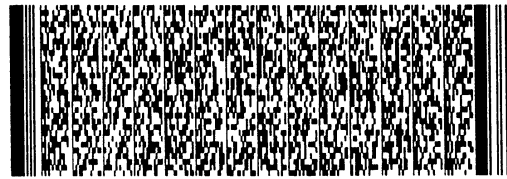
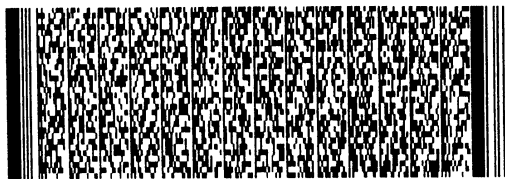
五、發明說明 (14)

針對置換作用所鑑知之某些殘基為固有的殘基，其他則否。在殘基非固有的例子中，一個以上胺基酸之置換限於可產生變異體之置換，其具有未相當於自然中所見之胺基酸序列。在固有殘基之例子中，此置換作用不應生成自然生成之序列。本發明之蛋白酶變異體包括蛋白酶變異體之成熟型式，以及此蛋白酶變異體之原一及前原一型式。以前原一型式為較佳之構體，因為此有助於蛋白酶變異體之表現，分泌及成熟。

"原序列"指結合至蛋白酶成熟型式N-末端部份之胺基酸序列，其若移去會造成蛋白酶"成熟"型式之出現。許多蛋白水解酶在自然界是以轉譯上之酶原產物型式出現，且在無轉譯後處理修飾下，即以此方式表現。用於產製蛋白酶變異體之較佳原序列為解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶推想之原序列，然而其他的蛋白酶原序列也可使用。

"訊號序列"或"前序列"是指結合至蛋白酶之N-末端部份或原蛋白酶N-末端部份之任何胺基酸序列，其參與於蛋白酶成熟或原型式之分泌作用。訊號序列的此定義屬於功能上之定義，表示包括所有由蛋白酶基因N-末端部份，可在天然條件下達成蛋白酶之分泌，所編碼之所有胺基酸序列。本發明利用此序列以達成如此中所定義之蛋白酶變異體之分泌。一個可能的訊號序列包括枯草桿菌蛋白酶訊號序列中前7個胺基酸殘基，稠合至來自遲緩芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶其餘的訊號序列上(ATCC 21536)。

蛋白酶變異體之"前原"型式由具有原序列並操作鏈結至



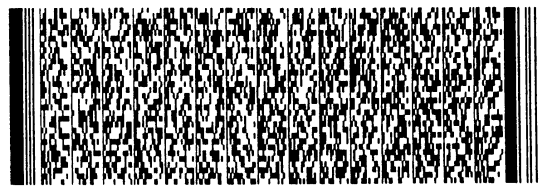
五、發明說明 (15)

蛋白酶之胺基末端之蛋白酶成熟型式，及操作性鏈結至原序列胺基末端之"前"或"訊號"序列所組成。

"表現載體"指一種DNA構體，其含有操作鏈結至適合的控制序列之DNA序列，可達成該DNA於適合宿主中之表現。此控制序列包括可達成轉錄作用之啟動子，可控制此轉錄作用之視所需之操作子序列，編碼適合的mRNA核糖體結合位置之序列及可控制轉錄及轉譯之序列。載體可為質體，噬菌體粒子，或單純的具潛力之基因體嵌入子。一旦轉形至適合的宿主內，載體可在和宿主基因體無關下複製及作用，或者在某些例子中是整合至基因體本身。在本說明書中，"質體"及"載體"有時可互換作用，因質體為目前最常用之載體型式。然而，本發明意欲包括其他型式之表現載體，其用於相當之功能且可以或將是技藝中已知的。

用於本發明之"宿主細胞"通常是原核或真核宿主，其較好已用US專利案RE 34,606所揭示之方法操作，使彼無法分泌具酵素活性之內蛋白酶。用於表現蛋白酶之較佳的宿主細胞是芽孢桿菌株BG2036，其缺乏具酵素活性之中性蛋白酶及鹼性蛋白酶(枯草桿菌蛋白酶)。BG2036株之構築詳述於US專利5,264,366。可表現蛋白酶之其他宿主細胞有枯草桿菌1168(也述於US專利案RE 34,606及US專利5,264,366，其揭示已列為此中參考)，以及任何適合的芽孢桿菌株，如地衣芽孢桿菌，遲緩芽孢桿菌等。

宿主細胞以利用重組體DNA技術所構築之載體轉形或轉感。此種經轉形之宿主細胞或可複製編碼蛋白酶變異體之



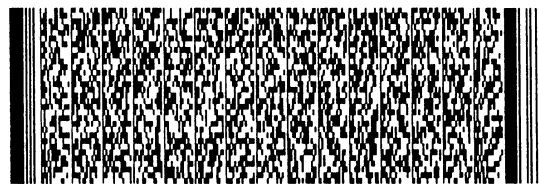
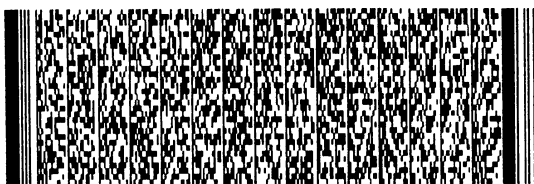
五、發明說明 (16)

載體，或可表現欲求之蛋白酶變異體。在編碼蛋白酶變異體之前-或前原-型式之載體例子中，此變異體當表現時通常可自宿主細胞分泌至宿主細胞介質中。

"操作性鏈結"，當描述二個DNA區域間之相互關係時，單純地表示其在功能上互相有關。例如，一段前序列若作用如訊號序列時可操作性鏈結至肽上，涉及於蛋白質成熟型式之分泌者最可能涉及於訊號序列之解離。一個啟動子若可控制序列之轉錄作用，即係操作性鏈結至編碼序列；一個核糖體若其定位使可令轉譯作用，則係操作性鏈結至編碼序列。

