

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5863666号  
(P5863666)

(45) 発行日 平成28年2月17日(2016.2.17)

(24) 登録日 平成28年1月8日(2016.1.8)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 9/56 (2006.01)	C 1 2 N 9/56
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21

請求項の数 12 (全 417 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-543275 (P2012-543275)	(73) 特許権者	509240479
(86) (22) 出願日	平成22年12月9日(2010.12.9)		ダニスコ・ユーエス・インク
(65) 公表番号	特表2013-513385 (P2013-513385A)		アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94
(43) 公表日	平成25年4月22日(2013.4.22)		304、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925
(86) 国際出願番号	PCT/US2010/059628	(74) 代理人	100071010
(87) 国際公開番号	W02011/072099		弁理士 山崎 行造
(87) 国際公開日	平成23年6月16日(2011.6.16)	(74) 代理人	100118647
審査請求日	平成25年12月6日(2013.12.6)		弁理士 赤松 利昭
(31) 優先権主張番号	61/285, 127	(74) 代理人	100138438
(32) 優先日	平成21年12月9日(2009.12.9)		弁理士 尾首 亘聰
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100138519
(31) 優先権主張番号	61/392, 373		弁理士 奥谷 雅子
(32) 優先日	平成22年10月12日(2010.10.12)	(74) 代理人	100123892
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 内藤 忠雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロテアーゼ変異体を含む組成物及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

親プロテアーゼの単離されたプロテアーゼ変異体であって、前記変異体は、X 0 2 4 G / R、X 0 5 3 G、X 0 7 8 N、X 1 0 1 N、X 1 2 8 A / S 及び X 2 1 7 L / Q のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含み、ここで、前記変異体は配列番号2のアミノ酸配を有する B P N ' プロテアーゼのものと比較して高められたタンパク質分解活性および/または洗淨活性を有し、親プロテアーゼは配列番号2のアミノ酸配列からなり、前記変異体の各アミノ酸位置は、配列番号2のアミノ酸配列と前記変異体のアミノ酸配列とのアラインメントによって決定される、配列番号2のアミノ酸配列におけるアミノ酸位置に対応させることにより番号付けされる、変異体。

【請求項2】

前記変異体のアミノ酸配列がアミノ酸置換 X 0 9 7 A を更に含む、請求項1に記載の変異体。

【請求項3】

前記変異体のアミノ酸配列がアミノ酸置換 S 0 2 4 G + S 0 5 3 G + S 0 7 8 N + S 1 0 1 N + G 1 2 8 S + Y 2 1 7 Q 又は S 0 2 4 G + S 0 5 3 G + S 0 7 8 N + S 1 0 1 N + G 1 2 8 A + Y 2 1 7 Q を含む、請求項1に記載の変異体。

【請求項4】

更に、( i ) N 1 0 9 G、N 0 7 6 D、S 0 3 3 T、N 2 4 3 V、S 2 4 8 A、A 0 8 8 T、及び S 0 6 3 G からなる群から選択される置換を含むか、又は

( i i ) 以下のもの :

A 0 8 8 T + N 1 0 9 G + A 1 1 6 T + G 1 3 1 H + N 2 4 3 V + L 2 5 7 G、  
S 0 3 3 T + N 0 7 6 D、  
S 0 0 9 T + N 1 0 9 G + K 1 4 1 R + N 2 4 3 V、  
S 1 6 2 G + K 2 5 6 R、  
N 1 0 9 G + A 1 1 6 T、  
N 1 0 9 G + L 2 5 7 G、  
S 1 6 2 G + L 2 5 7 G、  
N 0 6 1 G + N 1 0 9 G + N 2 4 3 V、  
N 1 0 9 G + N 2 4 3 V + S 2 4 8 A、  
S 0 3 3 T + N 0 7 6 D + N 1 0 9 G + N 2 1 8 S + N 2 4 3 V + S 2 4 8 N + K 2 5  
6 R、

10

N 1 0 9 G + A 1 1 6 T + N 2 4 3 V + K 2 5 6 R、  
A 0 8 8 T + N 1 0 9 G + A 1 1 6 T + G 1 3 1 H + N 2 4 3 V、  
A 0 8 8 T + N 1 0 9 G、  
N 1 0 9 G + N 2 4 3 V、  
T 1 5 8 S + L 2 5 7 G、  
N 0 6 1 S + N 1 0 9 G + N 2 4 3 V、

P 0 4 0 A + N 1 0 9 G + N 2 4 3 V + S 2 4 8 N + K 2 5 6 R、  
S 0 0 9 T + S 0 1 8 T + Y 0 2 1 N + N 1 0 9 G + K 1 4 1 R、

20

A 0 8 8 T + N 1 0 9 G + A 1 1 6 T + T 1 5 8 S + N 2 4 3 V + K 2 5 6 R、

A 0 8 8 T + N 1 0 9 G + A 1 1 6 T + T 1 5 8 S + N 2 1 8 S + L 2 5 7 G、

N 1 0 9 G + K 2 5 6 R、

N 1 0 9 G + N 2 4 3 V + K 2 5 6 R、

S 0 6 3 G + K 2 5 6 R、

S 0 6 3 G + N 1 0 9 G、

S 0 6 3 G、

S 0 6 3 G + N 0 7 6 D、

S 0 3 3 T + N 0 7 6 D + N 2 1 8 S、及び

N 0 7 6 D + N 2 1 8 S からなる群から選択される 1 組のアミノ酸置換を更に含む、請求  
項 3 に記載の変異体。

30

【請求項 5】

前記変異体のアミノ酸配列が、配列番号 2 又は配列番号 6 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80% の配列同一性を有するか、又は少なくとも 85% の配列同一性を有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の変異体。

【請求項 6】

前記変異体が配列番号 6 のアミノ酸配列を有するか、または B P N ' S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q の配列を有する、請求項 1 に記載の変異体。

【請求項 7】

前記変異体が、配列番号 6 の配列を有するプロテアーゼのタンパク質分解活性と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の変異体。

40

【請求項 8】

配列番号 3 若しくは配列番号 5 に記載のポリヌクレオチド配列又はその相補的ポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 80% の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む、請求項 1 乃至 7 のいずれか 1 項に記載の変異体をコードするポリヌクレオチド配列を有する単離された核酸。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の少なくとも 1 つの核酸を含み、前記少なくとも 1 つの核酸がプロモーターに作用可能に連結されている、発現ベクター。

50

## 【請求項 10】

(a) 請求項 8 に記載の核酸、あるいは、(b) 請求項 9 に記載の発現ベクターを含み、前記宿主細胞が細菌細胞である、組み換え宿主細胞。

## 【請求項 11】

プロテアーゼ変異体の製造方法であって、前記方法が、前記変異体の生産を促進する条件下で請求項 10 に記載の組み換え宿主細胞を培養すること、および前記細胞培養物から前記変異体を回収することを更に含む、方法。

## 【請求項 12】

クリーニングの必要のある物品又は表面をクリーニングするための方法であって、前記方法が、前記物品又は表面を、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の変異体と接触させることを含み、任意で前記物品又は表面を水ですすぐことを更に含む、方法。

10

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、米国特許仮出願番号 61 / 285 , 127 (2009年12月9日出願) 及び同 61 / 392 , 373 (2010年10月12日出願) の優先権及び利益を主張し、これら各々の開示は全ての目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれるものとする。

## 【0002】

20

(発明の分野)

本発明は、プロテアーゼ変異体、プロテアーゼ変異体を含む組成物、並びに、このようなプロテアーゼ変異体及びこれらの組成物を使用する方法を提供する。

## 【背景技術】

## 【0003】

プロテアーゼは工業用酵素の技術分野において長きにわたって周知であるが、特定の条件及び使用に好適である改変プロテアーゼ (engineered proteases) が依然として必要とされている。本発明は、これらのニーズ及び他のニーズを満たす。

## 【発明の概要】

## 【課題を解決するための手段】

30

## 【0004】

第一態様では、本発明は、親プロテアーゼ酵素の単離されたプロテアーゼ変異体を提供し、このプロテアーゼ変異体はタンパク質分解活性を有し、位置 24、53、78、97、101、128 及び 217 からなる群から選択される配列番号 2 のアミノ酸位置に対応する 1 つ以上のアミノ酸位置において変異を含むアミノ酸配列を含み、ここで、変異の少なくとも 1 つは独立して、(i) この位置を占めるアミノ酸残基の上流又は下流における 1 つ以上のアミノ酸残基の挿入、(ii) この位置を占めるアミノ酸残基の欠失、又は (iii) 異なるアミノ酸残基による、この位置を占めるアミノ酸残基の置換、であり、ここで、各アミノ酸位置は、配列番号 2 のアミノ酸配列と変異体のアミノ酸配列とのアラインメントによって決定される配列番号 2 に記載のバチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) スプチリシンプロテアーゼ BPN' のアミノ酸配列におけるアミノ酸位置に対応させることにより番号付けされる。

40

## 【0005】

第二態様では、本発明は、親プロテアーゼの単離されたプロテアーゼ変異体を提供し、この変異体は、X024G/R、X053G、X078N、X101N、X128A/S 及び X217L/Q からなる群から選択される 3 つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含み、ここで、この変異体はタンパク質分解活性を有し、この変異体の各アミノ酸位置は、配列番号 2 のアミノ酸配列と変異体のアミノ酸配列とのアラインメントによって決定される配列番号 2 のアミノ酸配列におけるアミノ酸位置に対応させることにより番号付けされる。

50

## 【 0 0 0 6 】

第三態様では、本発明は、タンパク質分解活性を有する単離されたポリペプチドを提供し、上記ポリペプチドは、

a) BPN' - S 0 2 4 G + S 0 5 3 G + S 0 7 8 N + S 1 0 1 N + G 1 2 8 A + Y 2  
1 7 Q + A 0 8 8 T + N 1 0 9 G + A 1 1 6 T + G 1 3 1 H + N 2 4 3 V + L 2 5 7 G、

b) BPN' - S 0 2 4 G + S 0 5 3 G + S 0 7 8 N + S 1 0 1 N + G 1 2 8 A + Y 2  
1 7 Q + S 0 3 3 T + N 0 7 6 D、

c) BPN' - S 0 2 4 G + S 0 5 3 G + S 0 7 8 N + S 1 0 1 N + G 1 2 8 S + Y 2  
1 7 Q + S 0 0 9 T + N 1 0 9 G + K 1 4 1 R + N 2 4 3 V、

d) BPN' - S 0 2 4 G + S 0 5 3 G + S 0 7 8 N + S 1 0 1 N + G 1 2 8 A + Y 2  
1 7 Q + S 1 6 2 G + K 2 5 6 R、

10

e) BPN' - S 0 2 4 G + S 0 5 3 G + S 0 7 8 N + S 1 0 1 N + G 1 2 8 A + Y 2  
1 7 Q + N 1 0 9 G + A 1 1 6 T、

f) BPN' - S 0 2 4 G + S 0 5 3 G + S 0 7 8 N + S 1 0 1 N + G 1 2 8 A + Y 2  
1 7 Q + N 1 0 9 G + L 2 5 7 G、

g) BPN' - S 0 2 4 G + S 0 5 3 G + S 0 7 8 N + S 1 0 1 N + G 1 2 8 A + Y 2  
1 7 Q + S 1 6 2 G + L 2 5 7 G、

h) BPN' - S 0 2 4 G + S 0 5 3 G + S 0 7 8 N + S 1 0 1 N + G 1 2 8 A + Y 2  
1 7 Q + N 0 6 1 G + N 1 0 9 G + N 2 4 3 V、

i) BPN' - S 0 2 4 G + S 0 5 3 G + S 0 7 8 N + S 1 0 1 N + G 1 2 8 S + Y 2  
1 7 Q + N 1 0 9 G + N 2 4 3 V + S 2 4 8 A、

20

j) BPN' - S 0 2 4 G + S 0 5 3 G + S 0 7 8 N + S 1 0 1 N + G 1 2 8 S + Y 2  
1 7 Q + S 0 3 3 T + N 0 7 6 D + N 1 0 9 G + N 2 1 8 S + N 2 4 3 V + S 2 4 8 N +  
K 2 5 6 R、

k) BPN' - S 0 2 4 G + S 0 5 3 G + S 0 7 8 N + S 1 0 1 N + G 1 2 8 A + Y 2  
1 7 Q + N 1 0 9 G + A 1 1 6 T + N 2 4 3 V + K 2 5 6 R、

l) BPN' - S 0 2 4 G + S 0 5 3 G + S 0 7 8 N + S 1 0 1 N + G 1 2 8 A + Y 2  
1 7 Q + A 0 8 8 T + N 1 0 9 G + A 1 1 6 T + G 1 3 1 H + N 2 4 3 V、

m) BPN' - S 0 2 4 G + S 0 5 3 G + S 0 7 8 N + S 1 0 1 N + G 1 2 8 A + Y 2  
1 7 Q + A 0 8 8 T + N 1 0 9 G、

30

n) BPN' - S 0 2 4 G + S 0 5 3 G + S 0 7 8 N + S 1 0 1 N + G 1 2 8 A + Y 2  
1 7 Q + N 1 0 9 G + N 2 4 3 V、

o) BPN' - S 0 2 4 G + S 0 5 3 G + S 0 7 8 N + S 1 0 1 N + G 1 2 8 A + Y 2  
1 7 Q + T 1 5 8 S + L 2 5 7 G、

p) BPN' - S 0 2 4 G + S 0 5 3 G + S 0 7 8 N + S 1 0 1 N + G 1 2 8 A + Y 2  
1 7 Q + N 0 6 1 S + N 1 0 9 G + N 2 4 3 V、

q) BPN' - S 0 2 4 G + S 0 5 3 G + S 0 7 8 N + S 1 0 1 N + G 1 2 8 S + Y 2  
1 7 Q + P 0 4 0 A + N 1 0 9 G + N 2 4 3 V + S 2 4 8 N + K 2 5 6 R、

r) BPN' - S 0 2 4 G + S 0 5 3 G + S 0 7 8 N + S 1 0 1 N + G 1 2 8 S + Y 2  
1 7 Q + S 0 0 9 T + S 0 1 8 T + Y 0 2 1 N + N 1 0 9 G + K 1 4 1 R、

40

s) BPN' - S 0 2 4 G + S 0 5 3 G + S 0 7 8 N + S 1 0 1 N + G 1 2 8 A + Y 2  
1 7 Q + A 0 8 8 T + N 1 0 9 G + A 1 1 6 T + T 1 5 8 S + N 2 4 3 V + K 2 5 6 R、

t) BPN' - S 0 2 4 G + S 0 5 3 G + S 0 7 8 N + S 1 0 1 N + G 1 2 8 A + Y 2  
1 7 Q + A 0 8 8 T + N 1 0 9 G + A 1 1 6 T + T 1 5 8 S + N 2 1 8 S + L 2 5 7 G、

u) BPN' - S 0 2 4 G + S 0 5 3 G + S 0 7 8 N + S 1 0 1 N + G 1 2 8 A + Y 2  
1 7 Q + N 1 0 9 G + K 2 5 6 R、

v) BPN' - S 0 2 4 G + S 0 5 3 G + S 0 7 8 N + S 1 0 1 N + G 1 2 8 S + Y 2  
1 7 Q + N 1 0 9 G + N 2 4 3 V + K 2 5 6 R、

w) BPN' - S 0 2 4 G + S 0 5 3 G + S 0 7 8 N + S 1 0 1 N + G 1 2 8 A + Y 2  
1 7 Q + S 0 6 3 G + K 2 5 6 R、

50

x) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128A + Y217Q + S063G + N109G、

y) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128S + Y217Q + S063G、

z) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128A + Y217Q + S063G + N076D、

aa) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128S + Y217Q + S033T + N076D + N218S、

bb) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128A + Y217Q + N076D + N218S、及び

cc) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128A + Y217Q、からなる群から選択されるポリペプチド配列に対して少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、ここで、この変異体の各アミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置に対応させることにより番号付けされる。

#### 【0007】

第四態様では、本発明は、(a)配列番号6のポリペプチド配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、(b)少なくとも厳密度の高い条件下で(i)配列番号5のポリヌクレオチド配列と、又は(ii)(i)の相補的ポリヌクレオチド配列と、ハイブリッド形成するポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、並びに(c)配列番号5のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、からなる群から選択されるプロテアーゼ活性を有する単離されたポリペプチドを提供する。

#### 【0008】

第五態様では、本発明は、親プロテアーゼの単離されたプロテアーゼ変異体を提供し、ここで、(a)この変異体は親プロテアーゼと比較して20以下、15以下又は10以下の変異を有するアミノ酸配列を含み、ここで、(i)これらの変異は、挿入、欠失又は置換から独立して選択され、(ii)これらの変異は、位置24及び53におけるグリシンの置換、位置78及び101におけるアスパラギンの置換、位置128におけるアラニン又はセリンの置換、及び位置217におけるグルタミンの置換を包含し、(b)親プロテアーゼは、配列番号2に対して少なくとも90%の配列同一性を有し、(c)配列番号2のアミノ酸配列は、位置番号付けを決定するために使用され、並びに(d)この変異体は、親プロテアーゼと比較してタンパク質分解活性が増大しており、ここで、各アミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置に対応させることにより番号付けされる。

#### 【0009】

第六態様では、本発明は、親プロテアーゼの単離されたプロテアーゼ変異体を提供し、ここで、(a)この変異体は、(i)配列番号2の配列に対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列であって、(ii)位置24及び53におけるグリシンの置換、位置78及び101におけるアスパラギンの置換、位置128におけるアラニン又はセリンの置換、及び位置217におけるグルタミンの置換を含む、アミノ酸配列を含み、(b)この親プロテアーゼは、配列番号2に対して少なくとも85%の配列同一性を有し、(c)この変異体の各アミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置に対応させることにより番号付けされ、並びに(d)この変異体は、親プロテアーゼと比較してタンパク質分解活性が増大している。

#### 【0010】

別の態様では、本発明は、本発明の少なくとも1つのポリペプチド変異体(例えば、プロテアーゼ変異体)をコードするポリヌクレオチド配列又はその相補的ポリヌクレオチド配列を含む、単離された又は組み換え核酸を提供する。

#### 【0011】

別の態様では、本発明は、配列番号3若しくは配列番号5に記載のポリヌクレオチド又

10

20

30

40

50

はその相補的ポリヌクレオチド配列に対して少なくとも80%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む、単離された又は組み換え核酸を提供する。

【0012】

別の態様では、本発明は、本発明の少なくとも1つの核酸を含む発現ベクターを提供する。本発明の少なくとも1つの核酸又は発現ベクターを含む組み換え宿主細胞又は細胞培養物も提供される。

【0013】

別の態様では、本発明は、本発明の少なくとも1つのポリペプチド（例えば、プロテアーゼ変異体）の製造方法を提供し、この方法は、（a）本発明のポリペプチド（例えば、プロテアーゼ変異体）をコードする本発明の組み換え発現ベクターを細胞集団に導入することと、（b）この発現ベクターによりコードされるポリペプチド（例えば、プロテアーゼ変異体）の生産を促進する条件下で培地内でこの細胞を培養することと、選択的に（c）細胞又は培地から変異体を単離又は回収することと、を含む。

10

【0014】

別の態様では、本発明は、本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体又はポリペプチドを、選択的に別の酵素と組み合わせる含む組成物を提供する。このような組成物は、界面活性剤及び/又はビルダー又は担体などの添加剤成分を含んでもよい。このような組成物は、クリーニング組成物又は洗剤組成物であってもよく、本明細書の他の箇所に記載のクリーニング方法において有用であり得る。このような組成物は布地ケア製品及びホームケア製品であってもよく、又は、このような組成物は、布地ケア製品及びホームケア製品でなくてもよい。

20

【0015】

別の態様では、本発明は、クリーニングする必要がある物品、対象又は表面をクリーニングするための方法を提供し、この方法は、物品、対象又は表面を、本発明のポリペプチド若しくはプロテアーゼ変異体又は本発明の組成物と接触させることと、選択的にこの物品、対象又は表面を水ですすぐことと、を含む。

【0016】

別の態様では、本発明は、物品又は表面（例えば、硬質表面）をクリーニングするための方法を提供し、この方法は、物品又は表面（例えば、硬質表面）を十分な時間にわたって又は所望される程度までクリーニング若しくは洗浄するのに十分な若しくは有効な条件下で本発明のポリペプチド又はプロテアーゼ変異体又は本発明の組成物に、クリーニングすべき物品又は表面（例えば、硬質表面）の少なくとも一部を接触させることを含み、選択的にこの物品又は表面（例えば、硬質表面）を水ですすぐことを含む。

30

【0017】

本発明の他の態様は、下記に記載される。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】 pHPLT-BPN'-v3のプラスミドマップ。

【図2】 pHPLT-BPN'-v3+S78Nのプラスミドマップ。

【図3】 pHPLT-BPN' partial optのプラスミドマップ。

40

【図4】 pHPLT-BPN'-v36のプラスミドマップ。

【図5】 BPN'（配列番号2）及びGG36（配列番号755）を含む成熟参照スブチリシンプロテアーゼのアラインメント。各冷水プロテアーゼ（cold water protease）変異体を含む本明細書に記載の各プロテアーゼ変異体の各アミノ酸位置は、バチルス・アミロリケファシエンス（*Bacillus amyloliquefaciens*）スブチリシンプロテアーゼBPN'アミノ酸配列とプロテアーゼ変異体のアミノ酸配列のアラインメントにより決定される図5に示すようなバチルス・アミロリケファシエンス（*Bacillus amyloliquefaciens*）スブチリシンプロテアーゼBPN'（配列番号2）のアミノ酸配列内の対応するアミノ酸位置の番号付けに従って番号付けされる。したがって、本明細書において特に指定しない限り、置換位置は、BPN'に対する関係で与えられる。

50

【図6】pHPLT - GG36のマップ。

【図7】pRA68のマップ。

【図8】pRA96のマップ。

【発明を実施するための形態】

【0019】

定義

特に指定しない限り、本発明の実施は、当該技術分野内の分子生物学、タンパク質工学、微生物学及び組み換えDNAにおいて通常使用される従来技術を伴う。このような技術は、当業者に既知であり、当業者に周知の数多くのテキスト及び参考文献に記載されている。上記及び下記の両方で本明細書で言及される全ての特許、特許出願、論文及び刊行物は、これによって本明細書に参照により明示的に組み込まれるものとする。

10

【0020】

本明細書で特に規定のない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する分野の当業者に一般的に理解されるのと同じ意味を有する。多くの技術用語辞書が当業者に既知である。本明細書に記載されているものと類似した又は等価な任意の方法及び部材の使用が発明の実施において見出されるが、一部の好適な方法及び部材を本明細書に記載するものとする。したがって、すぐ下に定義される用語は、概して本明細書を参照することにより、より完全に説明される。数的範囲は、範囲を画定する数を含むものとする。特に示さない限り、それぞれ、核酸は左から右に5' - 3'の向きで記述され、アミノ酸は左から右にアミノカルボキシの向きで記述される。本発明は、記載される特定の方法、プロトコル及び試薬に限定されるものではなく、当業者によりこれらが使用される文脈に依存して変更されてもよいことが理解されよう。

20

【0021】

本発明の実施は、特に示さない限り、タンパク質精製、分子生物学、微生物学、組み換えDNA技術及びタンパク質配列決定の従来技術を採用し、これらの全ては、当該技術分野内のものである。

【0022】

更に、本明細書で提供される見出しは、概して本明細書を参照することにより有することができる本発明の様々な態様を限定するものではない。したがって、すぐ下に定義される用語は、概して本明細書を参照することにより、より完全に定義される。しかしながら、本発明の理解を促進するために、多くの用語を以下に定義する。

30

【0023】

本明細書で使用するとき、用語、「プロテアーゼ」及び「プロテイナーゼ」は、他のタンパク質を分解する能力を有する酵素タンパク質を指す。プロテアーゼは、「タンパク質分解」を行う能力を有し、タンパク質を形成するペプチド又はポリペプチド鎖内でアミノ酸と一緒に連結するペプチド結合を加水分解することによりタンパク質異化反応を開始する。タンパク質消化酵素としてのプロテアーゼのこの活性は、「タンパク質活性」と呼ばれる。タンパク質分解活性を測定するための多くの周知の手順が存在する（例えば、Kalisz, 「Microbial Proteinases,」 In: Fiechter (ed.), *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* (1988)を参照されたい)。例えば、タンパク質分解活性は、それぞれのプロテアーゼが市販の基質を加水分解する能力を解析する比較アッセイにより確定され得る。プロテアーゼ又はタンパク質分解活性の解析に有用な代表的な基質としては、ジメチルカゼイン (Sigma C-9801)、ウシのコラーゲン (Sigma C-9879)、ウシのエラスチン (Sigma E-1625) 及びウシのケラチン (ICN Biomedical 902111) が挙げられるが、これらに限定されない。これらの基質を利用する比色分析アッセイが当該技術分野において周知である（例えば、国際公開第99/34011号及び米国特許第6,376,450号、これらはどちらも参照により本明細書に組み込まれる）。pNAアッセイ（例えば、Del Mar et al., *Anal. Biochem.* 99: 316-320 [1979]

40

50

を参照されたい)もまた、勾配溶出時に回収される画分の活性酵素濃度を定量するのに使用され得る。このアッセイは、酵素が可溶性合成基質、スクシニル-アラニン-アラニン-プロリン-フェニルアラニン-p-ニトロアニリド(suc-AAPF-pNA)を加水分解する際にp-ニトロアニリンが放出される速度を判定する。加水分解反応により黄色味が生成される速度は、分光光度計で410nmにて測定され、この速度は活性酵素濃度に比例する。加えて、280ナノメートル(nm)での吸光度測定を使用して、総タンパク質濃度を定量することができる。活性濃度/総タンパク質比は、酵素純度を与える。

#### 【0024】

本明細書で使用するとき、用語、「スブチリシン」は、MEROPS-ペプチダーゼデータベースに記載のS8セリンプロテアーゼファミリーの任意のメンバーを指す(Rawlings et al., MEROPS: the peptidase database, Nucl. Acids Res., 34 Database issue, D270-272 [2006]を参照されたい)。そこに記載のように、ペプチダーゼファミリーS8は、セリンエンドペプチダーゼスブチリシン及びその相同体を含む(Rawlings and Barrett, Biochem. J., 290: 205-218, [1993])。ファミリーS8は、サブチラーゼファミリーとしても知られ、セリンペプチダーゼの二番目に大きなファミリーである。ファミリーS8の第三の構造は、今回判定された。典型的なS8タンパク質構造は三層からなり、七本鎖シートが二層のヘリックスの間に挟まれている。スブチリシン(S08.001)は、クランSB(SB)の類型構造である。異なる構造であるにもかかわらず、スブチリシンの活性部位とキモトリプシン(S01.001)の活性部位は重ね合わせることができ、これは、類似性が分岐進化よりも収斂の結果であることを示唆する。

#### 【0025】

「プロテアーゼ変異体」(又は「変異プロテアーゼ」)は、そのアミノ酸配列において、少なくとも1つのアミノ酸残基が参照プロテアーゼ又は親プロテアーゼのアミノ酸配列とは異なるプロテアーゼを指し得る。親プロテアーゼ又は参照プロテアーゼは、野生型プロテアーゼである必要はなく、しかしながらそれ自身が野生型プロテアーゼの変異体であってもよい。参照又は親プロテアーゼがいずれかの特定のアミノ酸配列に限定されることは意図しない。参照又は親プロテアーゼのプロテアーゼ変異体は、親プロテアーゼ又は参照プロテアーゼのアミノ酸配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでもよく、親プロテアーゼ又は参照プロテアーゼのアミノ酸配列と比較して少なくとも1つのアミノ酸置換、挿入又は欠失を含んでもよい。一態様では、本発明は、セリンプロテアーゼの変異体を含み、ここで、この変異体は、セリンプロテアーゼと比較して少なくとも1つの変異を有する。一態様では、本発明は、配列番号2の成熟BPN'配列と比較して1つ以上の変異を含むアミノ酸配列を含む「BPN'変異体」(又は「BPN'スブチリシン変異体」)を含む。

#### 【0026】

親プロテアーゼ又は参照プロテアーゼは、例えば、既知のプロテアーゼ(例えば、BPN'が挙げられるがこれに限定されない)又は市販のプロテアーゼ又は市販のプロテアーゼの変異体であり得るが、これに限定されない。親プロテアーゼ又は参照プロテアーゼは、それ自身が既知又は市販のプロテアーゼの変異体であってもよい。プロテアーゼ変異体は、市販されている親プロテアーゼから、又は、このような市販の親プロテアーゼの変異体から、誘導することができる。市販のプロテアーゼとしては、例えば、商品名SAVINASE(登録商標)、POLARZYME(登録商標)、KANNASE(登録商標)、LIQUANASE(登録商標)、LIQUANASE ULTRA(登録商標)、SAVINASE ULTRA(登録商標)、OVOZYME(登録商標)(NovoZymes A/Sによる)、MAXACAL(登録商標)、PROPERASE(登録商標)、PURAFECT(登録商標)、FN3(登録商標)、FN4(登録商標)及びPURAFECT OXP(登録商標)、PURAFAST(商標)、PURAFECT(登

10

20

30

40

50



録商標) PRIME、PURAMAX (登録商標) (Danisco US Inc. (元 Genencor International, Inc.) による) で販売されているプロテアーゼ、並びに Henkel / Kemira から入手可能なもの、すなわち BLAP (以下の変異 S99D+S101R+S103A+V104I+G159S, を有する米国特許第 5,352,604 号の表 29 に示されているアミノ酸配列、以降では BLAP と呼ぶ) 及び BLAP X (S3T+V4I+V205I を有する BLAP) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0027】

本明細書で使用するとき、「冷水プロテアーゼ」は、以下の四つの基準のうちの 1 つ以上を呈する酵素である：(a) 本明細書のパート I 実施例 1 に記載の「試験方法」に定義したように PURAFECT (登録商標) Prime (アミノ酸置換 Y217L を有する配列番号 2) と比較したときに pH 8 及び 16 (60 °F) における BMI で、性能指数が少なくとも 1.1、少なくとも 1.2、少なくとも 1.3、少なくとも 1.4、少なくとも 1.5、少なくとも 1.6、少なくとも 1.7、少なくとも 1.8、少なくとも 1.9、少なくとも 2.1、1.1 ~ 約 10、1.1 ~ 約 8、又は更には 1.1 ~ 約 5、(b) 本明細書のパート I 実施例 1 に記載の「試験方法」に定義したように BPN' (配列番号 2) と比較したときに pH 8 及び 16 (60 °F) における BMI で、性能指数が少なくとも 1.3、少なくとも 1.4、少なくとも 1.5、少なくとも 1.6、少なくとも 1.7、少なくとも 1.8、少なくとも 1.9、少なくとも 2.1、1.3 ~ 約 8、又は更には 1.3 ~ 約 5、(c) 本明細書のパート I 実施例 1 に記載の「試験方法」に定義したように BPN' - v3 (配列番号 4) と比較したときに pH 8 及び 16 (60 °F) における BMI で、性能指数が少なくとも 0.9、少なくとも 1.0、少なくとも 1.1、少なくとも 1.2、少なくとも 1.3、少なくとも 1.4、少なくとも 1.5、少なくとも 1.6、少なくとも 1.7、少なくとも 1.8、少なくとも 1.9、少なくとも 2.0、0.9 ~ 約 10、0.9 ~ 約 8、又は更には 0.9 ~ 約 5、並びに / あるいは (d) 本明細書のパート I 実施例 1 に記載の「試験方法」に定義したように BPN' - v36 (配列番号 6) と比較したときに pH 8 及び 16 (60 °F) における BMI で、性能指数が少なくとも 0.9、少なくとも 1.0、少なくとも 1.1、少なくとも 1.2、少なくとも 1.3、少なくとも 1.4、少なくとも 1.5、少なくとも 1.6、少なくとも 1.7、少なくとも 1.8、少なくとも 1.9、少なくとも 2.0、0.9 ~ 約 10、0.9 ~ 約 8、0.9 ~ 約 5、1.0 ~ 約 10、1.0 ~ 約 8、又は更には 1.0 ~ 約 5。

【0028】

一部の好適な冷水プロテアーゼはスブチリシンから誘導され、特にスブチリシン BPN' (配列番号 2) から誘導される。冷水プロテアーゼは、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する BPN' の変異体であり得る (例えば、「BPN' 変異体」又は「BPN' スブチリシン変異体」)。一部のこのような冷水プロテアーゼは、本明細書に記載のアミノ酸置換を 1 つ以上含む。

【0029】

本明細書で使用するとき、バチルス属は、当業者に既知であるように、バチルス属内の全ての種を含み、例えば、枯草菌 (*B. subtilis*)、バチルス・リケニホルミス (*B. licheniformis*)、バチルス・レントス (*B. lentus*)、バチルス・ブレビス (*B. brevis*)、バチルス・ステアロサーモフィラス (*B. stearothermophilus*)、バチルス・アルカロフィラス (*B. alkalophilus*)、バチルス・アミロリケファシエンス (*B. amyloliquefaciens*)、バチルス・クラウジイ (*B. clausii*)、バチルス・ハロデュランス (*B. halodurans*)、バチルス・メガテリウム (*B. megaterium*)、バチルス・コアグランス (*B. coagulans*)、バチルス・サーキュランス (*B. circulans*)、バチルス・ロータス (*B. lautus*) 及びバチルス・チューリンゲンシス (*B. thuringiensis*) が挙げられるが、これらに限定されない。バチルス属が引き続き分類再編中であることが認識される。したがって、この属が、例えば、現在では「ゲオバチルス・ステアロサーモフィラス (*Geobacillus stearothermophilus*)」という名称であるバチルス・ステアロサーモフィラス (*B. stearothermop*

hilus)などの生物が挙げられるがこれに限定されない、再分類された種を含むことが意図される。酸素の存在下での耐性内生孢子形成は、バチルス属を定義する特徴と考えられるが、この特徴は、近年名付けられたアリシクロバチルス (*Alicyclobacillus*)、アンフィバチルス (*Amphibacillus*)、アネウリニバチルス (*Aneurinibacillus*)、アノキシバチルス (*Anoxybacillus*)、ブレビバチルス (*Brevibacillus*)、フィロバチルス (*Filobacillus*)、グラシリバチルス (*Gracilibacillus*)、ハロバチルス (*Halobacillus*)、パエニバチルス (*Paenibacillus*)、サリバチルス (*Salibacillus*)、サーモバチルス (*Thermobacillus*)、ウレイバチルス (*Ureibacillus*)及びバージバチルス (*Virgibacillus*)にも当てはまる。

#### 【0030】

用語、「ポリヌクレオチド」及び「核酸」は、本明細書において互換的に使用され、鎖中で任意の長さのヌクレオチドモノマーが共有結合しているポリマーを指す。DNA (デオキシリボ核酸)、デオキシリボヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、RNA (リボ核酸)、リボ核酸のポリマーは、互いに異なる生物学的機能を有するポリヌクレオチド又は核酸の例である。ポリヌクレオチド又は核酸としては、一本鎖、二本鎖若しくは三本鎖DNA、ゲノムDNA、cDNA、RNA、DNA-RNAハイブリッド、あるいは、プリン塩基及びピリミジン塩基を含むポリマー、天然ヌクレオチド塩基、化学的に修飾されたヌクレオチド塩基、生化学的に修飾されたヌクレオチド塩基、非天然のヌクレオチド塩基、又は誘導されたヌクレオチド塩基が挙げられるが、これらに限定されない。以下は、ポリヌクレオチドの非限定例である：遺伝子、遺伝子断片、染色体断片、発現配列標識 (EST)、エキソン、イントロン、メッセンジャーRNA (mRNA)、運搬RNA (tRNA)、リボソームRNA (rRNA)、リボザイム、相補的DNA (cDNA)、組み換えポリヌクレオチド、分枝状ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブ及びプライマー。一部のポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチド及びヌクレオチド類似体などの修飾されたヌクレオチド、ウラシル、他の糖、並びに、フルオロリボース及びチオアートなどの連結基、並びにヌクレオチド分枝を含む。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分により割り込まれてもよい。

#### 【0031】

本明細書で使用するとき、用語、「ベクター」は、核酸又はポリヌクレオチドを標的細胞又は組織の中に導入又は運搬するために使用される核酸コンストラクト又はポリヌクレオチドコンストラクトを指す。ベクターは、典型的には、外来DNAを別の細胞又は組織の中に導入するために使用される。ベクターは、一般に、導入遺伝子であるDNA配列と、ベクターの「骨格鎖」として働くより大きなポリヌクレオチド配列と、を含む。このベクターは、典型的には、挿入された導入遺伝子などの遺伝子情報を標的細胞又は組織に運搬するよう働き、それにより、標的細胞又は組織において挿入遺伝子を単離、複製又は発現する。ベクターとしては、プラスミド、クローニングベクター、バクテリオファージ、ウイルス (例えば、ウイルスベクター)、コスミド、発現ベクター、シャトルベクター、カセット及びこれらに類するものが挙げられる。ベクターは、典型的には、複製起点、マルチクローニングサイト及び選択マーカを含む。ベクターを標的細胞の中に挿入するプロセスは、典型的には、細菌及び酵母菌における形質転換として、並びに、哺乳類細胞におけるトランスフェクションとして、示される。本発明は、好適な宿主においてDNA配列が発現されるよう機能し得る好適なプロ配列 (例えば、分泌配列、シグナルペプチド配列など) に作用可能に連結されているプロテアーゼ変異体 (例えば、前駆体又は成熟プロテアーゼ変異体) をコードするDNA配列を含むベクターを含む。

#### 【0032】

本明細書で使用するとき、用語、「発現カセット」又は「発現ベクター」は、標的細胞において所望の核酸 (例えば、外来核酸又は導入遺伝子) を発現させるために組み換えにより又は合成により調製された核酸コンストラクト又はベクターを指す。この所望の核酸は、典型的には、所望のタンパク質を発現する。発現ベクター又は発現カセットは、典型

10

20

30

40

50

的には、外来核酸の発現を駆動する又は促進するプロモーターヌクレオチド配列を含む。この発現ベクター又はカセットはまた、典型的には、標的細胞において特定の核酸の転写を可能にする任意の他の特定の核酸要素を含む。組み換え発現カセットは、プラスミド、染色体、ミトコンドリアDNA、色素体DNA、ウイルス、又は核酸断片の中に組み込むことができる。一部の発現ベクターは、宿主細胞において非相同なDNA断片を組み込み発現させる能力を有する。多くの原核細胞及び真核細胞発現ベクターは、市販されている。適切な発現ベクターの選択は、当業者であれば既知である。発現ベクターの中に組み込まれた核酸配列からタンパク質を発現させるための適切な発現ベクターの選択は、当業者であれば既知である。

#### 【0033】

DNAコンストラクトは、標的細胞又は組織の中に導入され得る核酸の人工的に構築された断片である。DNAコンストラクトは、典型的には、ベクターの中にサブクローニングされた所望のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むDNA挿入断片を含む。このベクターは、細菌を増殖させるための細菌耐性遺伝子、並びに、生物で所望のタンパク質を発現させるためのプロモーターを含有してもよい。このDNAは、PCR又は当業者に既知の任意の他の技術によりインビトロで生産され得る。このDNAコンストラクトは、所望の核酸配列を含み得る。一態様では、この配列は、選択的に、対照配列（例えば、プロモーターなど）などの追加の配列に作用可能に連結される。このDNAコンストラクトは、好適な選択マーカーを更に含んでもよく、ホモロジーボックスに隣接した組み込み配列（incoming sequence）を更に含んでもよい。このコンストラクトは、末端部に加えられる他の非相同配列を含んでもよい（例えば、スタッファー配列又は隣接配列）。配列の末端部は、DNAコンストラクトが閉環構造を形成するように閉じられてもよい。当該技術分野において周知の技術を用いてDNAコンストラクトの中に組み込まれる、この所望の核酸配列は、野生型、変異又は修飾された核酸であり得る。このDNAコンストラクトは、宿主細胞染色体と相同な核酸配列を1つ以上含んでもよい。このDNAコンストラクトは、1つ以上の非相同ヌクレオチド配列を含んでもよい。このDNAコンストラクトは、一度インビトロで組み立てられると、例えば、1) 宿主細胞の所望の標的配列の中に非相同的な配列を挿入するために、及び/又は2) 宿主細胞染色体の一領域に変異を誘導する（すなわち、内在性配列を非相同性配列で置換する）ために、3) 標的遺伝子を欠失させるために、4) 複製プラスミドを宿主の中に導入するために、使用され得る。「DNAコンストラクト」は、本明細書では「発現カセット」と互換的に使用される。

#### 【0034】

本明細書で使用するとき、「プラスミド」は、染色体DNAとは独立して複製可能である染色体外のDNA分子を指す。プラスミドは、二本鎖(ds)であり、環状であってもよく、典型的にはクローニングベクターとして使用される。

#### 【0035】

本明細書において、細胞の中に核酸配列を導入する文脈で使用するとき、用語、「導入された」は、細胞の中に核酸配列を運搬するのに好適な任意の方法を指す。このような導入のための方法としては、原形質融合、トランスフェクション、形質転換、エレクトロポレーション、接合及び形質導入が挙げられるが、これらに限定されない（例えば、Ferrari et al., 「Genetics」, in Hardwood et al. (eds.), Bacillus, Plenum Publishing Corp., pp. 57~72 [1989]を参照されたい）。

#### 【0036】

形質転換は、細胞の遺伝的な変更を指し、遺伝子材料（例えば、DNA）の取り込み、遺伝子組み込み及び発現により生じる。

#### 【0037】

本明細書で使用するとき、核酸は、別の核酸配列と機能的に関連を持つよう配置された場合に、別の核酸配列と「作用可能に連結」される。例えば、プロモーター又はエンハンサーは、このプロモーターがヌクレオチドコーディング配列の転写に影響する場合、ヌク

10

20

30

40

50

レオチドコーディング配列に作用可能に連結される。リボソーム結合部位は、コーディング配列の翻訳を促進するように配置された場合に、コーディング配列に作用可能に連結され得る。典型的には、「作用可能に連結されている」DNA配列は、隣接している。しかしながら、エンハンサーは隣接している必要はない。連結は、都合のよい制限部位で連結することにより達成される。このような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプター又はリンカーを従来の実践方法に従って使用してもよい。

**【0038】**

本明細書で使用する時、細胞を参照して使用する場合の「組み換え」は、典型的には、その細胞が非相同な核酸配列の導入により改変されていること、あるいは、その細胞がそのように改変された細胞から誘導されていることを指す。例えば、組み換え細胞は、ネイティブ（非組み換え）な形態の細胞内では同一形態で見られない遺伝子を含み得、あるいは、組み換え細胞は、ネイティブな形態の細胞で見られるものの改変されて細胞の中に再導入されたネイティブな遺伝子を含み得る。組み換え細胞は、細胞から核酸を除去することなく改変された、細胞にとって内在性の核酸を含んでもよく、このような改変としては、遺伝子置換、部位特異的変異、及び当業者に既知の関連技術により得られるものが挙げられる。組み換えDNA（rDNA）は、遺伝子スプライシングのプロセスにより、通常同時に生じ得ない2つ以上のヌクレオチド配列を組み合わせるにより作られる、人工DNAの一形態である。組み換えDNA技術としては、インビトロでの組み換えDNAの製造及び細胞の中への組み換えDNAの運搬についての技術が挙げられ、組み換えDNAは細胞中で発現又は増殖させることができ、これにより組み換えポリペプチドが製造される。

10

20

**【0039】**

本明細書で使用する時、用語、核酸又は遺伝子の「増幅」は、特異的なDNA配列が偏って複製されるプロセスを指し、その結果、増幅された核酸又は遺伝子は、遺伝子中に元々存在していたものよりも多い複製数で存在するようになる。薬剤（例えば、抑制され得る酵素に関する阻害物質）の存在下で増殖させることによる細胞の選別は、薬剤の存在下での増殖に必要とされる遺伝子産物をコードする内在性遺伝子の増幅、あるいは、この核酸又は遺伝子産物又はその両方をコードする外来性（すなわち、投与された）配列の増幅のいずれかにより得られ得る。

**【0040】**

本明細書で使用する時、用語、「プライマー」は、制限酵素による消化物の精製物（a purified restriction digest）として自然に生じるか又は合成により調製されるかのいずれかのオリゴヌクレオチドを指し、これは、核酸鎖に対して相補的であるプライマー伸長産物の合成が誘導される条件下（すなわち、ヌクレオチド及び、DNAポリメラーゼなどの誘導剤の存在下、並びに好適な温度及びpH下）に置かれると合成の開始点として機能し得る。プライマーは増幅における最大効率のために一本鎖であることが好ましいが、代わりに二本鎖であってもよい。二本鎖の場合、プライマーは、伸長産物を調製するために使用される前に、その鎖を単離するように最初に処理される。このプライマーは、オリゴデオキシリボヌクレオチドを含み得る。このプライマーは、導入剤の存在下において、伸長産物の合成を開始するのに十分に長くなくてはならない。プライマーの正確な長さは、温度、プライマーの供給源、及びどの方法をどのように使用するかなどの様々な要因に依存する。

30

40

**【0041】**

本明細書で使用する時、用語、「プローブ」は、制限酵素による消化物の精製物として自然に生じるか又は合成により、組み換えにより若しくはPCR増幅により製造されるかのいずれかのオリゴヌクレオチドを指し、これは、典型的には、別の所望のオリゴヌクレオチドに対してハイブリッド形成することができる。プローブは、一本鎖又は二本鎖であり得る。プローブは、特定の遺伝子配列の検出、同定及び単離に有用である。本発明で使用される任意のプローブは、任意の「リポーター分子」で標識されることが想到され、その結果、酵素（例えば、ELISA並びに酵素に基づく組織化学的アッセイ）、蛍光、

50

放射活性及び発光システムが挙げられるがこれらに限定されない任意の検出システムで検出可能である。本発明が任意の特定の検出システム又は標識に限定されることは、意図されていない。

【0042】

本明細書で使用するとき、用語、「ポリメラーゼ連鎖反応」(PCR)は、米国特許第4,683,195号、同第4,683,202号及び同第4,965,188号(参照により本明細書に組み込まれる)の方法を指し、これらは、クローニング又は精製を行わずに遺伝子DNAの混合物中で標的配列の断片濃度を増加させる方法を含む。標的配列を増幅するためのこのプロセスは、当該技術分野において周知である。

【0043】

本明細書で使用するとき、用語、「増幅試薬」は、プライマー、核酸テンプレート及び増幅酵素を除いて、増幅に必要とされる試薬(例えば、デオキシリボヌクレオチド三リン酸、緩衝剤など)を指す。典型的には、増幅試薬は、他の反応成分と共に、反応槽(試験管、マイクロウェルなど)内に配置及び収容する。

【0044】

本明細書で使用するとき、用語、「制限エンドヌクレアーゼ」又は「制限酵素」は、制限部位として既知のヌクレオチドの特異的部位にて又はその近傍にて二本鎖又は一本鎖DNAを切断できる酵素(例えば、細菌由来の酵素)を指す。この制限部位を含むヌクレオチド配列は、所与の制限エンドヌクレアーゼ又は制限酵素により認識及び切断され、多くの場合、DNA断片を挿入される部位になる。制限部位は、発現ベクター又はDNAコンストラクトの中に設計することができる。

【0045】

当該技術分野において、DNA配列をRNAポリメラーゼにより転写することでRNA配列を製造することができる一方、RNA配列を逆転写酵素により逆転写することでDNA配列を製造することができる。

【0046】

「宿主株」又は「宿主細胞」は、所望のDNA配列を含む発現ベクターのために好適な宿主を指す。所望のDNA配列は、宿主株又は宿主細胞において所望のタンパク質を発現し得る。

【0047】

「タンパク質」又は「ポリペプチド」又は「ペプチド」は、アミノ酸残基の高分子配列である。1つのアミノ酸のカルボキシル基は、別のアミノ酸のアミノ基に連結される。用語、「タンパク質」及び「ポリペプチド」及び「ペプチド」は、本明細書では互換的に使用され得る。ペプチドは、2つ以上のアミノ酸を含む。ペプチドは、典型的には、ポリペプチド又はタンパク質が含有するアミノ酸よりも少ないアミノ酸を含有する。IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature(JCBN)に従って定義されるアミノ酸についての一文字コード及び三文字コードは、本開示全体にわたって使用される。一文字のXは、20種のアミノ酸のうちのいずれかを指す。ポリペプチドは、遺伝子コードの縮重に起因して、1を超えるヌクレオチド配列によりコードされ得る。

【0048】

酵素変異体を説明する際、参照を容易にするために典型的には以下の命名法を使用する：元のアミノ酸(1つ又は複数)：位置(1つ又は複数)：置換されたアミノ酸(1つ又は複数)。公認のIUPAC一文字又は三文字アミノ酸略記を採用する。一文字「X」は、任意のアミノ酸残基を指す。しかしながら、アミノ酸置換の文脈の場合(例えば、「X003C」)、「X」は、置換から生じるアミノ酸残基以外のアミノ酸残基を指す(例えば、Xは、C以外のアミノ酸残基である)。変異は、典型的には、親アミノ酸についての一文字コード、続いて、アミノ酸配列における3又は2又は1桁のアミノ酸位置番号、次に、置換アミノ酸についての一文字コードにより名付けられる。例えば、グリシン(G)をアミノ酸セリン(S)に置換することによりアミノ酸位置87においてアミノ酸グリシ

10

20

30

40

50

ン(G)を変異させることは、「G087S」又は「G87S」と表される。典型的には、トレオニンによる位置2におけるグリシンの置換はG002Tと表されるが、このような置換はG02T又はG2Tとも表され得る。1又は2個のゼロ(「0」)は、単に各アミノ酸位置に対して便宜上三つの数での表記を提供するために含まれ得る。アミノ酸位置「001」は「1」と同じであり、したがって、「A001C」は「A1C」と同じである。「X001G」はアミノ酸配列中のアミノ酸位置1におけるグリシン(G)による置換を表し、ここで、グリシンにより置換されることになるアミノ酸は任意のアミノ酸である。複数の変異は、変異間に「-」を挿入することにより、あるいは、変異間にプラス(+)記号を用いることにより、示される。例えば、アミノ酸配列中のアミノ酸残基位置87及び90におけるアミノ酸置換は、「G087S-A090Y」若しくは「G87S-A90Y」又は「G87S+A90Y」若しくは「G087S+A090Y」のいずれかで表される。欠失については、一文字コード「Z」を使用する。親配列に対する挿入については、一文字コード「Z」は位置番号の左側にある。欠失については、一文字コード「Z」は位置番号の右側にある。挿入については、位置番号は、挿入されるアミノ酸の前の位置番号であり、各アミノ酸に対して0.01を加える。例えば、位置87と88の間に三つのアミノ酸、アラニン(A)、セリン(S)及びチロシン(Y)を挿入することは、「Z087.01A-Z087.02S-Z087.03Y」と表される。したがって、上記全ての変異に位置100における欠失を加えると、「G087S-Z087.01A-Z087.02S-Z087.03Y-A090Y-A100Z」となる。

#### 【0049】

「プロ配列」又は「プロペプチド配列」は、プロテアーゼの分泌に必要とされる、シグナルペプチド配列と成熟型プロテアーゼ配列の間のアミノ酸配列を指す。プロ配列又はプロペプチド配列が切断されると、成熟型の活性プロテアーゼが生じる。

#### 【0050】

用語、「シグナル配列」又は「シグナルペプチド」は、成熟型若しくは前駆体形態のタンパク質の分泌又は直接輸送に関与し得るアミノ酸残基の配列を指す。

#### 【0051】

シグナル配列は、典型的には、前駆体又は成熟タンパク質の配列に対してN末端に位置する。このシグナル配列は、リーダー配列とも示され得る。このシグナル配列は、内源性又は外来性であり得る。一つの代表的な外来性シグナル配列は、枯草菌(*Bacillus subtilis*)スブチリシンのシグナル配列の最初の七個のアミノ酸残基を、バチルス・レントス(*Bacillus lentus*)のシグナル配列(ATCC 21536)の最初の七個以外の部分に融合したものを含む。シグナル配列は、通常、成熟タンパク質には存在しない。シグナル配列は、典型的には、タンパク質の輸送後にシグナルペプチダーゼによりタンパク質から切断される。

#### 【0052】

用語、「ハイブリッドシグナル配列」は、配列の一部が、発現されることになる遺伝子のシグナル配列に融合した発現宿主から得られる、配列を指す。合成配列を利用することができる。

#### 【0053】

用語、タンパク質、ポリペプチド又はペプチドの「成熟型」形態は、シグナルペプチド配列及びプロペプチド配列を持たないタンパク質、ポリペプチド又はペプチドの機能的形態を指す。

#### 【0054】

用語、タンパク質又はペプチドの「前駆体」形態は、タンパク質のアミノ又はカルボニル末端に作用可能に連結したプロ配列を有する成熟型タンパク質を指す。この前駆体はまた、プロ配列のアミノ末端に作用可能に連結した「シグナル」配列を有し得る。この前駆体はまた、翻訳後の活性に関与する追加のポリヌクレオチドを有し得る(例えば、成熟型タンパク質、ポリペプチド又はペプチドを残してそこから切断されるポリヌクレオチド)

.