編碼自然生成之前軀體蛋白酶之基因，可依精藝者已知之一般方法獲得。方法通常包括合成具有推想序列之經標記探針，其編碼令人感興趣之蛋白酶區域，且可表現蛋白酶之有機體中製備基因庫，並由探針之雜交篩選基因庫中之重點基因。再定出陽性雜交之純系並予以定序。

所選殖之蛋白酶再用來轉形宿主細胞以表現蛋白酶。蛋白酶基因再連接至高套數之質體。此質體在宿主中複製，宿主中含有質體複製所必要之熟知之要件：操作鏈結至重點基因之啟動子(其若被宿主所確認，即轉錄，可呈基因本身之同質啟動子般供應)，轉錄終結子及聚腺苷化區域(為某些真核宿主細胞中自蛋白酶基因轉錄mRNA穩定性所必要的)，其係外源的或為蛋白酶基因之內源終結子區域所供應，且欲求地，選擇用基因如抗生素抗性基因，其經由在含有抗生素之培養基中生長可使感染有質體之宿主細



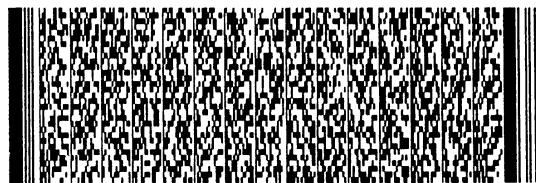
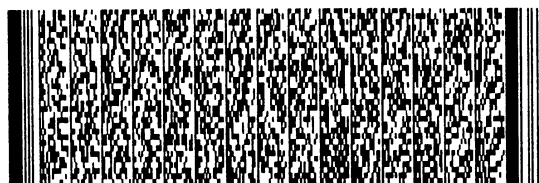
五、發明說明 (17)

胞連續維持。高套數之質體也含有用於宿主之複製源，因此使大量的質體可在胞質中產生而無染色體之限制。然而將多重套數之蛋白酶基因整合至宿主基因體中也在此中之範圍內。對於特易感受同質重組作用之原核及真核有機體此點尤其有益。

基因可為天然的遲緩芽孢桿菌基因。另外，也可產生編碼自然生成的或變異體前軀體蛋白酶之合成基因。在此途徑下，可決定出前軀體蛋白酶之DNA及/或胺基酸序列。之後合成多重，重疊的合成單股DNA片段，一旦雜交及連接可產生編碼前軀體蛋白酶之合成的DNA。合成基因構築之實例示於US專利5,204,015中之實例3，其揭示已列為本案參考。

一旦選殖出自自然生成的或合成的前軀體蛋白酶基因，應了解許多的處理修飾可用來加強基因之用法，超越自然生成之前軀體蛋白酶之合成。此處理修飾包括重組體蛋白酶之產製，如揭示於US專利案RE 34,606及EPO案No. 0 251 446及此中所述之蛋白酶變異體之產製。

可使手以下的匣式突變方法，以助本發明蛋白酶變異體之構築，然而其他的方法也可使用。首先，先獲得編碼蛋白酶之自然生成之基因，並整個或部份地定序。之後掃描序列，所針對之點係希望可在所編碼之酵素一個以上胺基酸上製作突變(刪除，嵌入或置換)。評估在此點鄰近之序列是否存在有限制位置，以供寡核苷酸匯集取代短基因片段之用，其中寡核苷酸匯集當表現時可編碼各種突變體。

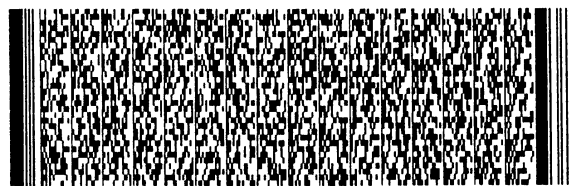
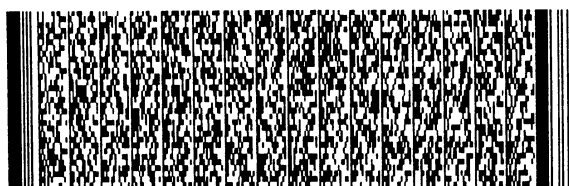


五、發明說明 (18)

此種限制位置較好是蛋白酶基因內之獨特位置，以助基因片段之取代。然而，也可使用蛋白酶基因中並非含量豐富之任何合宜的限制位置，只要由限制水解所產生之基因片段可以適合之序列組合即可。若限制位置與所選定點之距離不是在合宜的距離內(距10至15個核苷酸)，此位置由基因中置換核苷酸而產生，此一方式下讀譯架構及所編碼之胺基酸在最終之構築中均未改變。為了證實欲求序列，進行基因突變以改變其序列可由M13引子伸展作用依一般之已知方法完成。定位適合的鄰接區域並評估所需之變化，以到達二個合宜的限制位置序列，可由遺傳密碼之簡併性，基因之限制與圖及大量不同的限制酶來完成。可注意到若合宜的鄰接限制位置可運用時，只有在配合不含有位置之鄰接區域下才需採用上述方法。

一旦自然生成之DNA或合成的DNA被選殖，鄰接欲突變位置之限制位置可以關聯的限制位置水解，並將許多末端互補之寡核苷酸匣連接至基因內。以此方法可簡化突變作用，因為所有的寡核苷酸均可被合成以具有相同的限制位置，且在生成限制位置上勿需合成的連接子。

如此中所用的，蛋白水解活性可定義為每毫克活性酵素肽鍵水解之速率。在偵測蛋白水解活性方面有許多已知方法可運用(K.M. Kalisz, "Microbial Proteinases," *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, A. Fiechter ed., 1988)。除此之外或另一修飾蛋白水解活性之方法，本發明的變異體酵素也可有其他的修飾特性



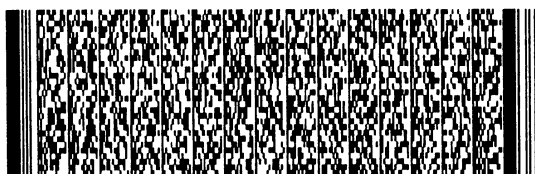
五、發明說明 (19)

，如 K_m ， K_{cat} ， K_{cat}/K_m 比例及/或經修飾之受質特異性及/或經修飾之 pH 活性概況。這些酵素可針對特殊受質修飾之，其預期存在於如肽製備中或水解過程，如於洗衣用途上。

在本發明一方面，本主題是確保和前軀體蛋白酶比較下具有不同蛋白水解活性之變異體蛋白酶，因為增加此活性（數字上較大）可使酵素之用途作用在標的受質上更有效率。另外令人感興趣的尚有具有不同之熱安定性及/或不同的受質特異性之變異體酵素（此係和前軀體比較而言）。在某些例子中，或者需要較低蛋白水解活性，如若欲求蛋白酶之合成活性時則減低之蛋白水解活性是有用的（如於合成肽時）。吾等可能希望可降低此蛋白水解活性，其可破壞此合成之產物。相反的，在某些例子中希望可增加變異體酵素相對於其前軀體之蛋白水解活性。另外，增加變異體之穩定性或減低之（改變），不論是鹼或熱穩定性，均是欲求的。 K_{cat} ， K_m 或 K_{cat}/K_m 之增加或降低對於決定這些動力學變數時所使用之受質是特異的。

在本發明另一方面，頃發現在一個以上殘基位置之胺基酸置換使置換改變該位置處之電荷，進而使電荷和前軀體蛋白酶比較下較具陰性而少陽性，則含此等置換之蛋白酶變異體在低清潔劑濃度中較前軀體蛋白酶更為有效。

本發明進一步方面是頃發現在一個以上殘基位置之胺基酸置換作用可改變該位置之電荷，使其與前軀體蛋白酶比較下更具陽性而少陰性，此等含置換作用之蛋白酶變異體在高清潔劑濃度下較前軀體蛋白酶更為有效。



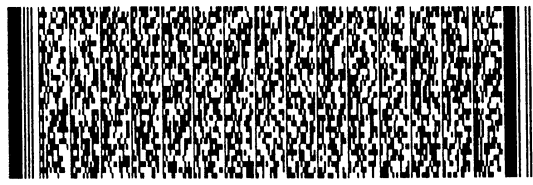
五、發明說明 (20)

再者，吾等發現許多在低清潔劑濃度系統及/或高清潔劑濃度系統中有用之蛋白酶變異體，在中清潔劑濃度系統中也是有效的。

這些置換作用較好是在遲緩芽孢桿菌(重組體或天然型式)枯草桿菌蛋白酶上進行，然而也可在任何芽孢桿菌蛋白酶中進行，較好是芽孢桿菌之枯草桿菌蛋白酶。

依據以變異體蛋白酶所得之篩選結果，在解澱粉芽孢桿菌枯草桿菌蛋白酶中所見之突變，對於這些酵素之蛋白水解活性，性能及/或穩定性，及此變異體酵素之清潔或洗滌性能而言是十分重要的。

本發明的許多蛋白酶變異體可用於調和和種清潔劑組成物。已知的許多化合物均是含有本發明蛋白酶變異體之組成物所適用之界面活性劑。這些包括非離子性，陰離子性，陽離子或兩性離子清潔劑，如US 4,404,128 Barry J. Anderson及US 4,261,868 Jiri Flora, et al. 所述。適合的清潔劑調和物述於US專利5,204,015中之實例7(先前已列為本案參考)。技藝中已熟知可充作清潔組成物的不同調和物。除了典型之清潔組成物，可容易明白的是本發明之蛋白酶變異體可應用於可使用天然或野生型蛋白酶之任何目的中。因此，這些變異體可用於如塊狀或液狀皂，洗碟調和物，隱形眼鏡清潔溶液或產物，肽水解，廢水處理，織品應用，充作蛋白質產製之融合-解離酵素等。本發明之變異體在清潔劑組成物中有加強之性能(和前軀體比較而言)。如此中所用的，清潔劑加強之性能可定義為



五、發明說明 (21)

對某些酵素敏感性污點加強清潔力，如草或血液，由標準洗滌循環後以尋常以評估法來決定。

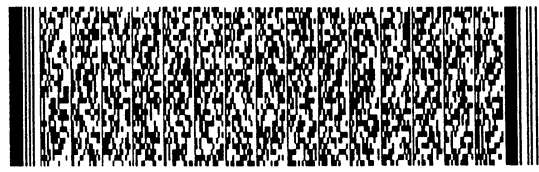
本發明之蛋白酶可調和成已知之粉末狀及液狀清潔劑，具有6.5及12.0間之pH值，且在約0.01至約5%（較好是0.1%-0.5%）按重計水平下。這些清潔劑清潔組成物也可包含有其他的酵素，如已知之蛋白酶，澱粉酶，纖維素酶，脂酶或內糖苷酶，以及組份及穩定劑。

在傳統的清潔組成物中加入蛋白酶並無任何特殊之使用限制。換言之，適於清潔劑之任何溫度及pH值，只要pH值在上述範圍之內，且溫度低於所述之蛋白酶變性溫度，均適於本組成物。此外，本發明之蛋白酶可用於無清潔劑之清潔組成物中，再次地其或可單獨地或與組份及穩定劑組合使用。

本發明也是有關含有本發明蛋白酶變異體之清潔組成物。清潔組成物可另外含有常用於清潔組成物之添加物。這些可選自如漂白劑，界面活性劑，組份，酵素及漂白催化劑。一般精藝者應可容易地明白，何種添加物適於納入組成物中。此中提出之表列絕非全部，且僅為適合添加物之實例而已。一般精藝也可容易地明白，只可以使用與酵素及組成物中之其他組份，如界面活性劑，相容之添加物。