10

20

30

40

50

## 【0055】

アミノ酸配列又は核酸配列に関する用語、「野生型」は、そのアミノ酸配列又は核酸配列がネイティブの又は自然発生の配列であることを示す。本明細書で使用する時、用語、「自然発生」は、自然に見られる（例えば、組み換え法又は化学的方法により操作されていない）任意のもの（例えば、タンパク質、アミノ酸又は核酸配列）を指す。本明細書で使用する時、用語、「非自然発生」は、自然には見られない任意のものを指す（例えば、実験室で作製された、組み換え又は化学合成された核酸）。

## 【0056】

特定のアミノ酸配列中のアミノ酸残基は、参照アミノ酸配列の位置におけるアミノ酸残基と対応させることにより番号付けされ得る。参照アミノ酸配列のアミノ酸残基の位置「と対応する」又は「と対応している」又は「と対応した」位置にある所望のアミノ酸配列のアミノ酸残基は、所望の配列のアミノ酸残基が、参照アミノ酸配列中のアミノ酸残基の位置と等しい又は相同である位置に配置されていることを示す。当業者は、ポリペプチド中の特定の残基位置が相同な参照配列の位置に対応するかどうかを判定することができる。例えば、プロテアーゼ変異体は、既知の技術を用いて参照配列のもの（例えば、配列番号2のBPN'配列）とアラインメントされ得る。参照配列中のアミノ酸残基の位置は、所望の配列中のアミノ酸残基の番号付けに使用される。したがって、プロテアーゼ変異体のアミノ酸残基は、参照配列の対応するアミノ酸残基位置の番号付けに従って番号付けされ得る。例えば、配列番号2の参照配列中のアミノ酸残基は、所望のプロテアーゼ変異体の各アミノ酸残基のアミノ酸残基位置番号付けを決定するために使用され得る。

## 【0057】

本明細書で使用する時、「相同性」は、配列類似性又は同一性を指し、同一性が好ましい。相同性は、当該技術分野において既知の標準技術を用いて判定され得る（例えば、Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 [1981]、Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 [1970]; Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 [1988]、Wisconsin Genetics Software PackageにおけるGAP、BESTFIT、FASTA及びTFASTAなどのソフトウェアプログラム（Genetics Computer Group (Madison, WI)）、並びにDevereux et al., Nucl. Acid Res. 12: 387~395 [1984]を参照されたい）。有用なアルゴリズムの一例は、PILEUPである。PILEUPは、ペアワイズアラインメントのプロGRESS法を用いて、一群の関連する配列から複数の配列のアラインメントを行う。PILEUPは、アラインメントを行うのに使用されるクラスタリング関係を示す系統樹をプロットすることもできる。PILEUPは、Feng及びDoolittleのPROGRESSアラインメントを単純化させて用いる（Feng and Doolittle, J. Mol. Evol. 35: 351~360 [1987]を参照されたい）。この方法は、Higgins及びSharpにより説明されるものと同様である（Higgins and Sharp, CABIOS 5: 151~153 [1989]を参照されたい）。有用なPILEUPパラメーターとしては、3.00のデフォルトギャップ重みづけ（default gap weight）、0.10のデフォルトギャップ伸長重みづけ（default gap length weight）及び重みつき末端ギャップ（weighted end gaps）が挙げられる。有用なアルゴリズムの別の例は、Altschul et al.により説明されているBLASTアルゴリズムである（Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403~410 [1990]; 及びKarlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873~5787 [1993]を参照されたい）。特に有用なBLASTプログラムはWU-BLAST-2プログラムである（Altschul et al., Meth. Enzymol. 266: 460~480 [1996]を参照されたい）。WU-BLAST-2は、複数の検索パラメーターを使用し、これらのうちのほとんどはデフォルト値に設定される。調

10

20

30

40

50

製可能なパラメーターは以下の値に設定される：`overlap span = 1`、`overlap fraction = 0.125`、`word threshold (T) = 11`。`HSP S`及び`HSP S2`パラメーターは動的な値であり、特定の配列の構成及び、所望の配列を検索する特定のデータベースの構成に依存してプログラム自体により確立される。しかしながら、これらの値は、感度を上昇させるように調整することができる。

【0058】

対象ポリペプチド配列と参照ポリペプチド配列の間の配列同一性パーセント（配列同一性%又は単に同一性%）は、対象アミノ酸配列が、例えば、アミノ酸配列比較アルゴリズム又は目視点検により、これらの配列が最適にアラインメントされたときの比較長さにわたる参照ポリペプチド配列に対する特定の百分率の分だけ、アミノ酸残基同士の比較に基づいて同一であることを意味する。対象核酸配列と参照核酸配列の間の配列同一性パーセントは同様に、対象ヌクレオチド配列が、これらの配列が最適にアラインメントされたときの比較長さにわたる参照ヌクレオチドに対する特定の百分率の分だけ、核酸残基同士の比較に基づいて同一であることを意味する。

【0059】

参照配列と所望の対象配列の間の配列同一性パーセント（同一性パーセント又は配列同一性%又は同一性%）は、当業者により容易に判定され得る。2つのポリペプチド配列が共有する同一性パーセントは、例えば、類似性が最大限になるようそれぞれの配列の残基のアラインメントを行い、当該技術分野において既知の配列比較アルゴリズムを用いることにより又は目視点検により配列間の同一のアミノ酸残基の数を判定することにより、各配列中のアミノ酸残基を直接比較することによって、判定することができる。2つの最適にアラインメントされたポリペプチド配列は比較長さにわたって比較することができ、両方のポリペプチド鎖中に同一のアミノ酸残基が生じる最適アラインメントの位置の数を判定することができ、これにより、一致した位置の数を提供することができ、次に、一致した位置の数は比較長さにわたって含まれる位置の合計数で除算される。得られた数に100を乗じて、参照（又はクエリー）ポリペプチド配列に対する対象ポリペプチド配列の同一性パーセントを得る。2つの核酸配列が共有する同一性パーセントは、最大限の類似性に対してそれぞれの配列の残基のアラインメントを行い、配列比較アルゴリズムを用いることにより又は目視点検により核酸配列間の同一の核酸残基の数を判定することにより、核酸配列中のヌクレオチド残基を直接比較することによって、判定することができる。2つ以上の配列間の同一性パーセントはまた、これらの配列が特定の同一性パーセントであるというように記載されてもよい。

【0060】

配列同一性を判定するのに好適であるアルゴリズムの例は、BLASTアルゴリズムである（Altschul, et al., J. Mol. Biol., 215: 403~410 [1990]を参照されたい）。BLAST分析を行うためのソフトウェアは、米国国立生物工学情報センター（National Center for Biotechnology Information）を通じて公に入手可能である。このアルゴリズムは、まず、データベース配列中の同じ長さのワードとアラインメントを行ったときに一致するか又はある程度ポジティブであると評価された（positive-valued）閾値スコアTを満たすかのいずれかである問い合わせ配列中の長さWの短いワードを同定することにより、高スコアの配列ペア（HSP）を同定する。これらの最初にヒットした隣接ワードは、これらを含むより長いHSPを見つけるための開始点として働く。ワードのヒットは、累積アラインメントスコアが増加し得る限り比較されている2つの配列の各々に沿って両方向に拡張される。ワードのヒットの拡張は、次の場合に止まる：累積アラインメントスコアが最大達成値から量Xだけ減少する、累積スコアがゼロ以下になる、又は、いずれかの配列の末端に到達する。BLASTアルゴリズムパラメーターW、T及びXは、感度及びアラインメントの速度を決定する。BLASTプログラムは、デフォルトとして、11のワード長さ（W）、50のBLOSUM62スコアリングマトリックス（Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 [1992]を参照されたい

10

20

30

40

50



) アラインメント ( B )、10 の期待値 ( expectation ) ( E )、M ' 5、N ' - 4 及び両方の鎖の比較を用いる。

【 0 0 6 1 】

次に、BLAST アルゴリズムは、2つの配列間の類似性の統計分析を行う (例えば、上記 Karlin and Altschul を参照されたい)。BLAST アルゴリズムにより提供される類似性の一つの尺度は、最小和確率 ( smallest sum probability ) ( P ( N ) ) であり、これは、2つのヌクレオチド又はアミノ酸配列間の一致が偶然により生じ得る確率の指標を提供する。例えば、プロテアーゼをコードする核酸に対する試験核酸の比較において最小和確率が約 0 . 1 未満、より好ましくは約 0 . 0 1 未満、最も好ましくは約 0 . 0 0 1 未満である場合、核酸は、本発明のプロテアーゼをコードする核酸と同様であると考えられる。試験核酸がプロテアーゼポリペプチドをコードする状況では、比較が約 0 . 5 未満、より好ましくは約 0 . 2 未満の最小和確率をもたらす場合、試験核酸は特定のプロテアーゼをコードする核酸と同様であると考えられる。

10

【 0 0 6 2 】

「最適アラインメント」又は「最適アラインメントを行った」は、最高の同一性パーセントスコアを与える2つ (以上) の配列のアラインメントを指す。例えば、2つのポリペプチド配列の最適アラインメントは、各配列中の同一のアミノ酸残基の最大数が共にアラインメントされているように手動で配列のアラインメントを行うことにより、あるいは、本明細書に記載の又は当該技術分野において既知の、ソフトウェアプログラム又は手順を用いることにより、達成することができる。2つの核酸配列の最適アラインメントは、各配列中の同一のヌクレオチド残基の最大数が共にアラインメントされているように手動で配列のアラインメントを行うことにより、あるいは、本明細書に記載の又は当該技術分野において既知の、ソフトウェアプログラム又は手順を用いることにより、達成することができる。

20

【 0 0 6 3 】

2つの配列 (例えば、ポリペプチド配列) が、規定のアミノ酸置換マトリックス、ギャップ存在ペナルティ (ギャップオープンペナルティとも呼ばれる) 及びギャップ伸張ペナルティなどの規定パラメーターを用い、このペアの配列について最高の同一性スコアが得られるようアラインメントされた場合、「最適アラインメントが行われた」とみなされ得る。BLOSUM62 スコアリングマトリックス (上記 Henikoff and Henikoff を参照されたい) は、多くの場合、ポリペプチド配列アラインメントアルゴリズム (例えば、BLASTP) においてデフォルトのスコアリング置換マトリックスとして使用される。ギャップ存在ペナルティはアラインメントされた配列の1つにアミノ酸ギャップが1つ導入された際に課せられ、ギャップ伸張ペナルティはギャップ中の各残基位置に対して課される。用いられる代表的なアラインメントは以下のものである: BLOSUM62 スコアリングマトリックス、ギャップ存在ペナルティ = 11、及びギャップ伸張ペナルティ = 1。アラインメントスコアは、アラインメントが開始及び終了する各配列のアミノ酸位置により (例えば、アラインメントウィンドウ)、並びに、場合によっては可能な限り最高の類似性スコアを達成するように一方若しくは両方の配列の中に1つ若しくは複数のギャップを挿入することにより、決定される。

30

40

【 0 0 6 4 】

2つ以上の配列間の最適アラインメントは、目視点検により手動で、あるいは、コンピュータ (例えば、アミノ酸配列に対する BLASTP プログラム及び核酸に対する BLASTN プログラム (例えば、Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25 (17): 3389 ~ 3402 (1997) を参照されたい。米国国立生物工学情報センター (NCBI) のウェブサイトも参照されたい。) 又は CLUSTALW プログラムが挙げられるがこれらに限定されない) を使用することにより、判定することができる。

【 0 0 6 5 】

所望のポリペプチドが参照ポリペプチドのアミノ酸配列に対して少なくとも約 60%、

50

70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は99.5%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む場合、所望のポリペプチドは参照ポリペプチドに対して「実質的に同一」と言われてもよい。2つのこのようなポリペプチドの間の同一性パーセントは、最適アラインメントを行われた2つのポリペプチド配列の検査により手動で、又は、標準的なパラメーターを用いるソフトウェアプログラム若しくはアルゴリズム（例えば、BLAST、ALIGN、CLUSTAL）を使用することにより、判定することができる。2つのポリペプチドが実質的に同一であることの一指標は、第一ポリペプチドが第二ポリペプチドと免疫交差反応性であることである。典型的には、保存的なアミノ酸置換により異なるポリペプチドは、免疫交叉反応性である。したがって、ポリペプチドは、例えば、2つのペプチドが1つの保存的なアミノ酸置換又は1つ以上の保存的なアミノ酸置換のみで異なる場合、第二ポリペプチドに対して実質的に同一である。

10

**【0066】**

所望の核酸が参照核酸のヌクレオチド配列と少なくとも約60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は99.5%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む場合、所望の核酸は、参照核酸に対して「実質的に同一」と言われてもよい。2つのこのような核酸の間の同一性パーセントは、2つの最適アラインメントを行った核酸配列の検査により手動で、又は、標準的なパラメーターを用いるソフトウェアプログラム若しくはアルゴリズム（例えば、BLAST、ALIGN、CLUSTAL）を使用することにより、判定することができる。2つの核酸配列が実質的に同一であることの一指標は、2つの核酸分子が厳密な条件下で（例えば、中度～高度に厳密な範囲内で）互いにハイブリッド形成することである。

20

**【0067】**

本明細書で使用するとき、所望の特定成分に関する「単離された」は、成分が他の成分を本質的に又は実質的に含まないことを意味する。例えば、「単離された」ポリペプチドは、例えば、他のポリペプチド及び細胞成分が挙げられるがこれらに限定されない他の成分を本質的に又は実質的に含まないことを意味する。「単離された」核酸は、核酸が、例えば他の核酸又は細胞成分が挙げられるがこれらに限定されない他の成分を本質的に又は実質的に含まないことを意味する。この用法の目的のために、「単離された」は、ライブラリ（例えば、スクリーニングライブラリ）の一部ではない核酸又はポリペプチドを指す。

30

**【0068】**

純度及び均一性は、典型的には、ポリアクリルアミドゲル電気泳動又は高速液体クロマトグラフィーなどの分析化学技術を用いて判定される。調製液中に存在する主要なタンパク質又は核酸が実質的に精製される。用語、「精製された」は、核酸又はタンパク質が、電気泳動ゲル、クロマトグラフ溶出液、及び/又は密度勾配遠心分離にかけた媒質において、本質的に1つのバンドを生じることを示す。具体的には、「精製された」は、単離された場合に、単離体が、単離体の少なくとも85重量%、90重量%、91重量%、92重量%、93重量%、94重量%、95重量%、96重量%、97重量%、98重量%、99重量%、99.5重量%又はそれ以上の核酸又はタンパク質を含有することを意味する。精製されたポリペプチドは、例えば、実験室合成、クロマトグラフィー（例えば、高速液体クロマトグラフィー）調製電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動後に着色しながらの視覚化、遠心分離、沈殿、親和性精製などが挙げられるがこれらに限定されない多くの方法により入手され得る（一般的には、R Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y. (1982), Deutscher, Methods in Enzymol., Vol. 182: Guide to Protein Purification, Academic Press, Inc. N.Y. (1990)を参照されたい）。本発明は、単離又は精製されたポリペプチド（例えば、本発明の単離されたプロテアーゼ変異体又はスプチリシン変異体）及

40

50

び単離又は精製された核酸（例えば、本発明のプロテアーゼ変異体又はスプチリシン変異体をコードする核酸）を含む。

【0069】

関連する意味において、本発明は、本発明の1つ以上のポリペプチド（例えば、本発明の1つ以上のプロテアーゼ変異体）又は本発明の1つ以上の核酸（例えば、本発明の1つ以上のプロテアーゼ変異体をコードする1つ以上の核酸）などの本発明の1つ以上の分子について組成物を濃縮する方法を提供する。組成物は、精製又は濃縮技術の適用後に分子の濃度が実質的に増加するとき、分子について濃縮される。実質的に純粋なポリペプチド又は核酸は、典型的には、特定の組成物中で全ての分子種の少なくとも約60重量%、70重量%、80重量%、85重量%、90重量%、91重量%、92重量%、93重量%、94重量%、95重量%、96重量%、97重量%、98重量%、99重量%、99.5重量%又はそれ以上を構成する。

10

【0070】

本明細書で使用するとき、用語、「コンビナトリアル変異誘発」は、参照核酸配列の核酸変異体のライブラリが作製される方法を指す。これらのライブラリでは、変異体は、予め確定された変異セットから選択される1つ又は複数の変異を含有する。この方法はまた、予め確定された変異セットのメンバーではないランダム変異を導入するための手段も提供する。一部のこのような方法としては、米国特許第6,582,914号に記載のものが挙げられ、本明細書に参照により組み込まれる。一部のこのようなコンビナトリアル変異誘発方法は、市販のキット（例えば、QUIKCHANGE（登録商標）Multi Site-Directed Mutagenesis Kit（Stratagene））に実体化された方法を含む及び/又は包含する。

20

【0071】

本明細書で使用するとき、プロテアーゼ変異体に関連して使用される「改善された特性」を有するとは、プロテアーゼ変異体が参照又は親プロテアーゼと比較して改善された特性を有することを指す。本発明のプロテアーゼ変異体は、以下の特性のうちの1つ以上を呈し得る：向上した又は改善されたタンパク質分解活性、向上した又は改善された安定性、向上した又は改善された表面若しくは物品のクリーニング性能、向上した又は改善されたクリーニング性能、向上した又は改善された布地若しくは洗濯物クリーニング性能又は洗浄性能、向上した又は改善された手洗い性能、向上した又は改善された手若しくは手動での食器洗浄性能、向上した又は改善された自動食器洗浄性能、参照プロテアーゼ又は所望の親プロテアーゼと比較して向上した又は改善された洗濯性能。

30

【0072】

本明細書で使用するとき、用語、「機能アッセイ」は、タンパク質の活性の指標を提供するアッセイである。この用語は、典型的には、タンパク質がその通常的能力で機能し得るかについて解析されるアッセイシステムを指す。例えば、酵素の場合、機能アッセイは、反応を触媒することにおける酵素の有効性を判定することを含む。

【0073】

分子に関する文脈における用語、「特性」又はその文法的に等価な表現は、選択又は検出され得る分子の任意の特徴若しくは特質を指し得る。例えば、ポリペプチドの文脈では、特性は、酵素活性（例えば、タンパク質分解活性）、安定性又は他の特性であり得る。

40

【0074】

「変異」核酸配列は、典型的には、宿主細胞の野生型配列に生じる少なくとも1つのコドンにおける変異を有し、その結果、変異核酸配列の発現産物が、野生型タンパク質と比較して改変されたアミノ酸配列を有するタンパク質になる、核酸配列を指す。発現産物は、改変された機能的能力（例えば、向上した酵素活性）を有し得る。

【0075】

本明細書で使用するとき、用語、「正味電荷」は、分子内に存在する全ての電荷の和として定義される。「正味電荷の変化」は、親タンパク質分子の正味電荷とは異なる正味電荷を有するタンパク質変異体を得るために親タンパク質分子に対して生じさせることがで

50

きる（すなわち、この変異体は、親分子の正味電荷と同じではない正味電荷を有する）。例えば、タンパク質の中性アミノ酸を負に帯電しているアミノ酸で置換すること、又は、タンパク質の正に帯電しているアミノ酸を中性アミノ酸で置換することにより、非改変タンパク質に対して - 1 の正味電荷が生じる。タンパク質の正に帯電したアミノ酸を負に帯電したアミノ酸に置換することにより、非改変タンパク質に対して - 2 の正味電荷が生じる。タンパク質の中性アミノ酸を正に帯電しているアミノ酸で置換すること、又は、タンパク質の負に帯電しているアミノ酸を中性アミノ酸で置換することにより、親タンパク質に対して + 1 の正味電荷が生じる。タンパク質の負に帯電したアミノ酸を正に帯電したアミノ酸に置換することにより、非改変タンパク質に対して + 2 の正味電荷が生じる。親タンパク質の正味電荷はまた、1つ以上の帯電したアミノ酸の欠失及び/又は挿入により変

10

**【0076】**

ポリペプチドに関する用語、「熱的に安定」及び「熱安定」及び「熱安定性」は、そのポリペプチドが例えば、高温への曝露を介するといった、熱のみにより引き起こされるその活性における恒久的変化に対して耐性であることを示す。例えば、熱的に安定な酵素は、その酵素が高温への曝露によるものなどの、熱のみにより引き起こされる、酵素活性の恒久的な変化に対して耐性であることを意味する。典型的には、熱的に安定であるプロテアーゼは、例えば、少なくとも約60分、120分、180分、240分、300分などといった所与の時間にわたって高温に曝露された後でも、そのタンパク質分解活性の少なくとも約50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、

20

**【0077】**

ポリペプチド又はプロテアーゼのクリーニング活性は、プロテアーゼにより達成されるクリーニング性能を指し得る。クリーニング活性は、対象、物品又は表面における様々な酵素反応性のシミ（例えば、食品、植物、血液、インク、血液/ミルク/インク、ミルク/油/色素、卵黄、ミルク、油、及び/又は卵タンパク質）のうちの1つ以上のクリーニングについての様々なアッセイを使用することにより、判定され得る。ポリペプチド（例えば、本発明のポリペプチド（プロテアーゼ変異体など）又は参照ポリペプチド（例えば、参照プロテアーゼ））のクリーニング性能は、対象、物品又は表面にあるシミを標準的な洗浄条件にかけ、様々なクロマトグラフィー、分光光度法又は他の定量的方法を用いる

30

**【0078】**

用語、プロテアーゼ変異体又は参照プロテアーゼの「クリーニング有効量」は、特定のクリーニング組成物において所望されるレベルの酵素活性を達成するプロテアーゼの量を指す。このような有効量は、使用される具体的なプロテアーゼ、クリーニング用途、ク

40

**【0079】**

用語、「クリーニング添加材料」は、クリーニング組成物中に含まれる本発明のプロテアーゼ変異体以外の任意の液体、固体、ガス状材料を指す。本発明のクリーニング組成物は、1つ以上のクリーニング添加材料を含み得る。各クリーニング添加材料は、典型的には、クリーニング組成物の具体的な型及び形態（例えば、液体、顆粒、粉末、バー、ペースト、スプレー、タブレット、ゲル、フォーム又は他の組成）に基づいて選択される。好ましくは、各クリーニング添加材料は、本組成物中で使用されるプロテアーゼ酵素と混合

50

可能である。

【0080】

クリーニング活性の文脈における用語、「向上した性能」は、標準的な洗浄サイクル及び/又は複数の洗浄サイクル後の通常の評価により判定されるような、卵、ミルク、植物、インク、油及び/又は血液などの特定の酵素反応性シミにおける酵素による、上昇した又はより大きなクリーニング活性を指す。