當存在時，存在於清潔組成物中之添加物含量由約0.01%至約99.9%，較好是約1%至約95%，又更好是由約1%至約80%。

本發明之變異體蛋白酶可納入動物飼料中，如部份的動



五、發明說明 (22)

物飼料添加物，如述於US 5,612,055；US 5,314,692；及US 5,147,642。

本發明的一方面是處理織品之組成物，其中包括有本發明之變異體蛋白酶。組成物可用來處理如絲或羊毛，如RD 216,034；EP 134,267；US 4,533,359；及EP 344,259上所述。

示出下列係經由實例，且不欲因此限制本申請專利範圍之範疇。

此中參考的所有申請案及專利，係以全文供為本案參考。

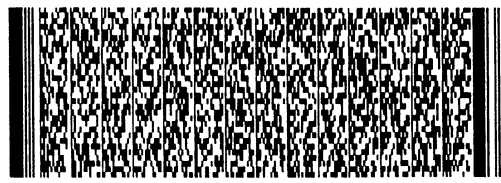
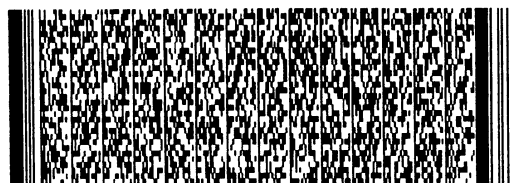
實例1

利用技藝中熟知之方法產製及純化大量蛋白酶變異體。

試驗所產生之蛋白酶變異體，以在二種清潔劑及洗滌條件型式下進行，其中利用U.S.系列案No. 60/068,796"分析較佳酵素及/或較佳清潔劑組成物之改進方法"中所述之微量洗滌分析法。

表1-13列出所分析之變異體蛋白酶，及於二種不同清潔劑中測試之結果。在各表中，基於此實例目的，第一種變異體是前軀體蛋白酶，且在表中接著的變異體有額外的突變生成。如此，此表中之前軀體蛋白酶比較以出示所有數值(即1.32之數值表示和標準品之100%相對下，可釋出132%污點之能力)。

A欄示出變異體與其表上之前軀體之電荷差值。B欄中清潔劑為0.67克/升經過濾之Ariel Ultra (Procter &



五、發明說明 (23)

Gamble, Cincinnati, OH, USA), 於含有3克/加侖混合的 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 硬度之溶液中, 且各孔洞在25 °C 下使用0.3 ppm 酵素。於C 欄, 清潔劑為3.38 克/升經過濾之Ariel Futur (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, USA), 於含有15 克/加侖混合的 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 硬度之溶液中, 且各孔洞在40 °C 下使用0.3 ppm 酵素。



五、發明說明 (24)

表 1

						A	B	C
N76D	S103A	V104I	Q109R				1.00	1.00
N76D	S103A	V104I	Q109R	Q245R		+1	0.48	1.41

表 2

									A	B	C
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	Q245R				1.00	1.00
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	N204D	Q236H	Q245R		-1	1.11	0.03

表 3

						A	B	C
V68A		N76D	S103A	V104I			1.00	1.00
T22K	V68A	N76D	S103A	V104I		+1	0.74	1.85

表 4

							A	B	C
	N76D	S103A	V104I	N173R	M222S		0	0.66	1.84
Q12R	N76D	S103A	V104I	M222S	Q245R		+1	0.41	5.84



五、發明說明 (25)

										A	B	C
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R					1.00	1.00
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R	N261D			-1	1.79	0.81
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	R170S	N185D	M222S	N243D	Q245R	-3	2.87	0.02

表 5

表 6

										A	B	C
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H						1.00	1.00
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	Q245R				+1	0.94	6.80
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K			+3	0.44	20.60

表 7

										A	B	C
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R				1.00	1.00
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210R	A232V	Q236H	Q245R		+1	0.44	2.66



五、發明說明 (26)

								A	B	C
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K		1.00	1.00
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	-1	1.96 0.65

表 8

								A	B	C
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R			1.00	1.00
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	K237E	Q245R		-2 1.27	0.12

表 9

										A	B	C
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V				1.00	1.00
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V		-1	1.56	0.48

表 10

									A	B	C
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			1.00	1.00

表 11



五、發明說明 (27)

S103A	V104I	G159D	L217E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	-1	1.90	0.15
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	----	------	------

表 12

										A	B	C
S103A	V104I	S101G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			1.00	1.00
N76D	S103A	V104I	S101G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	-1	1.28	0.39

表 13

										A	B	C	
N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		1.00	1.00	
N62D	S103A	V104I	Q109R	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	+1	0.40	1.74

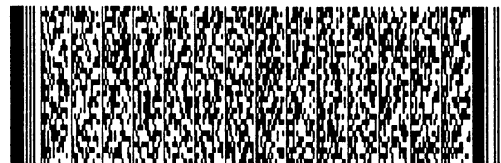


四、中文發明摘要 (發明之名稱：經淨電荷改變之多重取代蛋白酶變異體，其用於清潔劑)

本發明揭示衍自自然生成或重組體非人類蛋白酶DNA序列之新穎的蛋白酶變異體。大體來說，變異體蛋白酶由編碼自然生成的或重組體蛋白酶之前驅體DNA序列經過試管內處理修飾而得，以在前驅體蛋白酶胺基酸序列中產生許多胺基酸殘基之置換。在此提出蛋白酶變異體，其中在一個以上殘基位置上含有胺基酸之置換，如此置換作用可改變該位置之電荷，使電荷與前驅體蛋白酶比較下較具陰性或較不具陽性，且因此蛋白酶變異體在低清潔劑濃度系統中較前驅體蛋白酶更為有效。本發明也提出含有在一個以上殘基位置上有胺基酸置換之蛋白酶變異體，如此置換作用可改變該位置之電荷，使與前驅體蛋白酶比較下，有較陽性或較少陰性之電荷，且因此蛋白酶變異體在高清潔劑

英文發明摘要 (發明之名稱：MULTIPLY-SUBSTITUTED PROTEASE VARIANTS WITH ALTERED NET CHARGE FOR USE IN DETERGENTS)

Novel protease variants derived from the DNA sequences of naturally-occurring or recombinant non-human proteases are disclosed. The variant proteases, in general, are obtained by in vitro modification of a precursor DNA sequence encoding the naturally-occurring or recombinant protease to generate the substitution of a plurality of amino acid residues in the amino acid sequence of a precursor protease. Protease variants are provided that contain substitutions of the amino acids at



四、中文發明摘要 (發明之名稱：經淨電荷改變之多重取代蛋白酶變異體，其用於清潔劑)

濃度系統中較前驅體蛋白酶更為有效。

本發明也提出蛋白酶變異體，其中在一個以上殘基位置上含有胺基酸置換作用，如此置換會改變該位置上之電荷，使電荷與前驅體蛋白酶比較下較具陰性或較少陽性，且因此蛋白酶變異體較前驅體蛋白質於中清潔劑濃度系統中較為有效。在此也提出在一個以上殘基位置上含有胺基酸置換作用之蛋白酶變異體，如此置換作用可改變該位置上之電荷，使其較前驅體蛋白酶更具陽性或少陰性，且因此較前驅體蛋白酶可在中性清潔劑濃度系統中更為有效。

英文發明摘要 (發明之名稱：MULTIPLY-SUBSTITUTED PROTEASE VARIANTS WITH ALTERED NET CHARGE FOR USE IN DETERGENTS)

one or more residue positions so that the substitution alters the charge at that position to make the charge more negative or less positive compared to a precursor protease and thus the protease variant is more effective in a low detergent concentration system than a precursor protease. Also provided are protease variants containing substitutions of the amino acids at one or more residue positions so that the substitution alters the charge at that position to make the



四、中文發明摘要 (發明之名稱：經淨電荷改變之多重取代蛋白酶變異體，其用於清潔劑)

進一步提出產製蛋白酶變異體之方法，其在低清潔劑濃度系統、中清潔劑濃度系統及高清潔劑濃度系統中較前驅體蛋白酶更為有效。

英文發明摘要 (發明之名稱：MULTIPLY-SUBSTITUTED PROTEASE VARIANTS WITH ALTERED NET CHARGE FOR USE IN DETERGENTS)

charge more positive or less negative compared to a precursor protease and thus the protease variant is more effective in a high detergent concentration system than a precursor protease.

Protease variants are provided that contain substitutions of the amino acids at one or more residue positions so that the substitution alters the charge at that position to make the charge more negative or less positive compared to a precursor protease and thus the protease variant is more



四、中文發明摘要 (發明之名稱：經淨電荷改變之多重取代蛋白酶變異體，其用於清潔劑)

英文發明摘要 (發明之名稱：MULTIPLY-SUBSTITUTED PROTEASE VARIANTS WITH ALTERED NET CHARGE FOR USE IN DETERGENTS)

effective in a medium detergent concentration system than a precursor protease. Also provided are protease variants containing substitutions of the amino acids at one or more residue positions so that the substitution alters the charge at that position to make the charge more positive or less negative compared to a precursor protease and thus the protease variant is more effective in a medium detergent concentration system than a precursor protease.