【0081】

クリーニング活性の文脈における用語、「減少した性能」は、標準的な洗浄サイクル後の通常の評価により判定されるような、卵、ミルク、植物又は血液などの特定の酵素反応性シミにおける酵素による、低下した又はより小さなクリーニング活性を指す。

10

【0082】

本明細書で使用する時、用語、「施設用クリーニング組成物」は、学校、病院、工場、商店、企業、ビル、レストラン、オフィス複合施設及びビル、加工及び/又は製造工場、動物病院、ファクトリー農場、ファクトリー牧場が挙げられるがこれらに限定されない施設における使用に好適な製品を指す。

【0083】

本明細書で使用する時、「布地ケア製品及びホームケア製品」は、それが販売されている形態で使用又は消費されることが通常意図され、布地、硬質表面並びに布地ケア及びホームケアの領域内の任意の他の表面を処理するためのものである製品又はデバイスを指し、例えば、エアフレッシュナー及び香料送達系などの空気ケア、自動車ケア、食器洗浄、布地コンディショニング（柔軟化及び/又はフレッシュニング）、洗濯洗浄性、洗濯及びすすぎ添加剤及び/又はケア、床及び便器クリーナーなどの硬質表面クリーニング及び/又は処理、並びに消費者及び施設用途のための他のクリーニング製品が挙げられる。

20

【0084】

本明細書で使用する時、用語、「クリーニング組成物」及び「クリーニング配合物」は、例えば、布地、洗濯、食器、食卓食器、コンタクトレンズ、他の固体基材、毛髪（ヒト又は動物の毛髪を含む）（シャンプー）、皮膚（石鹸、化粧品及びクリーム）、歯（マウスウォッシュ、練り歯磨き）、非布地及びホームケア対象物、フィルター、膜（例えば、限外濾過膜が挙げられるがこれに限定されない濾過膜）、硬質表面、並びに、例えば、机（机の上又は脚）、壁、別の家具物品又は対象、床、天井などの硬質表面が挙げられるがこれらに限定されない他の表面、が挙げられるがこれらに限定されない、クリーニングすべき物品から、望まれない化合物を除去するのに使用が見出される組成物を指す。クリーニング組成物又はクリーニング配合物は、例えば、シャンプー（ヒト又は動物の毛髪のクリーニング用）、石鹸、クリーム又は化粧品（皮膚クリーニング及び/又はスキンケア用）、マウスウォッシュ（口腔ケア用）、練り歯磨き（歯クリーニング及び/又は口腔ケア用）が挙げられるがこれらに限定されないパーソナルケア用途及び/又はパーソナルケア物品に有用であり得る。これらの用語は、この組成物又は配合物が、組成物又は配合物において使用されるプロテアーゼ及び/又は他の酵素と混合可能である限り、所望される特定のタイプのクリーニング組成物又は配合物及び製品の形態（例えば、液体、ゲル、顆粒又はスプレー組成物）について選択される任意の材料/化合物を包含する。クリーニング組成物又は配合物材料の具体的な選択は、クリーニングすべき表面、対象又は物品（例えば、布地）及び使用中のクリーニング条件のために所望される組成物又は配合物の形態を考慮することにより、容易に行われる。一態様では、クリーニング組成物又は配合物は、布地ケア製品及びホームケア製品（例えば、洗濯物をクリーニングするためのクリーニング組成物）であり得る。別の態様では、クリーニング組成物又は配合物は、布地ケア製品及びホームケア製品ではない（例えば、コンタクトレンズ、毛髪、歯又は皮膚をクリーニングするための、あるいは、パーソナルケア用途及び/又はパーソナルケア物品に有用な、クリーニング組成物）。

30

40

【0085】

クリーニング組成物及びクリーニング配合物は、任意の対象、物品及び/又は表面を、

50

クリーニング、漂白、消毒及びノ又は殺菌するのに好適である任意の組成物を含む。このような組成物及び配合物としては、例えば、クリーニング又は洗剤組成物（例えば、液体、タブレット、ゲル、バー、顆粒及びノ又は固体の、洗濯物クリーニング又は洗剤組成物、並びに微細布地洗剤組成物）、硬質表面クリーニング組成物及び配合物（例えば、ガラス、木、セラミック及び金属の、カウンタートップ及び窓、カーペットクリーナー、オープンクリーナー、布地フレッシュナー、布地柔軟剤）、並びに、繊維、洗濯促進クリーニング又は洗剤組成物、洗濯時添加クリーニング組成物、及び洗濯シミ抜きクリーニング組成物、食器洗浄組成物、例えば、手又は手動での食器洗浄組成物（例えば、「手」又は「手動」食器洗浄洗剤）及び自動食器洗浄組成物（例えば、「自動食器洗浄洗剤」）が挙げられるが、これらに限定されない。

10

#### 【0086】

本明細書で使用するとき、特に示さない限り、クリーニング組成物又はクリーニング配合物は、顆粒又は粉末形態の汎用又は強力洗浄剤、特にクリーニング洗剤、液体、顆粒、ゲル、固体、タブレット又はペースト形態の汎用洗浄剤、特にいわゆる強力液体（HDL）洗剤又は強力粉末洗剤（HDD）タイプ、液体微細布地洗剤、手又は手動の食器洗浄剤（高発泡タイプのものなど）、手又は手動の食器洗浄、自動食器洗浄又は食卓食器若しくは食卓用器具洗浄剤、例えば、家庭用途及び施設用途のための様々なタブレット、粉末、固体、顆粒、液体、ゲル及びすすぎ補助タイプの剤、液体クリーニング及び消毒剤、例えば、抗菌手洗いタイプ、クリーニングバー、マウスウォッシュ、義歯クリーナー、自動車用シャンプー、カーペットシャンプー、浴室クリーナー、パーソナルケア物品（例えば、

20

#### 【0087】

一態様では、本発明は、本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体又はポリペプチドを含む、クリーニング組成物又は洗剤組成物を提供し、ここで、このクリーニング組成物又は洗剤組成物は、コンタクトレンズのクリーニングに有用である。別の態様では、本発明は、本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体又はポリペプチドを含む、ク

30

#### 【0088】

本明細書で使用するとき、「布地クリーニング組成物」は、洗濯添加組成物、並びに、

40

シミの付いた布地（例えば、衣類、リネン、及び他の織物材料）の浸漬及び／又は前処理での使用に好適な組成物などの、手及び機械での洗濯洗剤組成物を含む。

【0089】

本明細書で使用するとき、「非布地クリーニング組成物」は、例えば、手による又は手動又は自動食器洗浄洗剤組成物、口腔クリーニング組成物、義歯クリーニング組成物及びパーソナルクレンジング組成物が挙げられるがこれらに限定されない非繊維（すなわち、非布地）表面クリーニング組成物を含む。

【0090】

本明細書で使用するとき、用語、「洗剤組成物」又は「洗剤配合物」は、特定の布地及び／又は非布地対象又は物品などの、汚れた若しくは汚い対象のクリーニングのために洗浄媒質中で使用することを意図された組成物に関して、使用される。本発明のこのような組成物は、任意の特定の洗剤組成物又は配合物に限定されない。実際、本発明の洗剤は、本発明のプロテアーゼ変異体を少なくとも1つ含み得、加えて、1つ以上の界面活性剤、トランスフェラーゼ、加水分解酵素、ペルヒドロラーゼ、オキシドレダクターゼ、ビルダー（例えば、ビルダー塩）、漂白剤、漂白活性剤、青味剤、蛍光染料、凝固阻害剤、マスキング剤、酵素活性剤、抗酸化剤及び／又は安定化剤を含み得る。場合によっては、ビルダー塩は、シリケート塩とホスフェート塩の混合物であり、好ましくはケイ酸塩（例えば、メタケイ酸ナトリウム）がリン酸塩（例えば、トリポリリン酸ナトリウム）よりも多い。クリーニング組成物又は洗剤組成物が挙げられるがこれらに限定されない本発明の一部の組成物は、リン酸塩（例えば、リン酸塩又はリン酸塩ビルダー）を全く含有しない。

【0091】

本明細書で使用するとき、「食器洗浄組成物」は、カトラリーなどの食卓食器をクリーニングするためのすべての形態の組成物を指し、顆粒及び液体形態が挙げられるがこれらに限定されない。一部の態様では、食器洗浄組成物は、自動食器洗浄機において使用を見出される「自動食器洗浄」組成物である。本発明が任意の特定のタイプの食卓食器組成物に限定されることは意図されない。実際、本発明は、セラミックス、プラスチック、金属、陶器、ガラス、アクリルなどが挙げられるがこれらに限定されない任意の材料の食卓食器（例えば、皿、コップ、グラス、ボウルなどが挙げられるがこれらに限定されない食器）及びカトラリー（例えば、スプーン、ナイフ、フォーク、給仕用器具などが挙げられるがこれらに限定され得ない器具）のクリーニングにおいて使用を見出される。用語、「食卓食器」は、本明細書では食器及びカトラリーの両方に関して使用される。

【0092】

本明細書で使用するとき、用語、「漂白」は、十分な長さの時間にわたって及び／又は適切なpHで及び／又は増白をもたらす（すなわち、白くする）温度条件で、材料（例えば、布地、洗濯物、パルプなど）又は表面を処理すること、並びに／あるいは、材料をクリーニングすることを指す。漂白に好適な化学物質の例としては、例えば、 $ClO_2$ 、 $H_2O_2$ 、過酸、 $NO_2$ などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0093】

本明細書で使用するとき、プロテアーゼ（例えば、本発明のプロテアーゼ変異体）の「洗浄性能」は、組成物にプロテアーゼ変異体を添加しない洗剤と比較して洗剤に追加のクリーニング性能をもたらす、洗浄に対するプロテアーゼ変異体の寄与を指す。洗浄性能は、関連する洗浄条件下で比較される。一部の試験システムでは、洗剤組成、泡濃度、水硬度、洗浄機構、時間、pH及び／又は温度などの他の関連する要因は、特定の市場区分（例えば、手による又は手動食器洗浄、自動食器洗浄、食卓食器クリーニング、食卓用器具クリーニング、布地クリーニングなど）における家庭向け用途に典型的な条件を模倣するようなやり方で制御することができる。

【0094】

用語、「関連する洗浄条件」は、本明細書では、特に洗浄温度、時間、洗浄機構、泡濃度、洗剤のタイプ及び水硬度といった、手による食器洗浄、自動食器洗浄又は洗濯洗剤市場区分において実際に家庭で使用される条件を示すために使用される。

## 【0095】

用語、「改善された洗浄性能」は、関連する洗浄条件下でシミ除去においてより良好な仕上がりが得られることを示すために、あるいは、対応する野生型又は出発親プロテアーゼと比較して同じ仕上がりを得るために必要とされるプロテアーゼ変異体が重量に基づいてより少量であることを示すために、使用される。

## 【0096】

本明細書で使用するとき、用語、「消毒」は、汚染物質を表面から除去すること、並びに、物品の表面上の細菌を阻害又は殺すことを指す。本発明は、任意の特定の表面、物品又は、除去されるべき汚染物質若しくは細菌に限定されることを意図しない。

## 【0097】

本明細書のクリーニング組成物の「コンパクト」形態は、密度により最も反映され、組成の点では、無機充填剤塩の量により最もよく反映される。無機充填剤塩は、粉末形態の洗剤組成物の従来成分である。従来の洗剤組成物では、充填剤塩は、典型的には組成物全体の約17～約35重量%の実質量で存在する。対照的に、コンパクト組成物では、充填剤塩は、組成物全体の約15%を超えない量で存在する。充填剤塩は、組成物の約10重量%又はより好ましくは約5重量%を超えない量で存在し得る。無機充填剤塩は、硫酸塩及び塩化物のアルカリ及びアルカリ土類金属塩から選択することができる。この充填剤塩は、硫酸ナトリウムであつてもよい。

## 【0098】

所与のアミノ酸配列中のアミノ酸残基の位置は、典型的には、配列番号2に示されるバチルス・アミロリケファシエンス (*B. amyloliquefaciens*) スプチリシン B P N' アミノ酸配列の対応するアミノ酸残基の位置の番号付けを用いて、番号付けされる。したがって、配列番号2のバチルス・アミロリケファシエンス (*B. amyloliquefaciens*) スプチリシン B P N' アミノ酸配列は、参照配列として機能する。本明細書に記載のプロテアーゼ変異体のアミノ酸配列などの所与のアミノ酸配列は、本明細書に記載のようにアラインメントアルゴリズムを用いて B P N' 配列 (配列番号2) とアラインメントを行うことができ、B P N' 配列中のアミノ酸残基とアラインメントする (好ましくは最適にアラインメントする) 所与のアミノ酸配列中のアミノ酸残基は、スプチリシン B P N' 配列中の対応するアミノ酸残基を参照することにより、便宜上番号付けすることができる。

## 【0099】

一般に、本明細書で使用される命名法、並びに、下記の細胞培養、分子遺伝学、分子生物学、核酸化学及びタンパク質化学における実験室手順の多くは周知であり、当業者により一般的に採用されている。組み換え核酸の製造及び操作方法、核酸合成方法、細胞培養方法及び導入遺伝子組み込み (例えば、トランスフェクション、電気穿孔) 方法は、当業者に既知であり、数多くの標準テキストに記載されている。オリゴヌクレオチドの合成及び精製工程は、典型的には、仕様に従って実行される。技術及び手順は、一般に、当該技術分野で周知の従来方法に従って、並びに、この文書全体にわたって提供される様々な一般的参照文献に従って、実行される。文献中の手順は、当業者に周知であると考えられ、読み手の便宜のために提供される。

## 【0100】

本発明の1つ以上のプロテアーゼ変異体などのプロテアーゼ (プロテアーゼ変異体を含む) 、並びに、香料を含む封入体、色調剤、両親媒性クリーニングポリマー及びこれらの混合物からなる群から選択される物質を含んでもよく、上記組成物の任意の態様の残部が1つ以上の添加剤物質からなる布地ケア製品及びホームケア製品が開示される。上記布地ケア製品及びホームケア製品の一態様では、上記布地ケア製品及びホームケア製品は、布地ケア製品及びホームケア製品の総重量に基づいて、約0.005重量パーセント (0.0005重量%) ~ 約0.1重量%、約0.001重量% ~ 約0.05重量%、又は更には約0.002重量% ~ 約0.03重量%の上記プロテアーゼを含んでもよい。上記布地ケア製品及びホームケア製品の一態様では、上記布地ケア製品及びホームケア製品は、布地ケア製品及びホームケア製品の総重量に基づいて、約0.00003重量% ~ 約0.1

10

20

30

40

50



重量%、約0.00008重量%～約0.05重量%、又は更には約0.0001重量%～約0.04重量%の布地色調剤を含んでもよい。上記布地ケア製品及びホームケア製品の一態様では、上記布地ケア製品及びホームケア製品は、布地ケア製品及びホームケア製品の総重量に基づいて、約0.001重量%～約5重量%、約0.01重量%～約2重量%、又は更には約0.03重量%～約0.5重量%の香料カプセルを含んでもよい。上記布地ケア製品及びホームケア製品の一態様では、上記布地ケア製品及びホームケア製品は、布地ケア製品及びホームケア製品の総重量に基づいて、約0.1重量%～約5重量%、約0.25重量%～約2.5重量%、又は更には約0.3重量%～約1.5重量%の両親媒性クリーニングポリマーを含んでもよい。

#### 【0101】

##### 本発明のポリペプチド

本発明は、新規ポリペプチドを提供し、これは「本発明のポリペプチド」と集合的に呼ばれ得る。本発明のポリペプチドは、単離された、組み換え体である、実質的に純粋な又は非自然発生型のプロテアーゼ変異体を含み、例えば、スブチリシンプロテアーゼ変異体ポリペプチドが挙げられ、これは酵素活性（例えば、タンパク質分解活性）及び/又は本明細書の他箇所により詳細に説明されている追加の特性（例えば、クリーニング活性、安定性など）を有する。本発明のポリペプチドは、単離された、組み換え体である、実質的に純粋な又は自然発生した冷水プロテアーゼを含み、タンパク質分解活性、クリーニング活性、安定性、本明細書の他箇所説明されている他の特性を有する。冷水プロテアーゼなどの本発明のこのようなポリペプチドは、既知のプロテアーゼと比較して向上した性能（例えば、向上したタンパク質分解活性、向上したクリーニング性能又は活性、向上した安定性など）を有し得る。本発明のポリペプチドは、クリーニング用途に有用であり、クリーニングする必要のある（例えば、物品の表面の）物品又は表面をクリーニングする方法において有用であるクリーニング組成物中に組み込まれ得る。タンパク質分解活性を有する本発明のポリペプチドは、例えば、布地ケアクリーニング組成物及びホームケアクリーニング組成物などの布地ケア製品及びホームケア製品で有用である。タンパク質活性を有する本発明の一部のポリペプチドは、パーソナルケア組成物で有用である。タンパク質活性を有する本発明のポリペプチドはまた、非布地ケア製品及び非ホームケア製品で有用である（すなわち、布地ケア製品でもホームケア製品でもない製品が本明細書に記載される）。本発明のプロテアーゼ変異体は、スブチリシンプロテアーゼ変異体であり得る。本発明は、バチルス種プロテアーゼ変異体及びバチルス種スブチリシンプロテアーゼ変異体を含む。

#### 【0102】

本発明のポリペプチドは、本明細書全体にわたって開示され、これには下記に提供されるパートI実施例及びパートII実施例が挙げられるがこれらに限定されない。本発明は、タンパク質分解活性を有する単離された、組み換え体である、実質的に純粋な又は非自然発生型のプロテアーゼ変異体（例えば、スブチリシン変異体）を含み、このポリペプチドは、下記のパートI及びパートII実施例のいずれかに記載の特定のプロテアーゼ変異体のアミノ酸配列に対して少なくとも約60%、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一態様では、本発明は、タンパク質分解活性を有する単離された、組み換え体である、実質的に純粋な又は非自然発生型のスブチリシンポリペプチドを含み、このポリペプチドは、配列番号2のBPN'配列のプロテアーゼ変異体であり、上記ポリペプチドは、配列番号2に対して少なくとも約60%、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の配列同一性及びパートI実施例のいずれかに記載のアミノ酸置換の組を有するアミノ酸配列を含む。一態様では、本発明は、タンパク質分解活性を有する単離された、組み換え体である、実質的に純粋な又は非自然発生型のスブチリシンポリペプチドを含み、このポリペプチドは、配列番号755のGG36配列のプロテアーゼ変異体であり、上記ポリ

10

20

30

40

50

ペプチドは、配列番号 755 に対して少なくとも約 60%、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97% 又は 98% の配列同一性及びパート I I 実施例のいずれかに記載のアミノ酸置換の組を有するアミノ酸配列を含む。

#### 【0103】

第一態様では、本発明は、親プロテアーゼ酵素の単離された又は非自然発生型のポリペプチドプロテアーゼ変異体を提供し、この変異体はタンパク質分解活性を有し、位置 24、53、78、97、101、128 及び 217 からなる群から選択される配列番号 2 のアミノ酸位置に対応する 1 つ以上のアミノ酸位置において変異を含むアミノ酸配列を含み、ここで、変異の少なくとも 1 つは独立して、(i) この位置を占めるアミノ酸残基の上流又は下流における 1 つ以上のアミノ酸残基の挿入、(ii) この位置を占めるアミノ酸残基の欠失、又は (iii) 異なるアミノ酸残基による、この位置を占めるアミノ酸残基の置換、であり、ここで、各アミノ酸位置は、配列番号 2 のアミノ酸配列と変異体のアミノ酸配列とのアラインメントによって決定される配列番号 2 に記載のバチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) スブチリシンプロテアーゼ BPN' のアミノ酸配列におけるアミノ酸位置に対応させることにより番号付けされる。本発明の第一態様によるプロテアーゼ酵素の変異体は、プロテアーゼ変異体と呼ばれ得る。本発明の第一態様による変異体は、非自然発生型プロテアーゼであり得る。本発明の第一態様による変異体は、単離又は精製され得る。本発明の第一態様による変異体は、スブチリシン変異体であり得る。本発明の第一態様による変異体は、タンパク質分解活性を有し得る。本発明の第一態様による変異体は、配列番号 2 に記載の BPN' アミノ酸配列のタンパク質分解活性と比較して向上したタンパク質分解活性を有し得る。

#### 【0104】

本発明の第一態様による変異体は、スブチリシンプロテアーゼである親プロテアーゼの変異体であり得、スブチリシンプロテアーゼは、バチルス種プロテアーゼであり得る。本発明の第一態様による親バチルスプロテアーゼは、バチルス・アミロリケファシエンス (*B. amyloliquefaciens*) スブチリシンプロテアーゼ BPN' (配列番号 2)、バチルス・ステアロサーモフィラス (*B. stearoothermophilus*)、枯草菌 (*B. subtilis*)、バチルス・リケニホルミス (*B. licheniformis*)、バチルス・レントス (*B. lentus*)、バチルス・ブレビス (*B. brevis*)、バチルス・ステアロサーモフィラス (*B. stearoothermophilus*)、バチルス・アルカロフィラス (*B. alkalophilus*)、バチルス・アミロリケファシエンス (*B. amyloliquefaciens*)、バチルス・クラウジイ (*B. clausii*)、バチルス・ハロデュランス (*B. halodurans*)、バチルス・メガテリウム (*B. megaterium*)、バチルス・コアグランス (*B. coagulans*)、バチルス・サーキュランス (*B. circulans*)、バチルス・ロータス (*B. lautus*)、*B. species TS-23*、バチルス・チューリンゲンシス (*B. thuringiensis*)、BPN' - v3 (配列番号 4) 及び BPN' - v36 (配列番号 6) からなる群から選択され得る。本発明の第一態様による親プロテアーゼは、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のアミノ酸配列に対して少なくとも 60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又は 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。

#### 【0105】

本発明の第一態様による変異体は、成熟型を有するプロテアーゼ変異体であり得る。本発明の第一態様による変異体は、成熟型を有するプロテアーゼ変異体であり得る。

#### 【0106】

本発明の第一態様による変異体は、位置 24、53、78、97、101、128 及び 217 からなる群から選択される 2 つのアミノ酸位置における変異を含むアミノ酸配列を含み得る。本発明の第一態様による変異体は、位置 24、53、78、97、101、128 及び 217 からなる群から選択される 3 つのアミノ酸位置における変異を含むアミノ酸配列を含み得る。本発明の第一態様による変異体は、位置 24、53、78、97、101、128 及び 217 からなる群から選択される 4 つのアミノ酸位置における変異を含

むアミノ酸配列を含み得る。本発明の第一態様による変異体は、位置24、53、78、97、101、128及び217からなる群から選択される5つのアミノ酸位置における変異を含むアミノ酸配列を含み得る。本発明の第一態様による変異体は、位置24、53、78、97、101、128及び217からなる群から選択される6つのアミノ酸位置における変異を含むアミノ酸配列を含み得る。本発明の第一態様による変異体は、位置24、53、78、97、101、128及び217からなる群から選択される配列番号2の位置に対応するアミノ酸位置のそれぞれにおける変異を含むアミノ酸配列を含み得る。本発明の第一態様による変異は、位置24、53、78、97、101、128及び217からなる群から選択される位置における異なるアミノ酸残基によるアミノ酸残基の置換を含むアミノ酸配列を含み得る。

10

## 【0107】

本発明の第一態様による変異は、位置24、53、78、97、101、128及び217からなる群から選択される2つ又は3つの位置のそれぞれにおける異なるアミノ酸残基によるアミノ酸残基の置換を含むアミノ酸配列を含み得る。本発明の第一態様による変異は、位置24、53、78、97、101、128及び217からなる群から選択される4つの位置のそれぞれにおける異なるアミノ酸残基によるアミノ酸残基の置換を含むアミノ酸配列を含み得る。本発明の第一態様による変異は、位置24、53、78、97、101、128及び217からなる群から選択される5つの位置のそれぞれにおける異なるアミノ酸残基によるアミノ酸残基の置換を含むアミノ酸配列を含み得る。本発明の第一態様による変異は、位置24、53、78、97、101、128及び217からなる群から選択される6つ又は7つの位置のそれぞれにおける異なるアミノ酸残基によるアミノ酸残基の置換を含むアミノ酸配列を含み得る。本発明の第一態様による変異体は、位置24、53、78、101、128及び217のそれぞれにおける異なるアミノ酸残基によるアミノ酸残基の置換を含むアミノ酸配列を含み得、ここで、各位置は配列番号2における位置と対応させることにより番号付けされる。