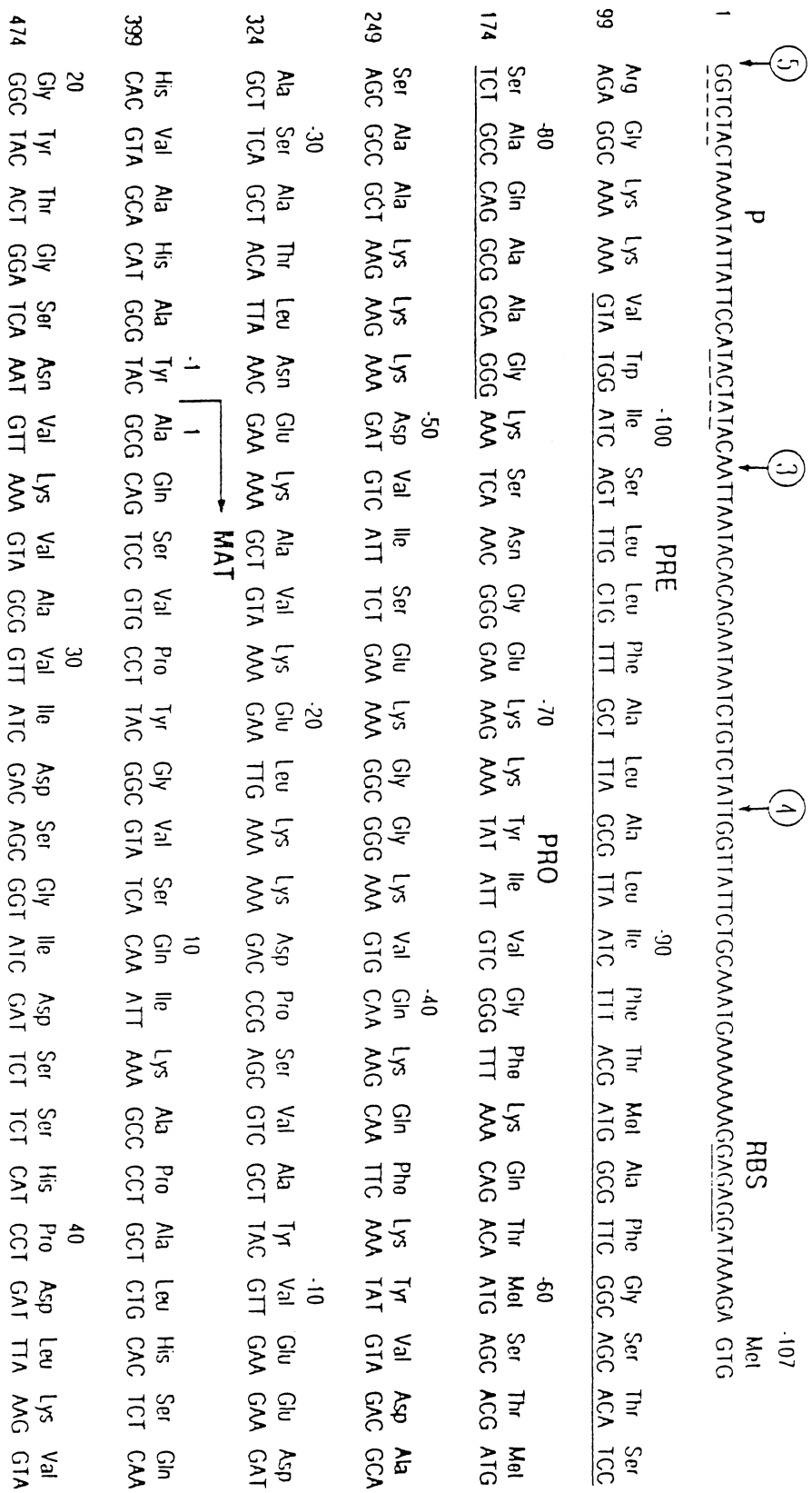


四、中文發明摘要 (發明之名稱：經淨電荷改變之多重取代蛋白酶變異體，其用於清潔劑)

英文發明摘要 (發明之名稱：MULTIPLY-SUBSTITUTED PROTEASE VARIANTS WITH ALTERED NET CHARGE FOR USE IN DETERGENTS)

Further provided is a method of producing a protease variant that is more effective in a low detergent concentration system, medium detergent concentration system and high detergent concentration system than a precursor protease.





圖

IB-1

圖式

	Ala	Gly	Gly	Ala	Ser	Met	Val	Pro	Ser	Glu	Thr	Asn	Pro	Asn	60	Asp	Asn	Ser	His	Gly	Thr	His	Val	Ala	
549	GCA	GGC	GGA	CCC	AGC	ATG	GTT	CCT	TCT	GAA	ACA	AAI	CCT	TTC	CAA	GAC	AAI	TCT	CAC	GGA	ACT	CAC	GTT	GGC	
70	Gly	Thr	Val	Ala	Ala	Leu	Asn	Asn	Ser	Ile	Gly	Val	Leu	Gly	Val	Ala	Pro	Ser	Ala	Ser	Leu	Tyr	Ala	Lys	
024	GGC	ACA	GTT	GGC	GCT	CTT	AAI	AAI	TCA	ATC	GGT	GTA	TTA	GGC	GTT	CCG	CCA	AGC	GCA	TCA	CTT	TAC	GCT	GTA	AAA
699	Val	Leu	Gly	Ala	Asp	Ala	100	Ser	Gly	Gln	Tyr	Ser	Trp	Ile	Ile	Asn	Gly	Ile	Glu	Trp	Ala	Ile	Ala	Asn	Met
120	GTT	CTC	GGT	GCT	GAC	GGT	TCC	GGC	CAA	TAC	AGC	TGG	ATC	ATT	MAC	GGA	ATC	GAG	TGG	GGC	ATC	GCA	MAC	AAI	ATG
774	Asp	Val	Ile	Asn	Met	Ser	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Gly	Ser	Ala	Ala	Leu	Lys	Ala	Ala	Val	Asp	Lys	Ala	Val	Ala
849	GAC	GTT	ATT	AAI	ATG	AGC	CTC	GGC	GGA	CCT	TCT	GGT	TCT	GCT	GCT	TTA	AAA	GGC	GCA	GTT	GAT	AAA	CCC	GTT	GCA
170	Ser	Gly	Val	Val	Val	Val	150	Ala	Ala	Ala	Gly	Asn	Glu	Gly	Thr	Ser	Gly	Ser	Ser	Thr	Val	Gly	Tyr	Pro	Gly
924	TCC	GGC	GTC	GTA	GTC	GTT	GGC	GCA	GGC	GGT	AAI	GAA	GGC	ACT	TCC	GGC	AGC	TCA	AGC	ACA	GTG	GGC	TAC	CCT	GGT
224	Lys	Tyr	Pro	Ser	Val	Ile	Ala	Val	Gly	Ala	Val	Asp	Ser	Ser	Asn	Gln	Arg	Ala	Ser	Pro	Ser	Val	Gly	Pro	Pro
999	AAA	TAC	CCT	TCT	GTC	ATT	GCA	GTA	GGC	GCT	GTT	CAC	AGC	AGC	MAC	CAA	AGA	GCA	TCT	TTC	TCA	AGC	GTA	GGA	CCT
220	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
1074	GAG	CTT	GAT	GTC	ATG	GCA	CCT	GGC	GTA	TCT	ATC	CAA	AGC	ACG	CTT	CCT	GGA	AAI	AAA	TAC	GGG	CCG	TAC	MAC	GGT
230	Thr	Ser	Met	Ala	Ser	Pro	His	Val	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Leu	Ile	Leu	Ser	Lys	His	Pro	Asn	Trp	Thr	Asn	Thr
240	ACG	TCA	ATG	GCA	TCT	CCG	CAC	GTT	GGC	GGA	GGC	GCT	GCT	TTG	ATT	CTT	TCT	AAI	CAC	CCG	MAC	TGG	ACA	MAC	ACT