20

## 【0108】

本発明の第一態様による変異体は、X024G/R、X053G、X078N、X097A、X101N、X128A/S及びX217Q/Lからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含み得る。本発明の第一態様による変異体は、X024G/R、X053G、X078N、X097A、X101N、X128A/S及びX217Q/Lからなる群から選択される少なくとも2つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含み得る。本発明の第一態様による変異体は、X024G/R、X053G、X078N、X097A、X101N、X128A/S及びX217Q/Lからなる群から選択される少なくとも3つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含み得る。本発明の第一態様による変異体は、X024G/R、X053G、X078N、X097A、X101N、X128A/S及びX217Q/Lからなる群から選択される少なくとも4つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含み得る。本発明の第一態様による変異体は、X024G/R、X053G、X078N、X097A、X101N、X128A/S及びX217Q/Lからなる群から選択される少なくとも5つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含み得る。本発明の第一態様による変異体は、X024G/R、X053G、X078N、X097A、X101N、X128A/S及びX217Q/Lからなる群から選択される少なくとも6つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含み得る。本発明の第一態様による変異体は、(a) X128A/S及び/又はX217L/Q、(b) G128A/S及び/又はY217L/Q、並びに(c) G097A、G128A/S及び/又はY217L/Qからなる群から選択される置換の組を含むアミノ酸配列を含み得る。本発明の第一態様による変異体は、アミノ酸置換X024G/R+X053G+X078N+X101N+X128A/S+X217Q/Lを含むアミノ酸配列を含み得、ここで、この変異体はタンパク質分解活性を有し、選択的にこの変異体は、配列番号2、配列番号4又は配列番号6に記載のプロテアーゼと比較して向上したタンパク質分解活性又は向上したクリーニング活性を有し、あるいは、配列番号2、配列番号4又は配列番号6に記載のプロテ

30

40

50

アーゼのものを超えるタンパク質分解アッセイ（例えば、AAPFアッセイ）又はクリーニングアッセイ（例えば、BMI、植物又は卵の微小標本（microswatch）アッセイ）の性能指数を有する。

【0109】

本発明の第一態様による変異体は、S024G, S053G, S078N, S101N, G128A/S及びY217Qからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換を含み得る。本発明の第一態様による変異体は、アミノ酸置換S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Qを含むアミノ酸配列を含み得る。

【0110】

本発明の第一態様による変異体は、配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも60%、65%、70%、80%又は85%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。本発明の第一態様による変異体は、配列番号2に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。本発明の第一態様による変異体は、配列番号2に対して少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。本発明の第一態様による変異体は、配列番号2に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。

【0111】

本発明の第一態様による変異体は、配列番号2に記載のプロテアーゼのタンパク質分解活性と比較して向上したタンパク質分解活性を有し得る。本発明の第一態様による変異体は、配列番号4に記載のプロテアーゼのタンパク質分解活性と比較して向上したタンパク質分解活性を有し得る。本発明の第一態様による変異体は、配列番号6に記載のプロテアーゼのタンパク質分解活性と比較して向上したタンパク質分解活性を有し得る。本発明の第一態様による変異体は、配列番号2、配列番号4又は配列番号6に記載のプロテアーゼのクリーニング活性と比較して向上したクリーニング活性を有し得る。本発明の第一態様による変異体は、配列番号2、配列番号4又は配列番号6に記載のプロテアーゼのものを超える、タンパク質分解活性（例えば、AAPFアッセイ）又はクリーニングアッセイ（例えば、BMI、植物又は卵の微小標本アッセイ）における性能指数を有し得る。

【0112】

第二態様では、本発明は、親プロテアーゼの単離された又は非自然発生のポリペプチドプロテアーゼ変異体を提供し、この変異体は、X024G/R, X053G, X078N, X101N, X128A/S及びX217L/Qからなる群から選択される3つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含み、ここで、この変異体はタンパク質分解活性を有し、この変異体の各アミノ酸位置は、配列番号2のアミノ酸配列と変異体のアミノ酸配列とのアラインメントによって決定される配列番号2のアミノ酸配列におけるアミノ酸位置に対応させることにより番号付けされる。本発明の第一態様による変異体は、配列番号2、配列番号4又は配列番号6に記載のプロテアーゼと比較して向上したタンパク質分解活性又は向上したクリーニング活性を有し得る。本発明の第一態様による変異体は、配列番号2、配列番号4又は配列番号6に記載のプロテアーゼのものを超える、タンパク質分解活性（例えば、AAPFアッセイ）又はクリーニングアッセイ（例えば、BMI、植物又は卵の微小標本アッセイ）における性能指数を有し得る。

【0113】

本発明の第二態様による変異体は、X024G/R, X053G, X078N, X101N, X128A/S及びX217L/Qからなる群から選択される3つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含み、ここで、この変異体はタンパク質分解活性を有し、この変異体の各アミノ酸位置は、配列番号2のアミノ酸配列と変異体のアミノ酸配列とのアラインメントによって決定される配列番号2のアミノ酸配列におけるアミノ酸位置に対応させることにより番号付けされる。本発明の第二態様による変異体は、X024G/R, X053G, X078N, X101N, X128A/S及びX217L/Qからなる群から選択される少なくとも4つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含み得る。本発明の第二態様による変異体は、X024G/R, X053G, X078N, X101N, X128A/

10

20

30

40

50

S及びX217L/Qからなる群から選択される少なくとも5つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含み得る。本発明の第二態様による変異体は、X024G/R、X053G、X078N、X101N、X128A/S及びX217L/Qからなる群から選択される少なくとも6つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含み得る。本発明の第二態様による変異体は、アミノ酸置換X097Aを更に含むアミノ酸配列を含み得る。本発明の第二態様による変異体は、アミノ酸置換X024G/R+X053G+X078N+X101N+X128A/S+X217L/Q又はX097A+X128A/S+X217L/Qを含むアミノ酸配列を含み得る。

【0114】

本発明の第二態様による変異体は、アミノ酸置換S024G/R+S053G+S078N+S101N+G128A/S+Y217L/Q又はG097A+G128A/S+Y217L/Qを含むアミノ酸配列を含み得る。本発明の第二態様による変異体は、アミノ酸置換S024G+S053G+S078N+S101N+G128S+Y217Q又はS024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Qを含むアミノ酸配列を含み得る。

10

【0115】

本発明の第二態様による変異体のアミノ酸配列は、置換N109Gを更に含み得る。本発明の第二態様による変異体のアミノ酸配列は、置換N076Dを更に含み得る。本発明の第二態様による変異体のアミノ酸配列は、置換S033Tを更に含み得る。本発明の第二態様による変異体のアミノ酸配列は、置換N243Vを更に含み得る。本発明の第二態様による変異体のアミノ酸配列は、置換S248Aを更に含み得る。本発明の第二態様による変異体のアミノ酸配列は、置換A088Tを更に含み得る。本発明の第二態様による変異体のアミノ酸配列は、置換S063Gを更に含み得る。本発明の第二態様による変異体のアミノ酸配列は、N109G、N076D、S033T、N243V、S248A、A088T、及びS063Gからなる群から選択される2つ以上の置換を更に含み得る。

20

【0116】

本発明の第二態様による変異体のアミノ酸配列は、アミノ酸置換S024G+S053G+S078N+S101N+G128S+Y217Q又はS024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Qを含むアミノ酸配列を含み得、A088T+N109G+A116T+G131H+N243V+L257G、S033T+N076D、S009T+N109G+K141R+N243V、S162G+K256R、N109G+A116T、N109G+L257G、S162G+L257G、N061G+N109G+N243V、N109G+N243V+S248A、S033T+N076D+N109G+N218S+N243V+S248N+K256R、N109G+A116T+N243V+K256R、A088T+N109G+A116T+G131H+N243V、A088T+N109G、N109G+N243V、T158S+L257G、N061S+N109G+N243V、P040A+N109G+N243V+S248N+K256R、S009T+S018T+Y021N+N109G+K141R、A088T+N109G+A116T+T158S+N243V+K256R、A088T+N109G+A116T+T158S+N218S+L257G、N109G+K256R、N109G+N243V+K256R、S063G+K256R、S063G+N109G、S063G、S063G+N076D、S033T+N076D+N218S、及びN076D+N218Sからなる群から選択されるアミノ酸置換の組を更に含み得る。

30

40

【0117】

本発明の第二態様による変異体は、アミノ酸置換S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Qを含むアミノ酸配列を含み得、A088T+N109G+A116T+G131H+N243V+L257G、S033T+N076D、S009T+N109G+A128S+K141R+N243V、S162G+K256R、N109G+A116T、N109G+L257G、S162G+L257G、N0

50

6 1 G + N 1 0 9 G + N 2 4 3 V , N 1 0 9 G + A 1 2 8 S + N 2 4 3 V + S 2 4 8 A ,  
 S 0 3 3 T + N 0 7 6 D + N 1 0 9 G + A 1 2 8 S + N 2 1 8 S + N 2 4 3 V + S 2 4 8  
 N + K 2 5 6 R , N 1 0 9 G + A 1 1 6 T + N 2 4 3 V + K 2 5 6 R , A 0 8 8 T + N 1  
 0 9 G + A 1 1 6 T + G 1 3 1 H + N 2 4 3 V , A 0 8 8 T + N 1 0 9 G , N 1 0 9 G +  
 N 2 4 3 V , T 1 5 8 S + L 2 5 7 G , N 0 6 1 S + N 1 0 9 G + N 2 4 3 V , P 0 4 0  
 A + N 1 0 9 G + A 1 2 8 S + N 2 4 3 V + S 2 4 8 N + K 2 5 6 R , S 0 0 9 T + S 0  
 1 8 T + Y 0 2 1 N + N 1 0 9 G + A 1 2 8 S + K 1 4 1 R , A 0 8 8 T + N 1 0 9 G +  
 A 1 1 6 T + T 1 5 8 S + N 2 4 3 V + K 2 5 6 R , A 0 8 8 T + N 1 0 9 G + A 1 1 6  
 T + T 1 5 8 S + N 2 1 8 S + L 2 5 7 G , N 1 0 9 G + K 2 5 6 R , N 1 0 9 G + A 1  
 2 8 S + N 2 4 3 V + K 2 5 6 R , S 0 6 3 G + K 2 5 6 R , S 0 6 3 G + N 1 0 9 G ,  
 S 0 6 3 G + A 1 2 8 S , S 0 6 3 G + N 0 7 6 D , S 0 3 3 T + N 0 7 6 D + A 1 2 8  
 S + N 2 1 8 S , 及び N 0 7 6 D + N 2 1 8 S , からなる群から選択されるアミノ酸置換  
 の組を更に含み得、ここで、この変異体はタンパク質分解活性を有し、この変異体の各ア  
 ミノ酸位置は、配列番号2のアミノ酸配列と変異体のアミノ酸配列とのアラインメントに  
 よって決定される配列番号2のアミノ酸配列におけるアミノ酸位置に対応させることによ  
 り番号付けされる。特に、例えば、置換 S 0 2 4 G + S 0 5 3 G + S 0 7 8 N + S 1 0 1  
 N + G 1 2 8 A + Y 2 1 7 Q , を含む配列を含み、並びに置換の組 S 0 0 9 T + N 1 0 9  
 G + A 1 2 8 S + K 1 4 1 R + N 2 4 3 V , を更に含む、本発明の第二態様による変異体  
 は、位置128のアラニン(すなわち、G 1 2 8 A 置換)がSで置換される(A 1 2 8 S  
 置換)ことから位置128においてセリン(S)を有する。

10

20

## 【0118】

本発明の第二態様による変異体のアミノ酸配列は、配列番号2、配列番号4又は配列番  
 号6のアミノ酸配列に対して少なくとも60%、65%又は70%の配列同一性を有し得  
 る。本発明の第二態様による変異体のアミノ酸配列は、配列番号2、配列番号4又は配列  
 番号6のアミノ酸配列に対して少なくとも80%又は85%の配列同一性を有し得る。本  
 発明の第二態様による変異体のアミノ酸配列は、配列番号2、配列番号4又は配列番号6  
 のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、  
 96%、97%又は98%の配列同一性を有し得る。

## 【0119】

本発明の第二態様による特許プロテアーゼは、スブチリシンプロテアーゼであり得る。  
 本発明の第二態様による親プロテアーゼは、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のア  
 ミノ酸配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92  
 %、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の配列同一  
 性を有するアミノ酸配列を含み得る。本発明の第二態様による変異体は、成熟型を有する  
 プロテアーゼ変異体であり得る。本発明の第一態様による変異体は、成熟型を有するプロ  
 テアーゼ変異体であり得る。

30

## 【0120】

本発明はまた、配列番号6のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%  
 、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は10  
 0%の配列同一性を有するアミノ酸を含み、並びに、以下のもの：

40

A 0 8 8 T + N 1 0 9 G + A 1 1 6 T + G 1 3 1 H + N 2 4 3 V + L 2 5 7 G ,  
 S 0 3 3 T + N 0 7 6 D ,  
 S 0 0 9 T + N 1 0 9 G + A 1 2 8 S + K 1 4 1 R + N 2 4 3 V ,  
 S 1 6 2 G + K 2 5 6 R ,  
 N 1 0 9 G + A 1 1 6 T ,  
 N 1 0 9 G + L 2 5 7 G ,  
 S 1 6 2 G + L 2 5 7 G ,  
 N 0 6 1 G + N 1 0 9 G + N 2 4 3 V ,  
 N 1 0 9 G + A 1 2 8 S + N 2 4 3 V + S 2 4 8 A ,  
 S 0 3 3 T + N 0 7 6 D + N 1 0 9 G + A 1 2 8 S + N 2 1 8 S + N 2 4 3 V + S 2 4

50

8 N + K 2 5 6 R ,  
 N 1 0 9 G + A 1 1 6 T + N 2 4 3 V + K 2 5 6 R ,  
 A 0 8 8 T + N 1 0 9 G + A 1 1 6 T + G 1 3 1 H + N 2 4 3 V ,  
 A 0 8 8 T + N 1 0 9 G ,  
 N 1 0 9 G + N 2 4 3 V ,  
 T 1 5 8 S + L 2 5 7 G ,  
 N 0 6 1 S + N 1 0 9 G + N 2 4 3 V ,  
 P 0 4 0 A + N 1 0 9 G + A 1 2 8 S + N 2 4 3 V + S 2 4 8 N + K 2 5 6 R ,  
 S 0 0 9 T + S 0 1 8 T + Y 0 2 1 N + N 1 0 9 G + A 1 2 8 S + K 1 4 1 R ,  
 A 0 8 8 T + N 1 0 9 G + A 1 1 6 T + T 1 5 8 S + N 2 4 3 V + K 2 5 6 R ,  
 A 0 8 8 T + N 1 0 9 G + A 1 1 6 T + T 1 5 8 S + N 2 1 8 S + L 2 5 7 G ,  
 N 1 0 9 G + K 2 5 6 R ,  
 N 1 0 9 G + A 1 2 8 S + N 2 4 3 V + K 2 5 6 R ,  
 S 0 6 3 G + K 2 5 6 R ,  
 S 0 6 3 G + N 1 0 9 G ,  
 S 0 6 3 G + A 1 2 8 S ,  
 S 0 6 3 G + N 0 7 6 D ,  
 S 0 3 3 T + N 0 7 6 D + A 1 2 8 S + N 2 1 8 S , 及び

N 0 7 6 D + N 2 1 8 S , からなる群から選択されるアミノ酸置換の組を含む、本発明の第二態様による単離されたポリペプチド（例えば、プロテアーゼ変異体）を提供し、

ここで、この変異体は、タンパク質分解活性を有し、変異体の各アミノ酸位置は、配列番号2のアミノ酸配列と変異体のアミノ酸配列とのアラインメントによって決定される配列番号2のアミノ酸配列におけるアミノ酸位置に対応させることにより番号付けされる。

このようなポリペプチドは、配列番号2、配列番号4又は配列番号6に記載のプロテアーゼと比較して向上したタンパク質分解活性又は向上したクリーニング活性を有し得る。このようなポリペプチドは、配列番号2、配列番号4又は配列番号6に記載のプロテアーゼのものを超える、タンパク質分解活性（例えば、A A P F アッセイ）又はクリーニングアッセイ（例えば、B M I、植物又は卵の微小標本アッセイ）における性能指数を有し得る。

本発明の第二態様による変異体は、配列番号2の配列を有するB P N ' プロテアーゼのタンパク質分解活性と比較して向上したタンパク質分解活性を有し得る。本発明の第二態様による変異体は、配列番号4又は配列番号6の配列を有するプロテアーゼのタンパク質分解活性と比較して向上したタンパク質分解活性を有し得る。本発明の第二態様による変異体の親プロテアーゼは、スブチリシンプロテアーゼであり得、選択的にスブチリシンプロテアーゼはバチルス種であり得る。本発明の第二態様による変異体の親スブチリシンプロテアーゼは、バチルス・アミロリケファシエンス（*B. amyloliquefaciens*）スブチリシンプロテアーゼB P N '（配列番号2）、バチルス・ステアロサーモフィラス（*B. stearothermophilus*）、枯草菌（*B. subtilis*）、バチルス・リケニホルミス（*B. licheniformis*）、バチルス・レントス（*B. lentus*）、バチルス・ブレビス（*B. brevis*）、バチルス・ステアロサーモフィラス（*B. stearothermophilus*）、バチルス・アルカロフィラス（*B. alkalophilus*）、バチルス・アミロリケファシエンス（*B. amyloliquefaciens*）、バチルス・クラウジイ（*B. clausii*）、バチルス・ハロデュランス（*B. halodurans*）、バチルス・メガテリウム（*B. megaterium*）、バチルス・コアグランス（*B. coagulans*）、バチルス・サーキュランス（*B. circulans*）、バチルス・ロータス（*B. lautus*）、*B. species* T S - 2 3、バチルス・チューリングェンシス（*B. thuringiensis*）、B P N ' - v 3（配列番号4）及びB P N ' - v 3 6（配列番号6）からなる群から選択され得る。本発明の第二態様による親プロテアーゼは、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のアミノ酸配列に対して少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。

本発明の第二態様による変異体は、成熟型を有するプロテアーゼ変異体であり得る。本発明の第二態様による親プロテアーゼは、成熟型を有するプロテアーゼであり得る。

【0122】

本発明の第二態様による変異体は配列番号2、配列番号6又は配列番号4に対して少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。

【0123】

第三態様では、本発明は、プロテアーゼ活性を有する単離された又は非自然発生型ポリペプチドを提供し、上記ポリペプチドは、

a) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128A + Y217Q + A088T + N109G + A116T + G131H + N243V + L257G、

b) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128A + Y217Q + S033T + N076D、

c) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128S + Y217Q + S009T + N109G + K141R + N243V、

d) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128A + Y217Q + S162G + K256R、

e) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128A + Y217Q + N109G + A116T、

f) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128A + Y217Q + N109G + L257G、

g) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128A + Y217Q + S162G + L257G、

h) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128A + Y217Q + N061G + N109G + N243V、

i) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128S + Y217Q + N109G + N243V + S248A、

j) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128S + Y217Q + S033T + N076D + N109G + N218S + N243V + S248N + K256R、

k) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128A + Y217Q + N109G + A116T + N243V + K256R、

l) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128A + Y217Q + A088T + N109G + A116T + G131H + N243V、

m) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128A + Y217Q + A088T + N109G、

n) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128A + Y217Q + N109G + N243V、

o) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128A + Y217Q + T158S + L257G、

p) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128A + Y217Q + N061S + N109G + N243V、

q) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128S + Y217Q + P040A + N109G + N243V + S248N + K256R、

r) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128S + Y217Q + S009T + S018T + Y021N + N109G + K141R、

s) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128A + Y217Q + A088T + N109G + A116T + T158S + N243V + K256R、

t) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128A + Y2

10

20

30

40

50



- 17Q + A088T + N109G + A116T + T158S + N218S + L257G、  
u) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128A + Y2
- 17Q + N109G + K256R、  
v) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128S + Y2
- 17Q + N109G + N243V + K256R、  
w) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128A + Y2
- 17Q + S063G + K256R、  
x) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128A + Y2
- 17Q + S063G + N109G、  
y) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128S + Y2
- 17Q + S063G、  
z) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128A + Y2
- 17Q + S063G + N076D、  
aa) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128S + Y2
- 217Q + S033T + N076D + N218S、  
bb) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128A + Y2
- 217Q + N076D + N218S、及び  
cc) BPN' - S024G + S053G + S078N + S101N + G128A + Y2

10

217Q, からなる群から選択されるポリペプチド配列に対して少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、ここで、この変異体の各アミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置に対応させることにより番号付けされる。本発明の第三態様による変異体は、配列番号2、配列番号4又は配列番号6に記載のプロテアーゼと比較して向上したタンパク質分解活性又は向上したクリーニング活性を有し得る。本発明の第三態様による変異体は、配列番号2、配列番号4又は配列番号6に記載のプロテアーゼのものを超える、タンパク質分解活性(例えば、AAPFアッセイ)又はクリーニングアッセイ(例えば、BMI、植物又は卵の微小標本アッセイ)における性能指数を有し得る。

20

【0124】

本発明の第三態様によるポリペプチドは、上記a)~c)のいずれか又はタンパク質分解活性を有するこれらのいずれかの断片を含み得る、あるいは、これらからなり得る。本発明の第三態様による変異体又は親プロテアーゼは、成熟型であり得る。

30

【0125】

第四態様では、本発明は、(a)配列番号6のポリペプチド配列に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、(b)少なくとも厳密度の高い条件下で(i)配列番号5のポリヌクレオチド配列と、又は(ii)(i)の相補的ポリヌクレオチド配列と、ハイブリッド形成するポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、並びに(c)配列番号5のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、からなる群から選択されるプロテアーゼ活性を有する単離された又は非自然発生型のポリペプチドを提供する。本発明の第四態様によるポリペプチドは、配列番号6のアミノ酸配列又はタンパク質分解活性を有するこれらの断片を含み得る、あるいは、これらからなり得る。本発明の第四態様による変異体は、成熟BPN'(配列番号2)のものと比較して増大したタンパク質分解活性及び/又はクリーニング性能若しくは活性を有し得る。本発明の第四態様による変異体は、配列番号4若しくは配列番号6のものと比較して増大したタンパク質分解活性及び/又はクリーニング性能若しくは活性を有し得る。本発明の第四態様による変異体又は親プロテアーゼは、成熟型であり得る。

40

【0126】

50

第五態様では、本発明は、親プロテアーゼの単離された又は非自然発生型のプロテアーゼ変異体を提供し、ここで、(a)この変異体は親プロテアーゼと比較して25以下、20以下、15以下又は10以下の変異を有するアミノ酸配列を含み、ここで、(i)これらの変異は、挿入、欠失又は置換から独立して選択され、(ii)これらの変異は、位置24及び53におけるグリシンの置換、位置78及び101におけるアスパラギンの置換、位置128におけるアラニン又はセリンの置換、及び位置217におけるグルタミンの置換を包含し、(b)親プロテアーゼは、配列番号2に対して少なくとも90%の配列同一性を有し、(c)配列番号2のアミノ酸配列は、位置番号付けを決定するために使用され、並びに(d)この変異体は、親プロテアーゼと比較してタンパク質分解活性が増大しており、ここで、各アミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置に対応させることにより番号付けされる。本発明の第五態様による変異体のアミノ酸配列は、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の配列同一性を有し得る。

10

## 【0127】

本発明の第五態様による親プロテアーゼは、配列番号2、配列番号4又は配列番号6の配列に対して少なくとも80%、85%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の配列同一性を有し得る。本発明の第五態様による親プロテアーゼは、配列番号2のアミノ酸配列を有するプロテアーゼであり得る。本発明の第五態様による変異体又は親プロテアーゼは、成熟型であり得る。

20

## 【0128】

本発明の第五態様による変異体のアミノ酸配列は、置換N109Gを更に含み得る。本発明の第五態様による変異体のアミノ酸配列は、置換N076Dを更に含み得る。本発明の第五態様による変異体のアミノ酸配列は、置換S033Tを更に含み得る。本発明の第五態様による変異体のアミノ酸配列は、置換N243Vを更に含み得る。本発明の第五態様による変異体のアミノ酸配列は、置換S248Aを更に含み得る。本発明の第五態様による変異体のアミノ酸配列は、置換A088Tを更に含み得る。本発明の第五態様による変異体のアミノ酸配列は、置換S063Gを更に含み得る。

## 【0129】

本発明の第五態様による変異体のアミノ酸配列は、A088T+N109G+A116T+G131H+N243V+L257G, S033T+N076D, S009T+N109G+K141R+N243V, S162G+K256R, N109G+A116T, N109G+L257G, S162G+L257G, N061G+N109G+N243V, N109G+N243V+S248A, S033T+N076D+N109G+N218S+N243V+S248N+K256R, N109G+A116T+N243V+K256R, A088T+N109G+A116T+G131H+N243V, A088T+N109G, N109G+N243V, T158S+L257G, N061S+N109G+N243V, P040A+N109G+N243V+S248N+K256R, S009T+S018T+Y021N+N109G+K141R, A088T+N109G+A116T+T158S+N243V+K256R, A088T+N109G+A116T+T158S+N218S+L257G, N109G+K256R, N109G+N243V+K256R, S063G+K256R, S063G+N109G, S063G, S063G+N076D, S033T+N076D+N218S, 及びN076D+N218Sからなる群から選択されるアミノ酸置換の組を更に含み得る。

30

40

## 【0130】

本発明の第五態様による親プロテアーゼは、スブチリシンプロテアーゼであり得る。本発明の第五態様による親プロテアーゼは、配列番号2に記載のBPN'であり得る。本発明の第五態様による変異体は、配列番号4若しくは配列番号6のものと比較して増大したタンパク質分解活性及び/又はクリーニング性能若しくは活性を有し得る。

## 【0131】

50

第六態様では、本発明は、親プロテアーゼの単離された又は非自然発生プロテアーゼ変異体を提供し、ここで、(a)この変異体は、(i)配列番号2の配列に対して少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%又は97%の同一性を有し、並びに、(ii)位置24及び53におけるグリシンの置換、位置78及び101におけるアスパラギンの置換、位置128におけるアラニン又はセリンの置換、及び位置217におけるグルタミンの置換を含む、アミノ酸配列を含み、(b)親プロテアーゼは、配列番号2に対して少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の配列同一性を有し、(c)この変異体の各アミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置に対応させることにより番号付けされ、並びに(d)この変異体は、親プロテアーゼと比較してタンパク質分解活性が増大している。本発明の第六態様による親プロテアーゼ(protase)は、スブチリシンプロテアーゼであり得る。本発明の第六態様による親プロテアーゼは、配列番号2のアミノ酸配列を有するプロテアーゼであり得る。本発明の第六態様による変異体は、親プロテアーゼのタンパク質分解活性及び/又はクリーニング活性とそれぞれ比較して増大したタンパク質分解活性及び/又はクリーニング活性を有し得る。

10

## 【0132】

本発明の第六態様による変異体のアミノ酸配列は、置換N109Gを更に含み得る。本発明の第六態様による変異体のアミノ酸配列は、置換N076Dを更に含み得る。本発明の第六態様による変異体のアミノ酸配列は、置換S033Tを更に含み得る。本発明の第六態様による変異体のアミノ酸配列は、置換N243Vを更に含み得る。本発明の第六態様による変異体のアミノ酸配列は、置換S248Aを更に含み得る。本発明の第六態様による変異体のアミノ酸配列は、置換A088Tを更に含み得る。本発明の第六態様による変異体のアミノ酸配列は、置換S063Gを更に含み得る。

20

## 【0133】

本発明の第六態様による変異体のアミノ酸配列は、A088T+N109G+A116T+G131H+N243V+L257G, S033T+N076D, S009T+N109G+K141R+N243V, S162G+K256R, N109G+A116T, N109G+L257G, S162G+L257G, N061G+N109G+N243V, N109G+N243V+S248A, S033T+N076D+N109G+N218S+N243V+S248N+K256R, N109G+A116T+N243V+K256R, A088T+N109G+A116T+G131H+N243V, A088T+N109G, N109G+N243V, T158S+L257G, N061S+N109G+N243V, P040A+N109G+N243V+S248N+K256R, S009T+S018T+Y021N+N109G+K141R, A088T+N109G+A116T+T158S+N243V+K256R, A088T+N109G+A116T+T158S+N218S+L257G, N109G+K256R, N109G+N243V+K256R, S063G+K256R, S063G+N109G, S063G, S063G+N076D, S033T+N076D+N218S, 及びN076D+N218Sからなる群から選択されるアミノ酸置換の組を更に含み得る。

30

## 【0134】

本発明の第六態様による変異体は、配列番号2、配列番号4若しくは配列番号6のものと比較して増大したタンパク質分解活性及び/又はクリーニング性能若しくは活性を有し得る。本発明の第六態様による変異体は、配列番号2、配列番号4又は配列番号6に記載のプロテアーゼのものを超える、タンパク質分解活性(例えば、AAPFアッセイ)又はクリーニングアッセイ(例えば、BMI、植物又は卵の微小標本アッセイ)における性能指数を有し得る。本発明の第六態様による変異体又は親プロテアーゼは、成熟型であり得る。

40

## 【0135】

第七態様では、本発明は、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するBPN'スブチリシンプロテアーゼの単離された又は非自然発生型のプロテアーゼ変異体を提供し、上記

50

プロテアーゼは以下のもの：

(a) 配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むプロテアーゼ変異体であって、上記変異体は、配列番号2及び/又は配列番号4のプロテアーゼと比較して増大したタンパク質分解活性及び/又は増大したクリーニング活性を有し、ここで、この変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列に対応させることにより番号付けされ、上記変異体は群(i)~(x)から選択される配列番号2に対する少なくとも1組のアミノ酸置換を含む、プロテアーゼ変異体：

(i) G097A - G128A - P210S - Y217Q - N218A及びG097A - G128A - P210S - Y217Q、

10

(ii) S063T - S078N - G097A - S101A - G128A - S183T - Y217Q - T244N, N061A - S078N - G097A - G128A - Y217Q - S224A, S053G - S078N - G097A - G128A - P129T - Q185T - Y217Q, S063T - S078N - G097A - S101A - G128A - S183T - Y217Q, S063T - S078N - G097A - S101A - G128A - Y217Q, S063T - S078N - G097A - S101A - G128A - Y217Q - T244I, 及びS078N - G097A - G128A - P129T - Y217Q、

(iii) S063T - S078N - G097A - S101A - G128A - S183T - Y217Q, S063T - S078N - G097A - S101A - G128A - S183T - Y217Q - T244N, S063T - S078N - G097A - S101A - G128A - Y217Q, 及びS063T - S078N - G097A - S101A - G128A - Y217Q - T244I、

20

(iv) G097A - I111V - M124V - Y217Q, G097A - I111V - Y167A - Y217Q, S024G - N025G - N061P - G097A - S101N - G128S - Y217Q, S024G - N025G - S053G - N061P - G097A - S101N - G128A - V203Y - Y217Q, S024G - N025G - S053G - T055P - N061P - G097A - S101N - G128S - V203Y - Y217Q, 及びV068A - A092G - Y217Q、

(v) N061P - G097A - S101N - G128A - P210S - Y217Q, S024G - N025G - S053G - N061P - G097A - S101N - G128A - P210S - Y217Q, S024G - N025G - S053G - N061P - G097A - S101N - G128S - Y217Q, S024G - N025G - S053G - N061P - S078N - G097A - S101N - I111V - G128S - Y217Q、

30

(vi) N061P - G097A - G128S - Y217Q, N061P - G097A - S101N - G128A - P210S - Y217Q, N061P - N062Q - G097A - S101N - I111V - Y217Q, S024G - N025G - N061P - G097A - S101N - G128A - P210S - Y217Q, S024G - N025G - S053G - N061P - G097A - S101N - G128A - P210S - Y217Q, S024G - N025G - S053G - N061P - G097A - S101N - G128S - Y217Q, 及びS024G - N025G - S053G - N061P - S078N - G097A - S101N - I111V - G128S - Y217Q、

40

(vii) N061P - G097A - S101N - G128A - P210S - Y217Q, S024G - N025G - S053G - T055P - N061P - G097A - S101N - G128A - Y217Q, N025G - G097A - S101N - G128A - Y217Q, N025G - S038G - S053G - N061P - S078N - G097A - S101N - G128A - Y217Q, N025G - S053G - N061P - S078N - G128A - Y217Q, N025G - S053G - N061P - S078N - S101N - G128A - Y217Q, N025G - S053G - T055P - N06

50





Q, S024G - N025G - N061P - G097A - G128A - Y217Q, S024G - N061P - S078N - G097A - S101N - G128A - Y217Q, S024G - S053G - T055P - N061P - S078N - G097A - G128A - Y217Q, S024G - S053G - S078N - S101N - G128A - Y217Q, S024G - N025G - S053G - T055P - N061P - S078N - G097A - G128A - Y217Q, S053G - N061P - S078N - G097A - G128A - Y217Q, S024G - T055P - N061P - G097A - G128A - Y217Q, S024G - S038G - S053G - S078N - S101N - G128A - Y217Q, S053G - G097A - S101N - G128A - Y217Q, N025G - T055P - G097A - G128A - Y217Q, S024G - T055P - S078N - G097A - S101N - G128A - Y217Q, S053G - S078N - G097A - S101N - G128A - Y217Q, S024G - N025G - T055P - G097A - G128A - Y217Q, S024G - N025G - S053G - T055P - G097A - G128A - Y217Q, N025G - S078N - G097A - S101N - G128A - Y217Q, N025G - G097A - S101N - G128A - Y217Q, S024G - S053G - N061P - S078N - G097A - G128A - Y217Q, S024G - S053G - S078N - G097A - S101N - G128A - Y217Q, N025G - S078N - G097A - G128A - Y217Q, 及び S024G - N025G - S053G - N061P - G097A - G128A - S130G - Y217Q、並びに

10

20

(b) 配列番号6のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むプロテアーゼ変異体であって、上記変異体は、配列番号2、配列番号4及び/又は配列番号6のプロテアーゼと比較して増大したタンパク質分解活性及び/又は増大したクリーニング活性を有し、ここで、この変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列に対応させることにより番号付けされ、上記変異体は群(i)~(xv)から選択される配列番号6に対する少なくとも1組のアミノ酸置換を含む、プロテアーゼ変異体:

(i) A116V, G160S, I111L, I115V, N109S, N117M, P005G, Q059V, T164S, Y262M, A015Q, A015S, A098E, A098N, A098S, A098T, A098V, A098Y, A114S, A114T, A116G, A116L, A116S, A116T, A116W, A133G, A133H, A133T, A133V, A137G, A137I, A137L, A137S, A137T, A138S, A216E, A216F, A216V, D099S, D181E, F261A, F261Q, G024F, G024I, G024Q, G024Y, G097S, G160T, G211L, G211V, H017F, H017W, H039V, H226A, I031V, I111V, I268V, K170R, K265R, L016Q, L016T, L135M, L209T, L209V, L233M, L257T, L257V, L267A, L267V, N025A, N025I, N025Q, N025R, N025T, N025V, N101I, N101Q, N101S, N109A, N109G, N109H, N109L, N109M, N109Q, N109T, N117Q, N184A, N184L, N184T, N184W, N212G, N212L, N212V, N243P, N252G, N252M, P005T, P014S, P040G, P040L, P040Q, P129A, P129S, P172G, P172S, P194Q, P210A, P210S, Q185F, Q185G, Q185I, Q185M, Q185N, Q185S, Q275H, R186K, S009A, S009G, S009H, S009M, S018T, S130T, S132N, S145K, S159T, S161I, S161K, S161N, S161T, S162I, S162M, S162Y, S163G, S182F, S182G, S182V, S182W, S183F, S183L, S183M, S183T, S183V, S183W, S224A, S236T, S249V, T022A, T022G, T022Q, T022V, T208V, T242S, T25

30

40

50

3 N , T 2 5 3 S , T 2 5 4 A , T 2 5 4 S , T 2 5 5 L , T 2 5 5 S , T 2 5 5 V , V  
 0 0 4 A , V 0 0 4 P , V 0 0 4 W , V 0 8 4 C , V 1 3 9 C , V 1 6 5 M , V 2 0 3 F  
 , Y 0 2 1 K , Y 0 2 1 N , Y 0 2 1 T , Y 0 2 1 V , Y 1 6 7 F , Y 1 7 1 F , Y 2 1  
 4 F , Y 2 6 2 F , 及び Y 2 6 2 T からなる群から選択される配列番号 6 に対する少なく  
 とも 1 つの置換、

( i i ) A 2 1 6 E , L 0 9 0 I , A 0 9 8 R , A 0 9 8 W , A 0 9 8 Y , A 1 1 6  
 G , A 1 1 6 R , A 1 1 6 S , A 1 3 3 M , I 1 0 7 L , I 1 1 5 V , M 1 2 4 L , N 1  
 0 1 I , N 1 0 9 H , N 1 0 9 S , N 1 0 9 T , N 1 1 7 R , P 0 0 5 G , Q 1 8 5 L ,  
 S 0 8 9 V , V 0 9 5 A , A 0 1 5 Y , A 0 2 9 G , A 0 9 8 D , A 0 9 8 E , A 0 9 8  
 G , A 0 9 8 N , A 0 9 8 S , A 0 9 8 T , A 0 9 8 V , A 1 1 4 S , A 1 1 4 T , A 1  
 1 6 E , A 1 1 6 L , A 1 1 6 T , A 1 1 6 V , A 1 3 3 H , A 1 3 3 L , A 1 3 3 S ,  
 A 1 3 7 G , A 1 3 7 I , A 1 3 7 L , A 1 3 7 S , A 1 3 7 V , A 1 3 8 S , A 1 4 4  
 S , A 1 4 4 V , A 1 7 6 S , A 1 7 6 T , A 1 8 7 T , A 2 1 6 F , A 2 1 6 P , A 2  
 1 6 Q , A 2 1 6 R , A 2 1 6 S , A 2 1 6 T , A 2 1 6 V , A 2 1 6 Y , D 0 4 1 E ,  
 D 1 2 0 A , D 1 2 0 E , D 1 2 0 Q , D 1 2 0 R , D 1 2 0 S , D 1 8 1 S , G 0 2 0  
 A , G 0 2 0 S , G 0 2 4 A , G 0 9 7 A , G 0 9 7 D , G 0 9 7 S , G 1 3 1 Q , G 1  
 6 0 S , G 1 6 6 I , G 2 1 1 L , G 2 1 5 N , H 0 3 9 N , H 2 3 8 N , I 1 1 1 L ,  
 I 1 1 1 V , I 1 2 2 A , L 0 7 5 I , L 0 7 5 Q , L 1 3 5 M , L 2 0 9 T , L 2 0 9  
 V , L 2 3 3 V , L 2 3 5 M , L 2 3 5 R , L 2 5 7 A , M 1 1 9 I , N 0 2 5 A , N 0  
 2 5 G , N 0 2 5 T , N 0 6 1 K , N 1 0 1 F , N 1 0 1 H , N 1 0 1 L , N 1 0 1 Q ,  
 N 1 0 1 R , N 1 0 1 S , N 1 0 1 T , N 1 0 9 A , N 1 0 9 G , N 1 0 9 K , N 1 0 9  
 L , N 1 1 7 E , N 1 1 7 H , N 1 1 7 K , N 1 1 7 S , N 2 1 2 G , N 2 1 2 S , N 2  
 1 8 F , N 2 1 8 G , N 2 1 8 H , N 2 1 8 L , N 2 1 8 S , N 2 1 8 W , N 2 4 0 Q ,  
 N 2 5 2 M , N 2 5 2 R , N 2 5 2 S , P 0 0 5 T , P 0 4 0 A , P 0 4 0 G , P 0 4 0  
 T , P 1 2 9 D , P 1 2 9 S , P 1 9 4 S , P 2 1 0 R , Q 0 1 9 R , Q 0 1 9 W , Q 1  
 0 3 L , Q 1 0 3 W , Q 1 8 5 A , Q 1 8 5 G , Q 1 8 5 M , Q 1 8 5 R , Q 1 8 5 T ,  
 Q 2 0 6 G , Q 2 0 6 Y , Q 2 1 7 A , Q 2 1 7 E , Q 2 1 7 R , Q 2 1 7 S , Q 2 1 7  
 T , S 0 0 3 Q , S 0 0 9 H , S 0 1 8 M , S 0 3 3 T , S 1 3 0 A , S 1 3 0 F , S 1  
 3 0 G , S 1 3 0 T , S 1 3 0 V , S 1 4 5 T , S 1 5 9 A , S 1 6 1 N , S 1 6 1 T ,  
 S 1 6 2 V , S 1 6 2 Y , S 1 8 2 L , S 1 8 2 W , S 1 8 3 F , S 1 8 3 L , S 1 8 3  
 V , S 1 8 3 W , S 1 8 8 K , S 1 8 8 W , S 2 3 6 Q , S 2 3 6 T , S 2 4 8 L , T 0  
 2 2 H , T 0 2 2 K , T 2 0 8 C , T 2 5 3 H , T 2 5 5 V , V 0 4 4 I , V 1 2 1 I ,  
 V 1 3 9 C , V 1 4 3 H , V 1 4 3 Q , V 1 4 3 T , V 1 4 3 W , V 1 4 3 Y , Y 0 0 6  
 K , Y 0 2 1 A , Y 1 0 4 W , A 0 0 1 F , A 0 0 1 G , A 0 0 1 H , A 0 0 1 K , A 0  
 0 1 L , A 0 0 1 Q , A 0 0 1 S , A 0 0 1 Y , A 0 1 3 V , A 0 1 5 G , A 0 1 5 K ,  
 A 0 1 5 R , A 0 1 5 S , A 0 1 5 T , A 0 1 5 W , A 0 4 8 S , A 0 7 3 N , A 0 7 3  
 S , A 0 9 2 S , A 0 9 8 K , A 0 9 8 P , A 1 1 6 D , A 1 1 6 W , A 1 2 8 S , A 1  
 3 3 P , A 1 3 3 T , A 1 3 3 V , A 1 3 4 G , A 1 3 4 S , A 1 3 7 H , A 1 3 7 N ,  
 A 1 3 7 T , A 1 4 4 D , A 1 4 4 K , A 1 4 4 L , A 1 4 4 M , A 1 4 4 N , A 1 4 4  
 R , A 1 7 9 G , A 1 7 9 S , A 1 8 7 V , A 2 1 6 G , A 2 1 6 L , A 2 1 6 W , A 2  
 2 3 S , A 2 3 0 C , A 2 7 2 K , A 2 7 2 L , A 2 7 2 P , A 2 7 2 S , A 2 7 2 T ,  
 A 2 7 2 W , A 2 7 3 G , A 2 7 3 S , A 2 7 4 G , A 2 7 4 M , A 2 7 4 T , D 1 2 0  
 K , D 1 4 0 E , D 1 8 1 A , D 1 8 1 E , D 1 8 1 G , D 1 8 1 H , D 1 8 1 T , D 2  
 5 9 E , D 2 5 9 N , D 2 5 9 Q , E 0 5 4 D , E 1 5 6 D , E 1 5 6 T , E 2 5 1 L ,  
 E 2 5 1 T , E 2 5 1 V , F 0 5 8 Y , F 1 8 9 W , F 2 6 1 K , F 2 6 1 Q , F 2 6 1  
 R , G 0 0 7 A , G 0 0 7 S , G 0 2 0 F , G 0 2 0 H , G 0 2 0 N , G 0 2 0 Q , G 0  
 2 0 T , G 0 2 0 Y , G 0 2 4 F , G 0 2 4 Q , G 0 2 4 R , G 0 2 4 T , G 0 2 4 V ,  
 G 0 2 4 W , G 0 2 4 Y , G 0 5 3 T , G 0 9 7 K , G 0 9 7 M , G 0 9 7 R , G 0 9 7  
 T , G 1 3 1 A , G 1 3 1 H , G 1 3 1 P , G 1 3 1 R , G 1 3 1 T , G 1 3 1 V , G 1  
 6 0 H , G 1 6 0 T , G 1 6 6 C , G 1 6 6 Q , G 1 6 6 S , G 1 6 6 T , G 2 1 1 A ,

10

20

30

40

50



G 2 1 1 D , G 2 1 1 K , G 2 1 1 M , G 2 1 1 N , G 2 1 1 Q , G 2 1 1 R , G 2 1 1 V , G 2 1 1 W , G 2 1 5 S , G 2 1 5 T , G 2 1 5 W , H 0 1 7 T , H 0 1 7 W , H 0 1 7 Y , H 0 3 9 V , H 2 2 6 A , H 2 2 6 F , H 2 2 6 I , H 2 2 6 L , H 2 2 6 M , H 2 2 6 V , I 0 3 5 V , I 0 7 9 A , I 0 7 9 S , I 1 0 8 V , I 2 0 5 V , I 2 3 4 L , I 2 3 4 V , I 2 6 8 V , K 0 1 2 S , K 0 4 3 P , K 1 3 6 H , K 1 3 6 R , K 1 4 1 A , K 1 4 1 F , K 1 4 1 T , K 1 4 1 W , K 1 7 0 A , K 1 7 0 G , K 1 7 0 R , K 2 1 3 A , K 2 1 3 R , K 2 1 3 S , K 2 3 7 A , K 2 3 7 H , K 2 3 7 L , K 2 3 7 S , K 2 3 7 V , K 2 5 6 A , K 2 5 6 G , K 2 5 6 H , K 2 5 6 M , K 2 5 6 P , K 2 5 6 Q , K 2 5 6 R , L 0 1 6 A , L 0 1 6 Q , L 0 1 6 T , L 0 1 6 V , L 0 4 2 V , L 0 7 5 M , L 0 7 5 T , L 0 8 2 M , L 0 8 2 V , L 1 3 5 F , L 1 9 6 I , L 2 0 9 H , L 2 0 9 Q , L 2 0 9 R , L 2 0 9 S , L 2 0 9 W , L 2 3 3 A , L 2 3 3 M , L 2 3 3 Q , L 2 3 5 I , L 2 3 5 K , L 2 5 0 I , L 2 5 7 S , L 2 5 7 T , L 2 5 7 V , L 2 6 7 A , L 2 6 7 Q , L 2 6 7 T , L 2 6 7 V , M 1 1 9 C , M 1 9 9 V , N 0 2 5 C , N 0 2 5 E , N 0 2 5 F , N 0 2 5 I , N 0 2 5 K , N 0 2 5 L , N 0 2 5 M , N 0 2 5 Q , N 0 2 5 V , N 0 2 5 Y , N 0 6 1 F , N 0 6 1 P , N 0 6 1 S , N 0 6 1 T , N 0 7 6 G , N 0 7 8 S , N 1 0 1 A , N 1 0 9 M , N 1 0 9 Q , N 1 0 9 R , N 1 1 7 A , N 1 1 7 M , N 1 1 7 Q , N 1 1 8 D , N 1 1 8 G , N 1 1 8 H , N 1 1 8 Q , N 1 1 8 R , N 1 1 8 S , N 1 8 4 A , N 1 8 4 C , N 1 8 4 G , N 1 8 4 L , N 1 8 4 R , N 1 8 4 S , N 1 8 4 T , N 1 8 4 V , N 1 8 4 W , N 2 1 2 C , N 2 1 2 F , N 2 1 2 I , N 2 1 2 K , N 2 1 2 L , N 2 1 2 P , N 2 1 2 Q , N 2 1 2 R , N 2 1 2 V , N 2 1 2 W , N 2 1 2 Y , N 2 1 8 A , N 2 1 8 P , N 2 1 8 T , N 2 4 0 A , N 2 4 0 E , N 2 4 0 G , N 2 4 0 H , N 2 4 0 L , N 2 4 0 R , N 2 4 0 S , N 2 4 0 T , N 2 4 3 C , N 2 4 3 Q , N 2 4 3 T , N 2 4 3 V , N 2 5 2 A , N 2 5 2 G , N 2 5 2 K , N 2 5 2 Q , P 0 1 4 G , P 0 1 4 Q , P 0 1 4 R , P 0 1 4 S , P 0 1 4 T , P 0 4 0 F , P 0 4 0 L , P 0 4 0 Q , P 0 4 0 S , P 0 4 0 V , P 0 8 6 C , P 0 8 6 H , P 0 8 6 S , P 1 2 9 A , P 1 2 9 E , P 1 2 9 G , P 1 2 9 K , P 1 2 9 R , P 1 7 2 A , P 1 7 2 K , P 1 7 2 Q , P 1 7 2 S , P 1 9 4 A , P 1 9 4 G , P 1 9 4 H , P 1 9 4 L , P 1 9 4 M , P 1 9 4 Q , P 1 9 4 R , P 1 9 4 V , P 1 9 4 W , P 1 9 4 Y , P 2 1 0 A , P 2 1 0 G , P 2 1 0 L , P 2 1 0 S , P 2 3 9 K , P 2 3 9 R , Q 0 0 2 A , Q 0 0 2 S , Q 0 1 0 A , Q 0 1 0 N , Q 0 1 0 R , Q 0 1 0 T , Q 0 1 9 A , Q 0 1 9 C , Q 0 1 9 D , Q 0 1 9 G , Q 0 1 9 S , Q 0 1 9 T , Q 0 1 9 V , Q 0 5 9 I , Q 0 5 9 V , Q 1 0 3 S , Q 1 8 5 F , Q 1 8 5 H , Q 1 8 5 I , Q 1 8 5 K , Q 1 8 5 N , Q 1 8 5 S , Q 1 8 5 Y , Q 2 0 6 H , Q 2 0 6 L , Q 2 0 6 P , Q 2 0 6 W , Q 2 1 7 F , Q 2 1 7 H , Q 2 1 7 I , Q 2 1 7 K , Q 2 1 7 L , Q 2 1 7 N , Q 2 1 7 V , Q 2 7 1 G , Q 2 7 1 R , Q 2 7 1 T , Q 2 7 5 F , Q 2 7 5 P , Q 2 7 5 R , R 1 8 6 A , R 1 8 6 I , R 1 8 6 K , S 0 0 3 A , S 0 0 3 F , S 0 0 3 G , S 0 0 3 H , S 0 0 3 K , S 0 0 3 R , S 0 0 3 T , S 0 0 9 T , S 0 1 8 N , S 0 1 8 T , S 0 3 7 G , S 0 3 7 T , S 0 3 7 V , S 0 3 8 G , S 0 3 8 Q , S 0 6 3 N , S 0 6 3 Q , S 0 6 3 T , S 0 8 9 M , S 0 8 9 N , S 1 3 0 K , S 1 3 0 L , S 1 3 0 R , S 1 3 0 W , S 1 3 2 N , S 1 4 5 G , S 1 4 5 K , S 1 4 5 M , S 1 4 5 R , S 1 4 5 V , S 1 5 9 C , S 1 5 9 H , S 1 5 9 L , S 1 5 9 Q , S 1 5 9 R , S 1 5 9 T , S 1 5 9 W , S 1 6 1 A , S 1 6 1 C , S 1 6 1 G , S 1 6 1 H , S 1 6 1 I , S 1 6 1 K , S 1 6 1 P , S 1 6 1 Q , S 1 6 1 R , S 1 6 2 F , S 1 6 2 G , S 1 6 2 I , S 1 6 2 L , S 1 6 2 M , S 1 6 2 N , S 1 6 2 P , S 1 6 2 R , S 1 6 3 G , S 1 7 3 A , S 1 7 3 G , S 1 8 2 F , S 1 8 2 G , S 1 8 2 K , S 1 8 2 N , S 1 8 2 Q , S 1 8 2 V , S 1 8 3 A , S 1 8 3 M , S 1 8 3 Q , S 1 8 3 R , S 1 8 3 T , S 1 8 8 A , S 1 8 8 F , S 1 8 8 G , S 1 8 8 P , S 1 8 8 R , S 1 8 8 T , S 1 8 8 V , S 1 9 0 C , S 2 0 4 A , S 2 0 4 G , S 2 0 4 I , S 2 0 4 L , S 2 0 4 Q , S 2 0 4 R , S 2 0 4 V , S 2 0 7 G , S 2 2 4 A , S 2 2 4 T , S 2 3 6 C , S 2 3 6 D , S 2 3 6 E , S 2 3 6 G , S 2 3 6 N , S 2 4 8 A , S 2 4 8 F , S 2 4 8 K , S 2 4 8 M , S 2 4 8 T , S 2 4 9 A , S 2 4 9 R , S 2