圖 1B-2

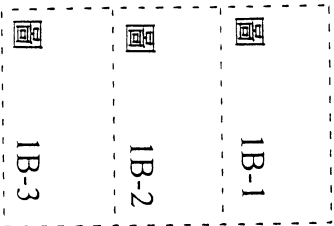
圖式

圖式

250 Gln 260
Gln Val Arg Ser Ser Leu Glu Asn Thr Thr Lys Leu Gly Asp Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn
1149 CAA GTC CGC AGC AGT TTA GAA AAC ACC ACT ACA AAA CTT GGT GAT ICT TTC TAC TAT GGA AAA GGG CTG ATC AAC
270 275
Val Gln Ala Ala Ala Gln OC
1224 GTA CAG GCG GCA GCT CAG TAA MCATATAAAACCGGCTTGCGCCCGCGTTTATTTTCTTCCTCCGCATGTTCAATCCGCTCC
TERM
1316 ATATCGACGGATGGCTCCCTCTGAAAATTTTACGAGAAACGGCGGGTTGACCCGGCTCAGTCCCGTAACGGCCAMGTCCTGMAACGTCICAAATCGCCG
1416 CTTCCCGGTTCCGGTCAGCTCAATGCCGTAACGGTCCGGCGGCTTTTCTGATACCGGAGACGGCAATTCGTAAATCGGATC

圖 1B-3

圖 1B



圖式

來自解澱粉芽孢桿菌之枯草桿菌蛋白酶之固有殘基

```

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 . .

```

圖 2

來自下列枯草桿菌蛋白酶序列之比較：
解澱粉芽孢桿菌
枯草桿菌
地衣芽孢桿菌
遲緩芽孢桿菌

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

圖式

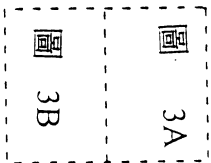
圖 3A

圖式

161	S S S T V G Y P G K X P S V I A V G A V D S S N Q R A S F S S S V G P E L D V M A	170	S S S T V G Y P G K X P S V I A V G A V D S S N Q R A S F S S S V G P E L D V M A	180	S S S T V G Y P G K X P S V I A V G A V D S S N Q R A S F S S S V G P E L D V M A	190	S S S T V G Y P G K X P S V I A V G A V D S S N Q R A S F S S S V G P E L D V M A
201	P G V S I Q S T L P G N K Y G A Y N G T S M A S P H V A G A A A L I L S K H P N	210	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	220	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	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
241	W T N T Q V R S S L E N T T T K L G D S F Y Y G K G L I N V Q A A A A Q	250	W T N T Q V R S S L E N T T T K L G D S F Y Y G K G L I N V Q A A A A Q	260	W T N T Q V R S S L E N T T T K L G D S F Y Y G K G L I N V Q A A A A Q	270	W T N T Q V R S S L E N T T T K L G D S F Y Y G K G L I N V Q A A A A Q

圖 3B

圖 3



六、申請專利範圍

1. 一種枯草桿菌蛋白酶變異體，其在選自由包括A1E, V4E, Q12H, Q12R, A16T, R19C, R19L, T38S, L42I, L42V, A48T, N62H, V68A, I72V, N76D, N77D, A98E, S101G, S103A, V104I, L111M, N123S, S130T, A133T, G146S, A158E, G159D, R170S, A174V, N183D, N184D, N185D, S188E, N204D, Q206E, L217E, M222S, T224A, A232V, Q236H, K237E, K237Q, N238S, N243D, V244A, Q245L, Q245R, N248D, H249Q, H249Y, K251T, N252K, N252D, L257V, N261D, T274A及R275H所組成之群組中之一個以上殘基位置上含有胺基酸置換作用，其中置換會改變該位置之電荷，使電荷較前軀體蛋白酶更具陰性或少陽性，且其中蛋白酶變異體在低清潔劑濃度系統中較前軀體蛋白酶更為有效。

2. 根據申請專利範圍第1項之枯草桿菌蛋白酶變異體，其係衍生自芽孢桿菌之枯草桿菌蛋白酶。

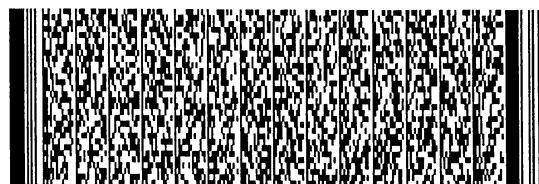
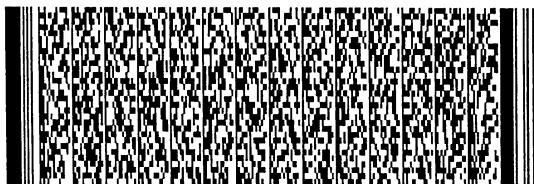
3. 根據申請專利範圍第2項之枯草桿菌蛋白酶變異體，其係衍生自遲緩芽孢桿菌之枯草桿菌蛋白酶。

4. 一種編碼申請專利範圍第1項之枯草桿菌蛋白酶變異體之DNA。

5. 一種編碼申請專利範圍第4項之DNA之表現載體。

6. 一種以申請專利範圍第5項之表現載體所轉形之宿主細胞。

7. 一種含有申請專利範圍第1項之枯草桿菌蛋白酶變異體之清潔組成物。



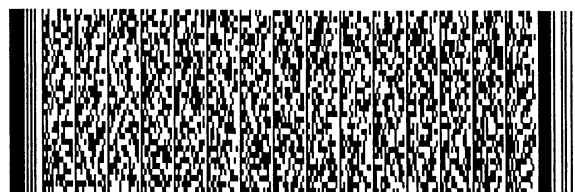
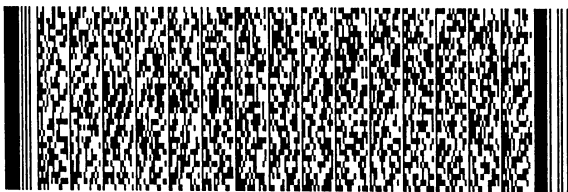
六、申請專利範圍