10

20

30

40

50

49T, S249V, S249W, S249Y, S260G, S260H, S260K, S260N, T022A, T022G, T022Q, T022S, T022V, T022Y, T055A, T055K, T158A, T158S, T208L, T208S, T208V, T220S, T242D, T242N, T242S, T244E, T244G, T244I, T244R, T244V, T244W, T253A, T253G, T253N, T253S, T254S, T254V, T255H, T255I, T255K, T255L, T255Q, T255R, T255S, T255Y, V004A, V004N, V004P, V004W, V008A, V008M, V026I, V045S, V045W, V051I, V081Q, V081T, V084C, V093I, V095C, V143A, V143E, V143F, V143N, V143S, V147I, V147L, V147S, V147T, V148I, V149C, V149I, V165M, V180A, V180C, V180I, V180L, V180T, V192A, V192C, V192I, V192S, V192T, V192Y, V198L, V203A, V203F, V203K, V203L, V203M, V203N, V203Y, W241Y, Y006A, Y006G, Y006H, Y006L, Y006N, Y006P, Y006Q, Y006T, Y021E, Y021K, Y021L, Y021N, Y021Q, Y021R, Y021S, Y021T, Y104F, Y104I, Y104V, Y171F, Y214F, Y214L, Y214W, Y262F, 及びY262Sからなる群から選択される配列番号6に対する少なくとも1つの置換、

10

(iii) A088T - L257G, A116T - A128S, N061S - N109G - A128S - N243V - S260P, S009T - N109G - A128S - K141R - N243V, S009T - S018T - Y021N - N109G - A128S - K141R, 及びS162G - K256Rからなる群から選択される配列番号6に対する少なくとも1組のアミノ酸置換、

20

(iv) A116T, A088T - N243V, G024E - A116T, K043Y, N076D - A116T, N218S - S248N, S033T - N243V, S033T - S063G, S248N - L257G, A001E - S249A, A088T - A116T, A088T - A128S, A088T - G131H, A088T - L257G, A088T - N109G, A088T - S248N, A088T - S249A, A116T - N243V, A116T - T158S, A128S, A128S - K256R, A128S - L257G, A128S - N243V, A128S - S248N, A128S - T158S, G024E - A088T, G024E - A128S, G024E - G131H, G024E - K256R, G024E - L257G, G024E - N218S, G024E - N243V, G024E - S162G, G024E - S249A, G024E - T158S, G131H, G131H - K256R, G131H - S249A, K043Y - A088T, K043Y - A116T, K256R, N076D - K256R, N109G, N109G - A116T, N109G - A128S, N109G - A128S - N243V - K256R, N109G - A128S - N243V - S248A, N109G - G131H, N109G - K256R, N109G - L257G, N109G - N218S, N109G - N243V, N109G - S248N, N218S - L257G, N243V, N243V - K256R, N243V - L257G, N243V - S248N, N243V - S249A, Q103H - A128S, Q103H - G131H, Q103H - K256R, Q103H - L257G, Q103H - N243V, Q103H - S248N, Q103H - S249A, Q103H - T158S, Q206D - N243V, S033T - A128S, S033T - K256R, S033T - N076D, S033T - N218S, S033T - S248N, S033T - T158S, S063G - A128S, S063G - K256R, S063G - N243V, S063G - S162G, S063G - T158S, S162G - K256R, S248N - K256R, S249A, T158S - N243V, 及びT158S - S249Aからなる群から選択される配列番号6に対する少なくとも1組のアミノ酸置換、

30

40

50

(v) A088T - L257G, G024E - K256R, G024E - L257G, N109G - A116T, N109G - L257G, N243V - K256R, S033T - N109G, S033T - T158S, S063G - L257G, A001E - L257G, A088T - A128S, A088T - G169A, A088T - K256R, A088T - N109G, A088T - N218S, A088T - N243V, A088T - S248N, A088T - T158S, A116T, A116T - A128S, A116T - G131H, A116T - K256R, A116T - L257G, A116T - N218S, A116T - S162G, A116T - T158S, A128S, A128S - G169A, A128S - K256R, A128S - L257G, A128S - N218S, G024E, G024E - A128S, G024E - G131H, G024E - N109G, G024E - N243V, G024E - S033T, G024E - S063G, G024E - S248N, G024E - S249A, G024E - T158S, G131H, G131H - G169A, G131H - K256R, G131H - N218S, G131H - S249A, G169A, G169A - L257G, G169A - N243V, K043Y - A088T, K043Y - N109G, K256R, K256R - L257G, N061G - N109G - N243V, N076D - N109G, N109G, N109G - A128S, N109G - G131H, N109G - K256R, N109G - N218S, N109G - S162G, N109G - S248N, N109G - S249A, N109G - T158S, N218S, N218S - K256R, N218S - L257G, N218S - S248N, N243V, N243V - L257G, N243V - S248N, N243V - S249A, P040A - N109G - A128S - N243V - S248N - K256R, Q103H - K256R, Q103H - L257G, Q103H - N109G, S009T - S018T - Y021N - N109G - A128S - K141R, S033T - A088T, S033T - A116T, S033T - A128S, S033T - G131H, S033T - K043Y, S033T - K256R, S033T - L257G, S033T - N076D, S033T - N218S, S033T - N243V, S033T - Q103H, S033T - S063G, S033T - S162G, S033T - S248N, S033T - S249A, S063G, S063G - A088T, S063G - A116T, S063G - A128S, S063G - G131H, S063G - K256R, S063G - N109G, S063G - N218S, S063G - N243V, S063G - S248N, S063G - S249A, S063G - T158S, S162G - K256R, S162G - N218S, S162G - N243V, S162G - S248N, S162G - S249A, S248N, S249A, S249A - L257G, T158S, T158S - L257G, 及びT158S - N243Vからなる群から選択される配列番号6に対する少なくとも1組のアミノ酸置換、

(vi) T158S - L257G, K256R, L257G, S033T - N109G, S162G - K256R, S162G - L257G, G024E - K256R, G024E - L257G, G024E - S033T, N109G - A116T, N218S - L257G, S033T - A088T, S033T - A116T, S033T - N243V, S033T - Q103H, S162G - N218S, S162G - N243V, T158S, T158S - N218S, T158S - N243V, A088T, A088T - G169A, A088T - K256R, A088T - L257G, A088T - S162G, A088T - T158S, A116T - K256R, A116T - L257G, A116T - N243V, A128S - L257G, A128S - N218S, A128S - N243V, A128S - S248N, G024E - A116T, G024E - A128S, G024E - G131H, G024E - N243V, G024E - S248N, G024E - S249A, G024E - T158S, G131H - N243V, G131H - T158S, G169A - N218S, G169A - N243V, G169A - S248N, K256R - L257G, N109G - A128S, N109G - G131H, N109G - N218S, N109G - N243V, N109G - S249A, N218S, N

2 1 8 S - K 2 5 6 R , N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , N 2 1 8 S - S 2 4 9 A , N 2 4 3 V  
 , N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , Q 1 0  
 3 H - N 1 0 9 G , Q 1 0 3 H - N 2 1 8 S , S 0 3 3 T - A 1 2 8 S , S 0 3 3 T - L  
 2 5 7 G , S 0 3 3 T - N 2 1 8 S , S 0 3 3 T - S 1 6 2 G , S 0 3 3 T - S 2 4 8 N  
 , S 0 3 3 T - T 1 5 8 S , S 0 6 3 G - K 2 5 6 R , S 0 6 3 G - L 2 5 7 G , S 1 6  
 2 G , S 1 6 2 G - G 1 6 9 A , S 1 6 2 G - S 2 4 8 N , S 2 4 8 N , S 2 4 8 N - K  
 2 5 6 R , S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , S 2 4 9 A , T 1 5 8 S - S 1 6 2 G , 及び T 1 5  
 8 S - S 2 4 8 N からなる群から選択される配列番号 6 に対する少なくとも 1 組のアミノ  
 酸置換、

( v i i ) S 0 3 3 T - N 0 7 6 D - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S , A 0 0 1 E - S 0 3 3 10  
 T - N 1 0 9 G - N 2 1 8 S , S 0 3 3 T - N 2 1 8 S , S 0 3 3 T - S 0 6 3 G - Q 1  
 0 3 H - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - G 1 6 9 A - N 2 4 3 V , A 1 2 8 S -  
 G 1 6 9 A , S 0 3 3 T - S 0 6 3 G - Q 1 0 3 H - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1  
 H - G 1 6 9 A - N 2 4 3 P , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1  
 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H -  
 N 2 4 3 P , P 0 4 0 E - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H , S 0 3 3 T - A 1 2 8  
 S , S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1  
 0 9 G - G 1 6 9 A , S 0 6 3 G - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H , G 1 6 9 A ,  
 N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 0 3 3  
 T - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V , A 1 2 8 S - N 2 1 8 S , A 0 0 1 E - G 1 20  
 6 9 A , A 0 8 8 T - G 1 6 9 A , G 1 6 9 A - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - N 2 1 8 S ,  
 S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 P - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , G 1 6 9  
 A - K 2 5 6 R , N 0 7 6 D - G 1 6 9 A , A 0 0 1 E - G 1 3 1 H - G 1 6 9 A - N 2  
 4 3 V , G 1 6 9 A - S 2 4 9 A , S 0 3 3 T - N 1 0 9 G , G 1 6 9 A - S 2 4 8 N ,  
 K 0 4 3 Y - G 1 6 9 A , K 0 4 3 Y - N 2 1 8 S , N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , N 2 1 8  
 S - N 2 4 3 V , S 0 6 3 G - G 1 6 9 A , A 0 0 1 E - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - N 2  
 4 3 V , A 0 0 1 E - S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S ,  
 G 0 2 4 E - N 2 1 8 S , G 0 2 4 E - S 0 3 3 T , G 1 6 9 A - Q 2 0 6 D , N 0 7 6  
 D - N 2 1 8 S , S 0 3 3 T - L 2 5 7 G , S 1 6 2 G - G 1 6 9 A , A 0 0 1 E - N 2  
 1 8 S , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S , G 1 6 9 A - N 2 4 3 V , N 2 1 8 S , P 0 4 0 A - 30  
 N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T - N 0 7 6  
 D , A 0 0 1 E - S 0 3 3 T , A 1 2 8 S - G 1 3 1 H , N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , S 0  
 1 8 T - Y 0 2 1 N - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S , S 0 3 3 T - K 0 4 3 Y , S 0 3 3 T -  
 N 2 4 3 V , S 0 3 3 T - Q 2 0 6 D , S 0 6 3 G - N 2 1 8 S , S 1 6 2 G - N 2 1 8  
 S , T 1 5 8 S - G 1 6 9 A , A 1 1 6 T - G 1 6 9 A , G 1 3 1 H - G 1 6 9 A , N 0  
 6 1 S - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 6 0 P , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V -  
 K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 A , N 1 0 9 G - A 1 2 8  
 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 A - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2  
 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , S 0 0 9 T - N 1 0 9 G -  
 A 1 2 8 S - K 1 4 1 R , S 0 0 9 T - S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - N 1 0 9 G - A 1 2 8 40  
 S - K 1 4 1 R , S 0 3 3 T - A 0 8 8 T , S 0 3 3 T - S 0 6 3 G , S 0 3 3 T - S 1  
 6 2 G , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , A 0 0 1 E - N 0 7 6 D - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S ,  
 N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 2 8  
 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 0 0 9 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - K 1 4 1 R - N 2  
 4 3 V , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - N 0 6 1 S - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 6 0 P ,  
 S 0 3 3 T - A 1 1 6 T , S 0 3 3 T - S 2 4 8 N , S 0 3 3 T - S 2 4 9 A , S 0 3 3  
 T - T 1 5 8 S , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S , N 1 0 9 A - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - K 2  
 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 1 6 2 G - N 2 4 3 V -  
 S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8  
 N - K 2 5 6 R , N 2 1 8 S - S 2 4 9 A , Q 2 0 6 D - N 2 1 8 S , S 0 1 8 T - Y 0 50

2 1 N - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - N 1 0 9 G -  
A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T - K 2 5 6 R , A 1 1 6  
T - A 1 2 8 S , N 0 6 1 S - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 6 0 P , N 1  
0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , S 0 0 9 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S -  
K 1 4 1 R - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , G 0 2 4 E - A 1 2 8 S , N 0 6 1  
S - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - S 2 6 0 P , N 1  
0 9 S - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T , S 0 3 3 T - G 1 3 1 H ,  
A 0 0 1 E - A 1 2 8 S , A 1 2 8 S , A 1 2 8 S - L 2 5 7 G , A 1 2 8 S - Q 2 0 6  
D , N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , S 0 0 9 T - A 1 2 8 S - K 1  
4 1 R - N 2 4 3 V , S 0 0 9 T - S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - A 1 2 8 S - K 1 4 1 R -  
N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - A 1 2 8 S , A 1 2 8 S - K 2 5 6 R , A 1 2 8 S - N 2 4 3  
V , N 0 6 1 P - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V , N 0 6 1 S - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2  
6 0 P , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V , A 1 2 8 S - N 2 4 3 V -  
S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 2 8 S - S 2 4 8 N , A 1 2 8 S - S 2 4 9 A , N 0 7 6  
D - A 1 2 8 S , S 0 6 3 G - A 1 2 8 S , A 1 2 8 S - S 1 6 2 G , A 1 2 8 S - T 1  
5 8 S , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - N 0 6 1 S - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 6 0 P ,  
S 0 3 3 T - Q 1 0 3 H - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H , N 0 6 1 S - N 1 0 9 G - N 2 4 3  
V , K 0 4 3 Y - A 1 2 8 S , N 0 6 1 P - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V , N 1  
0 9 G - L 2 5 7 G , A 0 0 1 E - G 0 2 4 E - S 2 0 4 E - Q 2 0 6 D , A 0 0 1 E -  
L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G , G 0 2 4 E - N 1 0 9 G , K 0 4 3 Y - N 1 0 9  
G , N 0 6 1 G - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V , N 0 7 6 D - N 1 0 9 G , N 1 0 9 G , N 1  
0 9 G - A 1 1 6 T , N 1 0 9 G - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R ,  
N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 A - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - Q 2 0 6 D , S 0 6 3  
G - N 1 0 9 G , A 0 0 1 E - A 1 1 6 T , A 0 0 1 E - N 1 0 9 G , A 0 0 1 E - Q 2  
0 6 D , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T , A 0 8 8 T - N 2 4 3 V , A 1 1 6 T - L 2 5 7 G ,  
G 0 2 4 E - A 1 1 6 T , G 0 2 4 E - L 2 5 7 G , G 0 2 4 E - N 2 4 3 V , G 0 2 4  
E - Q 2 0 6 D , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H , N 1 0 9 G - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - S 1  
6 2 G , N 1 0 9 G - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G -  
S 2 4 9 A , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S , N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 0 1 E - A 0 8 8  
T , A 0 0 1 E - G 0 2 4 E , A 0 0 1 E - K 2 5 6 R , A 0 0 1 E - N 0 7 6 D , A 0  
0 1 E - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T , A 0 8 8 T - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - Q 2 0 6 D ,  
A 1 1 6 T , A 1 1 6 T - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - N 2 4 3 V , G 0 2 4 E - A 0 8 8  
T , G 0 2 4 E - K 0 4 3 Y , G 0 2 4 E - K 2 5 6 R , G 0 2 4 E - N 0 7 6 D , G 0  
2 4 E - S 1 6 2 G , G 0 2 4 E - S 2 4 8 N , K 0 4 3 Y - A 0 8 8 T , K 0 4 3 Y -  
A 1 1 6 T , K 0 4 3 Y - L 2 5 7 G , K 0 4 3 Y - N 2 4 3 V , K 0 4 3 Y - Q 2 0 6  
D , K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 0 7 6 D - A 1 1 6 T , N 0 7 6 D - L 2 5 7 G , N 0  
7 6 D - N 2 4 3 V , N 0 7 6 D - Q 2 0 6 D , N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N ,  
N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , Q 2 0 6  
D , Q 2 0 6 D - L 2 5 7 G , Q 2 0 6 D - N 2 4 3 V , Q 2 0 6 D - S 2 4 8 N , S 0  
6 3 G - K 2 5 6 R , S 0 6 3 G - L 2 5 7 G , T 1 5 8 S - L 2 5 7 G , A 0 0 1 E ,  
A 0 0 1 E - K 0 4 3 Y , A 0 0 1 E - S 1 6 2 G , A 0 0 1 E - S 2 4 8 N , A 0 0 1  
E - S 2 4 9 A , A 0 0 1 E - T 1 5 8 S , A 0 8 8 T - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - S 1  
6 2 G , A 0 8 8 T - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - S 2 4 9 A , A 1 1 6 T - Q 2 0 6 D ,  
A 1 1 6 T - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - S 2 4 9 A , G 0 2 4 E , G 0 2 4 E - G 1 3 1  
H , G 0 2 4 E - S 2 4 9 A , G 0 2 4 E - T 1 5 8 S , G 1 3 1 H , G 1 3 1 H - K 2  
5 6 R , G 1 3 1 H - L 2 5 7 G , K 0 4 3 Y - K 2 5 6 R , K 0 4 3 Y - N 0 7 6 D ,  
K 2 5 6 R , L 2 5 7 G , N 0 7 6 D - A 0 8 8 T , N 0 7 6 D - K 2 5 6 R , N 0 7 6  
D - S 1 6 2 G , N 0 7 6 D - S 2 4 8 N , N 0 7 6 D - S 2 4 9 A , N 1 0 9 G - N 2  
4 3 P - S 2 4 8 A - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - N 2 4 3 P - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R ,  
N 2 4 3 V , Q 2 0 6 D - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T - P 0 4 0 E - Q 1 0 3 H - N 1 0 9

10

20

30

40

50

G, S063G, S063G - A116T, S063G - Q206D, S162G - K256R, S162G - L257G, S162G - N243V, S162G - Q206D, S162G - S248N, S248N, S248N - L257G, S249A, S249A - L257G, T158S, T158S - N243V, 及びT158S - Q206Dからなる群から選択される配列番号6に対する少なくとも1組のアミノ酸置換、

(viii) A088T - A116T - N243V - K256R - L257G, A088T - A116T - N243V - L257G, A088T - T158S - N218S - K256R, A088T - T158S - N218S - N243V - L257G, A088T - A116T - T158S - N218S - N243V - K256R - L257G, A088T - N109G - A116T - G131H - A153S - N218S - S248N - L257G, A088T - N109G - A116T - T158S - S248N - K256R - L257G, A088T - N109G - T158S - L257G, A114S - A116T - N218S - N243V - S248N - K256R - L257G, A116T - T158S - K256R, A088T - A116T - G131H - T158S - S248N - L257G, A088T - A116T - T158S, A088T - N109G - A116T - G131H - L257G, A088T - N109G - A116T - T158S - N243V - S248N - L257G, A088T - N109G - N243V - L257G, A088T - N109G - N243V - S248N, A088T - N109G - T158S - N243V - L257G, A088T - N109G - T158S - N243V - S248N - L257G, A116T - T158S - S248N - L257G, Y006H - A116T - G131H - S248N, A088T - A116T - G131H - T158S - N218S - N243V, A088T - A116T - G131H - T158S - N243V, A088T - A116T - G131H - T158S - N243V - K256R - L257G, A088T - A116T - N218S - N243V - K256R - L257G, A088T - A116T - S248N - K256R - L257G, A088T - A116T - T158S - N218S - N243V, A088T - A116T - T158S - N243V - S248N - L257G, A088T - G131H - N243V - S248N - K256R - L257G, A088T - N109G - A116T - T158S - L257G, A088T - N109G - A116T - T158S - N212D - N243V - K256R - L257G, A088T - N109G - A116T - T158S - N218S - N243V - S248N - K256R, A088T - N109G - A116T - T158S - S248N - L257G, A088T - N109G - G131H - V148A - N218S - N243V - K256R - L257G, A088T - N109G - K256R, A088T - N109G - N243V - S248N - L257G, A088T - N109G - T158S - K256R, A088T - N109G - T158S - N243V, A088T - T158S - N243V - K256R - L257G, A116T, A116T - N218S - N243V - L257G - N269S, A116T - T158S - K256R - L257G, N109G - A116T - K256R - L257G, N109G - A116T - N243V, N109G - A116T - T158S - N243V - K256R - L257G, N109G - G131H - L257G, N109G - G131H - S248N - K256R - L257G, N109G - G131H - T158S - K256R - L257G, S003P - A116T - T158S - S248N - K256R, T158S - S248N - K256R, A088T - A116T - G131H - N243V - K256R, A088T - A116T - G131H - S248N - K256R - L257G, A088T - A116T - G131H - V147A - T158S - N218S - N243V - S248N - L257G, A088T - A116T - S248N - L257G, A088T - A116T - T158S - N218S, A088T - A116T - T158S - N218S - K256R - L257G, A088T - A116T - T158S - N218S - L257G, A088T - G131H - N243V - L257G, A088T - G131H

10

20

30

40

50

- T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0  
9 G - A 1 1 6 T , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S , A  
0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G  
, A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5  
6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S  
2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S  
- N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4  
3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K  
2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R  
- L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8  
8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N  
1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T  
- N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - W 2 4 1 R - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8  
8 T - N 1 0 9 G - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - L 2 5 7 G , A  
0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R  
, A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0  
9 G - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K  
2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V  
- S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5  
6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A  
0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - A 2 7 4 D , A 0 8 8 T  
- N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - K 2 5  
6 R , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A  
0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S  
- N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 1 1  
6 T - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N  
2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G  
- Q 2 7 1 R , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1  
6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - S 2 4 8 N , G  
1 3 1 H - T 1 5 8 S - I 2 3 4 T - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , G 1 3 1 H - W 2 4 1 L  
- N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - A 1 3  
7 V - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G  
1 3 1 H - A 1 5 1 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T  
- G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1  
6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G  
1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - S 2 4 8 N  
, N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5  
8 S - N 2 1 8 S - W 2 4 1 R - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N  
2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N  
- K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5  
7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N  
2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S  
- N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G - A 2 7 4 T , N 1 0 9 G - K 2 5  
6 R , N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K  
2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G  
- T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , P 0 1 4 L - A 0 1 5 L - L 0 1 6 C - H 0 1  
7 T - S 0 1 8 L - Q 0 1 9 K - G 0 2 0 A - Y 0 2 1 T - T 0 2 2 L - G 0 2 3 E , S  
0 0 3 F - A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R  
- L 2 5 7 G , V 0 0 4 A - A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , V 0 0  
4 A - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , V

10

20

30

40

50

0 0 4 L - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , Y 0 0 6 H  
- N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 0 1 T - A 1 1 6 T - T 1 5  
8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G  
1 3 1 H - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G  
, A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5  
7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A  
0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T  
- A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3  
1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - K  
2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - L 2 5 7 G  
, A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - A 1 1  
6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - A 2 7 3 T , A  
0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R  
, A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5  
7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K  
2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T  
- A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1  
6 T - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A  
1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V  
- K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1  
6 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - S  
2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T  
- A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1  
8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N  
2 4 3 V - K 2 5 6 R - N 2 6 9 S , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S  
- N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4  
3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S  
2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V  
- K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8  
8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A  
1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T  
- A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - V 1 4  
3 A - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - V 1 4 7 I - T  
1

10

20

30

5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - K 2 5 6 R -  
L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8  
T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - S 2  
4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - L 2 5 7 G ,  
A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - G 1 3 1  
H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1  
3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H -  
T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3  
V , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1  
5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V -  
S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8  
N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - I 1 0 7 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1  
5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T -  
G 1 3 1 H - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8  
S , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 0  
8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T -