8. 一種含有申請專利範圍第1項之枯草桿菌蛋白酶變異體之動物飼料。

9. 一種處理織品之組成物，其中含有根據申請專利範圍第1項之枯草桿菌蛋白酶變異體。

10. 一種枯草桿菌蛋白酶變異體，其在選自由包括Q12R, A13T, H17L, G20R, T22K, T38G, N43S, A48V, T58S, N62D, V68A, N76D, S87R, E89D, A98V, S99G, S101G, G102A, S103A, V104I, Q109R, N116K, S128G, P131V, Q137R, N140D, G159D, D181N, N183K, N183I, N184G, N185D, A194P, V205I, Q206R, Y209W, Y209F, P210F, P210R, P210L, P210I, G211R, S212C, S212G, S212P, T213Q, T213R, T213S, Y214L, A215R, A215V, S216T, S216V, L217E, N218S, M222S, T224A, A228T, A228V, A230V, A232V, Q236H, K237E, S242P, S242T, V244A, V244T, Q245R, N248D, N248S, N248G, N252K, N252S, N252L, T255V, S256R, S256N, L257V, L257R, G258R, S259G, T260A, T260R, T260V, N261Y, N261R, V268F, E271V, E271Q, E271G及A272S所組成之群組之一個以上殘基位置上含有胺基酸置換作用，其中置換可改變該位置之電荷使電荷較前軀體蛋白酶更具陽性或少陰性，且其中蛋白酶變異體在高清潔劑濃度系統中較前軀體蛋白酶更為有效。

11. 根據申請專利範圍第10項之枯草桿菌蛋白酶變異體，其係衍生自芽孢桿菌之枯草桿菌蛋白酶。



六、申請專利範圍

12. 根據申請專利範圍第11項之枯草桿菌蛋白酶變異體，其係衍生自遲緩芽孢桿菌之枯草桿菌蛋白酶。

13. 一種編碼申請專利範圍第10項之枯草桿菌蛋白酶變異體之DNA。

14. 一種編碼申請專利範圍第13項之DNA之表現載體。

15. 一種以申請專利範圍第14項之表現載體所轉形之宿主細胞。

16. 一種含有申請專利範圍第10項之枯草桿菌蛋白酶變異體之清潔組成物。

17. 一種含有申請專利範圍第10項之枯草桿菌蛋白酶變異體之動物飼料。

18. 一種處理織品之組成物，其中含有根據申請專利範圍第10項之枯草桿菌蛋白酶變異體。

19. 根據申請專利範圍第1項之枯草桿菌蛋白酶變異體，其中的高清潔劑濃度是洗液中之濃度大於2000 ppm。

20. 根據申請專利範圍第10項之枯草桿菌蛋白酶變異體，其係為具有S103A, V104I, G159D, A232V, Q245R, N248D及N252K之變異體S0055C09。

21. 一種產製枯草桿菌蛋白酶變異體之方法，其在低，中及高清潔劑濃度系統中較前軀體蛋白酶更為有效，其方法包括：

a) 在一個以上殘基位置上置換胺基酸，其中之置換可改變該位置之電荷，使電荷較前軀體蛋白酶更具陽性或少陰性；



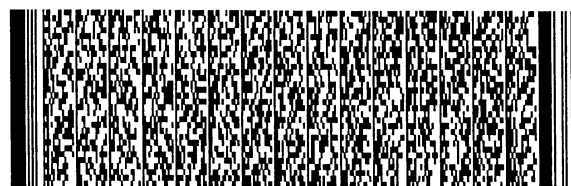
六、申請專利範圍

b) 在一個以上殘基位置置換胺基酸，其中置換可改變該位置之電荷，使電荷較前軀體蛋白酶更具陰性或少陽性；

c) 測試變異體以決定其與前軀體蛋白酶比較下，在高、中及低清潔劑濃度系統中之效力；及

d) 依必要重覆步驟a)-c)，以產生在低、中及高清潔劑濃度系統中較前軀體蛋白酶更為有效之蛋白酶變異體。

22. 一種枯草桿菌蛋白酶變異體，其在選自包括S3L, Q12R, G203, K27N, T38G, N62D, V68A, N76D, E89D, G97E, A98D, A98L, S99E, S99G, S10AG, G102A, S103A, V104I, S106E, Q109E, Q109R, S128L, S128G, S130A, S130G, P131V, A133V, G159D, S160V, S166D, Y167F, N173D, N184D, N184G, N185D, A194P, V205I, Q206E, Q206R, Y209F, Y209W, P210I, P210L, P210R, S212C, S212E, S212G, T213Q, T213E, T213R, T213S, A215R, A215V, S216C, S216T, S216V, L217E, N218S, A228V, A230V, A232V, Q236H, V244A, V244T, Q245R, Q245V, N248D, N248G, N252F, N252K, N252L, T255V, N256E, S256R, L257R, G258D, S260R, T260A, N261R及E271Q所組成之群組中之一個以上殘基位置上含有胺基酸置換，其中置換會改變該位置處之電荷，使電荷較前軀體蛋白酶更為陽性或少陰性，且其中蛋白酶變異體在中清潔劑濃度系統中較前軀體蛋白酶更為有效。



修正
93. 3. 08 補充

圖式

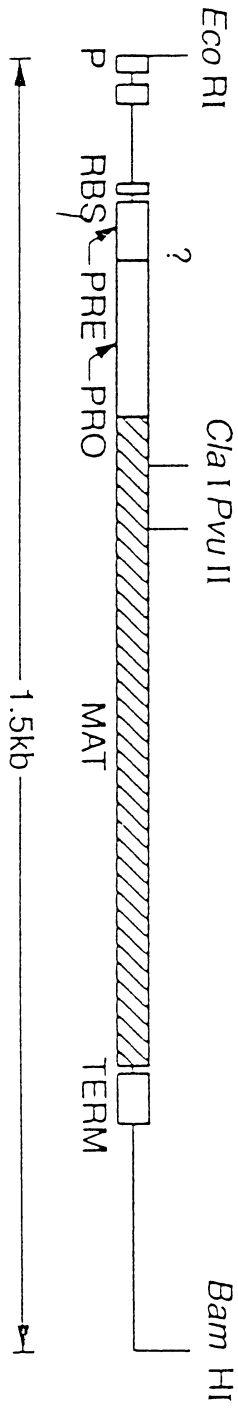


圖 1A