40

50





5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T -  
N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9  
G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1  
0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G -  
L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9  
G - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2  
1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V -  
K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6  
R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G - I 2  
6 8 V , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T -  
N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8  
S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2  
1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V -  
K 2 5 6 R - I 2 6 8 V , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8  
N - Q 2 7 5 R , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - N 2  
4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N ,  
A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 2 4 3 V , A 0 8 8  
T - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 2 4 3 V - L 2  
5 7 G , A 0 8 8 T - S 1 4 5 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S -  
L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8  
T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G - Q 2 7 1 H , A 0 8 8 T - T 1  
5 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - V 1 4 3 A - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T -  
G 1 3 1 H - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S , A 1 1 6 T - G 1 3 1  
H - N 2 4 3 V , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1  
3 1 H - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R ,  
A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - I 2 3 4 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8  
N - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 1  
1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T -  
G 1 3 1 H - V 1 4 3 F - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , A 1 1 6 T - L 2 5 7 G , A 1 1 6  
T - N 2 1 8 S , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2  
4 3 V - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - N 2 4 3 V , A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R ,  
A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6  
R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S , A 1 1 6 T - T 1  
5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N ,  
A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6  
R , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2  
4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G ,  
A 1 1 6 T - V 1 4 9 I - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - Q 2 7 1  
H , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - N 2 4 3 V , G 1  
3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S , G 1 3 1 H -  
T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3  
V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2  
5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G ,  
N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6  
T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1  
1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T -  
G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3  
V - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2  
5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G -  
A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - I 2 6 8 V , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1

10

20

30

40

50

H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1  
 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G -  
 A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1  
 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S , N 1  
 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T -  
 N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8  
 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1  
 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G -  
 A 1 1 6 T - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - G 2 1 1  
 V - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - K 2  
 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , N 1 0 9 G -  
 A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9  
 G  
 - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1  
 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A  
 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G  
 - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - Q 2 7  
 5 R , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - A 1 3 7 V - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , N  
 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - K 2 3 7 N , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S  
 - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4  
 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N  
 1 0 9 G - G 1 3 1 H - S 1 4 5 F - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G  
 , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - S 2 4  
 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - G  
 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H  
 - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5  
 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N  
 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H  
 - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - Q 2 7 1 R , N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , N 1 0  
 9 G - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N  
 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S  
 - I 2 6 8 V , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1  
 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S  
 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S  
 - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4  
 8 N , N 1 0 9 S - A 1 1 6 T - S 2 4 8 N , N 2 1 8 S , N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S  
 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 2 4 3 V  
 , N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 2 4 3 V - S 2 4  
 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , S 1 0 5 P - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N  
 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 2 4 8 N , T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R  
 , 及び T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G からなる群から選択される配列番号 6 に対す  
 る少なくとも 1 組のアミノ酸置換、  
 ( i x ) A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7  
 G , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G - N 2 6 9 S , A 0 8 8 T - A 1  
 1 6 T - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G -  
 A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9  
 G - T 1 5 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2  
 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - A 2 7 3 T , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V -  
 L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8  
 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1

10

20

30

40

50

5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T -  
G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8  
T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1  
0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G -  
A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6  
T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0  
8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T -  
N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8  
S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - I 2 6 8 V , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2  
4 8 N - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G -  
A 1 1 6 T , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - L 2 5 7 G , N 1 0 9  
G - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1  
0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G -  
N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , S 0 0 3 P - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8  
S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2  
1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S -  
L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8  
N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2  
5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R -  
L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3  
V , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2  
5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S -  
N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8  
N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2  
4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G ,  
A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7  
G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - Q 2  
7 5 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - A 2 1 6 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V -  
K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8  
T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1  
5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S -  
N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3  
V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2  
4 3 V - K 2 5 6 R - N 2 6 9 S , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V ,  
A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6  
T - V 1 4 7 I - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1  
3 1 H - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V -  
S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - K 2 5 6  
R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 0  
8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T -  
I 1 0 7 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3  
V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - I 1 0 7 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2  
4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - A 1 5 3 S -  
N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1  
H - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2  
1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H -  
N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8  
S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2  
1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H -  
N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8

10

20

30

40

50

N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2  
1 8 S , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S -  
N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1  
H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1  
0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G -  
A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8  
S - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2  
5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8 T - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T -  
N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8 T - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9  
G - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - K 2  
5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R -  
L 2 5 7 G - N 2 6 9 D , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S , A 0 8 8  
T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1  
5 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S -  
N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8  
S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1  
1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G -  
A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9  
G - G 1 3 1 H - A 1 3 8 V - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2  
5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G -  
G 1 3 1 H - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3  
V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2  
4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S -  
S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8  
S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2  
1 8 S - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V -  
K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3  
V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2  
4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - V 1 4 9 A - K 2 5 6 R -  
L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8  
T - N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1  
0 9 G - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G -  
N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8  
T - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2  
4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G ,  
A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8  
S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - Q 2 7 5 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1  
5 8 S - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R -  
I 2 6 8 V , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8  
T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 2  
1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N -  
K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - T 1 5 8  
S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - V 1 4 3 A - T 1  
5 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - V 1 4 7 I - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R -  
L 2 5 7 G , A 1 1 4 S - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6  
R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2  
5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N -  
L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1  
H - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2  
5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H -

10

20

30

40

50

T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - I 2 3 4 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 1 6  
T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 1  
1 6 T - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R -  
L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - T 1 5 8  
S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G - Q 2 7 1 R , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2  
4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G ,  
G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , I 1 0 7 T - N 1 0 9  
G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2  
5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - A 1 3 7 V - T 1 5 8 S -  
S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - A 1 5 1  
S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2  
1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S -  
N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - L 2 5 7  
G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1  
1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G ,  
N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8  
N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1  
0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T -  
N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6  
T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2  
4  
3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N  
1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - G 2 1 1 V - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R  
, N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5  
8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N  
2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - K 2 3 7 N  
, N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3  
1 H - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L  
2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G  
- G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - S 2 4  
8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N  
1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G  
- G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - N 2 1 8 S , N 1 0 9 G - N 2 1  
8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L  
2 5 7 G , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S  
- N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5  
7 G , N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , S 0 0 3 F - A  
0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G  
, T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 3 3 S , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4  
8 N - K 2 5 6 R , V 0 0 4 A - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S  
2 4 8 N - L 2 5 7 G , Y 0 0 6 H - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S  
- N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - A 2 7 2 G , A 0 8 8 T - A 0 9 8 S - N 2 1  
8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G - L  
2 6 7 M , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T  
- G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - A 2 7 4 T , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1  
8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K  
2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R  
- L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5  
6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L  
2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N

10

20

30

40

50









5 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S -  
N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8  
S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2  
4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S -  
N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8  
S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1  
5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H -  
T 1 5 8 S - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3  
V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2  
4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V -  
S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3  
V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1  
5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H -  
T 1 5 8 S - W 2 4 1 R - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1  
H - V 1 4 8 A - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1  
0 9 G - G 1 5 4 A - N 1 5 5 P - E 1 5 6 T - G 1 5 7 L - T 1 5 8 M - S 1 5 9 E -  
G 1 6 0 E - S 1 6 1 L , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8  
T - N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2  
1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R ,  
A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 4 3  
V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - S 2 4 8 N , A 0  
8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S -  
N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6  
R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 0  
8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R ,  
A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6  
R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2  
5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R -  
L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8  
T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1  
5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S -  
S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - S 2 4 8  
N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0  
8 8 T - N 1 0 9 G - V 1 4 7 A - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T -  
N 2 1 8 S - L 2 5 7 G - I 2 6 8 V , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , A 0 8 8  
T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2  
4 8 N - N 2 6 9 S , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T -  
N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G - Q 2 7 1 R , A 0 8 8 T - N 2 4 3 V , A 0 8 8  
T - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 2 4 3 V - S 2  
4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G ,  
A 0 8 8 T - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7  
G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - T 1  
5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S -  
N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8  
S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2  
4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R -  
L 2 5 7 G - Q 2 7 1 H , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8  
T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - S 2  
4 8 N , A 0 8 8 T - V 1 4 7 A - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - K 2 5 6 R ,  
A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - K 2 5 6

10

20

30

40

50

R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1  
3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N -  
K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7  
G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2  
4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R ,  
A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - A 2 3 1 V - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 1 1 6  
T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1  
5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S -  
N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8  
S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1  
5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T -  
G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8  
S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2  
4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R ,  
A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1  
H - V 1 4 3 F - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , A 1 1 6 T - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - N 2  
1 8 S , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V -  
L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 1 6  
T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - N 2  
1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N -  
L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - N 2 4 3 V , A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7  
G , A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2  
5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T -  
T 1 5 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , A 1 1 6  
T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2  
4 3 V , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T -  
T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8  
S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2  
5  
6 R , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N  
2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G  
, G 1 3 1 H - K 1 4 1 R - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , G 1 3 1 H - N 2 1  
8 S , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K  
2 5 6 R - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , G 1 3 1 H  
- N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4  
8 N - K 2 5 6 R , G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , G  
1 3 1 H - S 2 4 8 N , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - I 2 3 4 T - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R  
, G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - T 1 5  
8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S  
2 4 8 N - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R  
- L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , G 1 3  
1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S  
2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - A 1 4 4 V  
- T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3  
1 H - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N  
2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V  
- K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4  
8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L  
2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G  
- A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3

10

20

30

40

50



, N109G - N243V - K256R, N109G - N243V - L257G, N109G - N243V - S248N, N109G - N243V - S248N - K256R - L257G, N109G - S182F - S204F - S207L - N218S - S236F - S248N - L257G, N109G - S248N - K256R, N109G - T158S - K256R, N109G - T158S - N218S - N243V - K256R - L257G, N109G - T158S - N218S - S248N - L257G, N109G - T158S - N243V, N109G - T158S - N243V - K256R, N109G - T158S - N243V - S248N, N109G - T158S - N243V - S248N - K256R, N109G - T158S - S248N - K256R, N109G - T158S - S248N - L257G, N218S, N218S - N243V - S248N - K256R, N218S - S248N - L257G, N243V - K256R, N243V - S248N - K256R, N243V - S248N - K256R - L257G, N243V - S248N - L257G - Q271R, S003P - A116T - T158S - S248N - K256R, S248N, T158S - N218S, T158S - N218S - A272V, T158S - N218S - L257G, T158S - N218S - N243V - K256R - L257G, T158S - N218S - N243V - L257G, T158S - N218S - S248N - K256R - L257G, T158S - N243V - K256R - L257G, T158S - N243V - S248N - K256R, V004A - N109G - A116T - G131H - S248N - K256R - L257G, 及び Y006H - A116T - G131H - S248N からなる群から選択される配列番号6に対する少なくとも1組のアミノ酸置換、

(x) S018F - S162L, S018P - D120N, P014T - S037T, S009T - K141R, 及び S161P - S162L からなる群から選択される配列番号6に対する少なくとも1組のアミノ酸置換、

(xi) I031V - S038W, P014T - S037T, S018F - S162L, S018P - D120N, 及び S162L - D181H からなる群から選択される配列番号6に対する少なくとも1組のアミノ酸置換、

(xii) Y21H - D259G, S183T - S249R, N61D - Q206R, Y262N - Q275R, K043R - N076S, A133V - D259N, 及び I079V - Q217H からなる群から選択される配列番号6に対する少なくとも1組のアミノ酸置換、

(xiii) N61P - S63G - N109Q - A128S - S224A - N243V, A88T - N109G - A114S - A116T - A128S - N243V, A88T - N109G - A114S - A116T - A128S - S183L - S224A - N243V, N109G - A128S - S183V, N109G - A128S - N243V - K256R, N109M - A128S - S224A, A88T - N109S - A116T - A128S - S224A - N243V, N109Q - A128S - S224A - N243V, A88T - N109M - A116T - A128S - S224A - N243V, N109S - A128S - S224A - N243V, A88T - N109G - A116T - N243V, N101Q - N109Q - A128S - S224A - N243V, N109G - A116T - N243V - K256R, N109G - A128S - P129S - S130T - S224A - N243V, 及び A88T - N109Q - A116T - A128S - S224A - N243V からなる群から選択される配列番号6に対する少なくとも1組のアミノ酸置換、

(xiv) S33T - T55P - N61P - S63G - A88T - N109G - A116T - A128S - G131H - S224A - N243V, S33T - N61G - S63G - N109G - A128S - N218S - N243V, S33T - S63G - N109G - A128S - N218S - N243V, N61P - S63G - N109Q - A128S - G131H - G169A - S224A - N243V - S249Q, S33T - N61

10

20

30

40

50

G - A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3  
 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - A 1 2 8 S - N 2 1  
 8 S , A 1 G - N 6 1 P - S 6 3 G - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - S 2 2 4 A  
 - N 2 4 3 V , N 6 1 P - S 6 3 G - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - S 2 2 4 A  
 - N 2 4 3 V - S 2 4 9 Q , S 6 3 G - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - S 2 2 4  
 A - N 2 4 3 V , N 6 1 P - S 6 3 G - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3  
 V , A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V , A 8 8  
 T - N 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - S 1 8 3 L - S 2 2 4 A - N 2  
 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1 2 8 S , N 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1 2 8 S -  
 S 1 8 3 L - S 2 2 4 A , N 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A , N 1 0 9  
 G - A 1 1 4 S - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1  
 6 T - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 6 1 G - A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1  
 6 T - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 1 8 3 V , N  
 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V  
 - S 2 4 8 A , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 2  
 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A , N 1 0 9 G - A  
 1 2 8 S - S 1 8 3 L - S 2 2 4 A , N 6 1 G - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A ,  
 N 1 0 9 M - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A , A 8 8 T - N 1 0 9 S - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S  
 - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 9 M - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , S 6 3  
 G - A 1 2 8 S , A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V , N 1 0 1 Q - N 1 0  
 9 Q - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - K  
 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T , S 6 3 G - N 1 0 9 G , A 8 8 T - N 1 0 9 G , N  
 1 0 9 G - K 2 5 6 R , N 6 1 G - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V , S 3 3 T - N 1 0 9 G - A  
 1 2 8 S - G 1 6 9 A - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S -  
 N 2 1 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - P 1 2 9 S - S 1 3 0  
 T - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , 及び A 8 8 T - N 1 0 9 Q - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - S  
 2 2 4 A - N 2 4 3 V からなる群から選択される配列番号 6 に対する少なくとも 1 組のア  
 ミノ酸置換、並びに、

10

20

( x v ) G 2 4 S - G 5 3 S - N 7 8 S - G 9 7 A - N 1 0 1 S - A 1 2 8 S , I 3 1  
 L - S 3 3 T - S 6 3 G - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - G 1 6 9 A - N 2 1 8 S - N 2 4 3  
 V , A 1 G - I 3 1 L - S 3 3 T - T 5 5 P - N 6 1 P - S 6 3 G - A 8 8 T - N 1 0 9  
 G - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - G 1 6 9 A - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V - S 2  
 4 9 Q , S 3 3 T - N 6 1 G - S 6 3 G - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - G 1 6  
 9 A - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - S 6 3 G - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - G 1 6  
 9 A - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - T 5 5 P - N 6 1 P - S 6 3 G - A 8 8 T -  
 N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , S 3 3 T  
 - T 5 5 P - N 6 1 P - S 6 3 G - A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - G  
 1 3 1 H - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V - S 2 4 9 Q , S 3 3 T - N 6 1 G - S 6 3 G - N 1  
 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - S 6 3 G - N 1 0 9 G - A 1  
 2 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - T 5 5 P - N 6 1 P - S 6 3 G - N 1 0 9  
 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 6 1 P - S 6 3 G - N 1 0 9  
 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - G 1 6 9 A - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V - S 2 4 9 Q , S 3  
 3 T - N 6 1 G - A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4  
 3 V , S 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - N 7 6  
 D - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - N 7 6 D - N 1 0 9  
 G - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 3 3 T - N 6 1  
 G - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - N 7 6 D - A 1 2 8  
 S - N 2 1 8 S , S 3 3 T - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S , A 1 G - N 6 1 P - S 6 3 G - N  
 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 6 1 P - S 6 3 G - N  
 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V - S 2 4 9 Q , N 6 1 P -

30

40

50

S 6 3 G - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , S 6 3 G -  
 N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 6 1 P - S 6 3 G -  
 N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 4 S  
 - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V , A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1 1 6  
 T - A 1 2 8 S - S 1 8 3 L - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1  
 2 8 S , N 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1 2 8 S - S 1 8 3 L - S 2 2 4 A , N 1 0 9 G -  
 A 1 1 4 S - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A , N 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1 2 8 S - S 2 2 4  
 A - N 2 4 3 V , A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4  
 3 V , N 6 1 G - A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4  
 3 V , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 1 8 3 V , N 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1 2 8 S - N  
 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 A , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S  
 - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0  
 9 G - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 1 8 3 L - S 2 2 4 A , N  
 6 1 G - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A , N 7 6 D - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S  
 2 2 4 A , N 1 0 9 M - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 1 8 3 L  
 , S 3 3 T - N 7 6 D , A 8 8 T - N 1 0 9 S - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A -  
 N 2 4 3 V , N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 9 S - A 1 2 8  
 S - S 2 2 4 A , A 8 8 T - N 1 0 9 M - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4  
 3 V , N 1 0 1 Q - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - P 1 2 9 S - S 1 3 0 T - S 2 2 4 A - N  
 2 4 3 V , S 6 3 G - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 9 M -  
 A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , S 6 3 G - A 1 2 8 S , N 1 0 9 S - A 1 2 8 S  
 - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V , N 6 1 S  
 - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V , N 1 0 1 Q - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4  
 3 V , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1  
 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T , S 6 3 G - N  
 1 0 9 G , A 8 8 T - N 1 0 9 G , N 1 0 9 G - K 2 5 6 R , N 6 1 G - N 1 0 9 G - N  
 2 4 3 V , S 3 3 T - N 6 1 P - S 6 3 G - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - G 1  
 6 9 A - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - G 1 6 9 A - N  
 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - S 2 2 4 A -  
 N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - P 1 2 9 S - S 1 3 0 T - S 2 2 4 A - N 2 4 3  
 V , 及び A 8 8 T - N 1 0 9 Q - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V から  
 なる群から選択される配列番号6に対する少なくとも1組のアミノ酸置換；からなる群から  
 選択される。

【 0 1 3 6 】

第八態様では、本発明は、配列番号2のアミノ酸配列を有するBPN'スブチリシンプロ  
 テアーゼの単離された又は非自然発生型のプロテアーゼ変異体を提供し、上記変異体は  
 、タンパク質分解活性を有し、S 1 8 2 E , N 1 0 9 I , N 1 0 9 D - Y 2 1 7 L - S 2  
 4 8 R , N 1 0 9 D - S 1 8 8 R - Y 2 1 7 L , S 8 7 D - Y 2 1 7 L - S 2 4 8 R , S  
 8 7 R - N 1 0 9 D - Y 2 1 7 L - S 2 4 8 R , S 8 7 R - N 1 0 9 D - S 1 8 8 D - Y  
 2 1 7 L - S 2 4 8 R , G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , I 1 1 1 V - M 1 2 4 V , M 1 2 4 V  
 - Y 2 1 7 Q , N 6 2 Q - G 9 7 A , S 8 9 Y - M 1 2 4 V , V 6 8 A , V 6 8 A - A 9  
 2 G , V 6 8 A - G 9 7 A , V 6 8 A - I 1 1 1 V , V 6 8 A - S 8 9 Y , V 6 8 A - V  
 2 2 7 T , V 6 8 A - Y 2 1 7 Q , W 1 0 6 F - Y 2 1 7 Q , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y  
 2 1 7 Q , G 9 7 A - L 1 2 6 A - Y 2 1 7 Q , G 9 7 A - M 1 2 4 V - L 1 2 6 A - Y  
 2 1 7 Q , G 9 7 A - N 1 2 3 G - Y 2 1 7 Q , L 9 6 T - G 9 7 A - Y 2 1 7 Q , M 1  
 2 4 V - L 1 2 6 A - Y 2 1 7 Q , N 6 2 Q - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , N 6 2 Q - G 9  
 7 A - Y 2 1 7 Q , G 9 7 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 M , G 9 7 G - G 1 2 8 S - Y 2 1  
 7 E , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , G 9 7 M - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 E , G 9 7  
 A - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q , G 9 7 D - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q , G 9 7 M - G 1 2 8  
 G - Y 2 1 7 M , G 9 7 G - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q , G 9 7 S - G 1 2 8 S - Y 2 1 7

Q , G 9 7 G - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , G 9 7 S - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 E , G 9 7 A  
- G 1 2 8 S - Y 2 1 7 L , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 N , G 9 7 Q - G 1 2 8 S  
- Y 2 1 7 L , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 M , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 S  
, G 9 7 D - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , G 9 7 M - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q , G 9 7 Q -  
G 1 2 8 G - Y 2 1 7 D - S 8 7 Y , G 9 7 S - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 N , G 9 7 A - G  
1 2 8 S - Y 2 1 7 T , G 9 7 D - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 E , G 9 7 D - G 1 2 8 A - Y  
2 1 7 L , G 9 7 G - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 E - S 7 8 P - A 2 7 2 T , G 9 7 T - G 1  
2 8 S - Y 2 1 7 D , G 9 7 D - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 I , G 9 7 Q - G 1 2 8 S - Y 2  
1 7 Q , G 9 7 G - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 D , G 9 7 Q - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 N , G 9  
7 S - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 M , G 9 7 S - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 N , G 9 7 S - G 1 2  
8 S - Y 2 1 7 M , G 9 7 E - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 M , G 9 7 S - G 1 2 8 P - Y 2 1  
7 Q , G 9 7 T - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q , G 9 7 D - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q - A 7 3  
T , G 9 7 E - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 N , G 9 7 G - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 I , G 9 7 Q  
- G 1 2 8 A - Y 2 1 7 D , G 9 7 Q - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 M , G 9 7 R - G 1 2 8 T  
- Y 2 1 7 Q - S 1 6 2 P , G 9 7 S - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 D , G 9 7 T - G 1 2 8 P  
- Y 2 1 7 I , G 9 7 Q - G 1 2 8 G - Y 2 1 7 E , G 9 7 C - G 1 2 8 G - Y 2 1 7 N  
, G 9 7 D - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 H , G 9 7 M - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 L , G 9 7 M -  
G 1 2 8 S - Y 2 1 7 N , G 9 7 S - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 E , G 9 7 M - G 1 2 8 S -  
Y 2 1 7 I , G 9 7 A - G 1 2 8 P - Y 2 1 7 A , G 9 7 R - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 D ,  
G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 1 4 5 D , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q -  
P 2 3 9 R , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 6 1 E - P 1 2 9 E - S 1 6 2 K -  
K 2 1 3 L - N 2 4 0 K , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 6 1 E , G 9 7 A - G  
1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - P 4 0 E - A 1 4 4 K - K 2 1 3 L , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y  
2 1 7 Q - P 1 2 9 E , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 6 1 E - P 1 2 9 E - S  
1 5 9 K , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - K 2 1 3 L , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y  
2 1 7 Q - S 8 7 D , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - Q 2 0 6 E , G 9 7 A - G 1  
2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 R - P 4 0 E - S 1 4 5 D - S 1 5 9 K - K 2 1 3 L , G 9  
7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - K 2 6 5 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2  
4 R , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - P 4 0 E , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7  
Q - Q 2 7 5 E , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - P 1 2 9 E - S 1 4 5 D - N 2 4  
0 K , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - A 1 4 4 K , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1  
7 Q - S 1 5 9 K , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 1 6 2 K , G 9 7 A - G 1 2  
8 A - Y 2 1 7 Q - N 2 4 0 K , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 5 3 G , G 9 7  
A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 7 8 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 5 3 G  
- S 7 8 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 5 3 G - I 1 1 1 V , G 9 7 A - G  
1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 5 3 G - N 1 1 7 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S  
5 3 G - S 1 3 2 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - Y 1 0 4 N - S 1 3 2 N , G  
9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 5 3 G - S 7 8 N - I 1 1 1 V , G 9 7 A - G 1 2  
8 A - Y 2 1 7 Q - S 5 3 G - S 7 8 N - N 1 1 7 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7  
Q - S 5 3 G - S 7 8 N - S 1 3 2 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 5 3 G -  
Y 1 0 4 N - S 1 3 2 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 7 8 N - Y 1 0 4 N -  
S 1 3 2 N , Y 2 1 7 L - V 0 6 8 C - A 0 6 9 G , Y 2 1 7 L - I 0 7 9 F - A 0 9 8  
G , Y 2 1 7 L - P 0 8 6 T - S 1 0 1 D - Q 1 0 3 S - V 1 4 7 I , Y 2 1 7 L - A 0  
8 8 T - P 1 2 9 S - G 1 4 6 D , Y 2 1 7 L - V 0 9 3 I - G 1 2 8 D - P 1 2 9 R ,  
Y 2 1 7 L - Z 0 9 6 . 0 1 D - A 0 9 8 R , Y 2 1 7 L - Z 0 9 6 . 0 1 H - A 0 9 8  
G , Y 2 1 7 L - G 0 9 7 S - Z 0 9 7 . 0 1 S - A 0 9 8 G - A 2 7 3 T , Y 2 1 7 L  
- A 0 9 8 S - D 0 9 9 G - G 1 0 0 D , Y 2 1 7 L - Z 0 9 8 . 0 1 N、 Y 2 1 7 L -  
D 0 9 9 G - Z 0 9 9 . 0 1 N、 Y 2 1 7 L - D 0 9 9 G - Z 0 9 9 . 0 1 S、 Y 2 1 7  
L - D 0 9 9 V - S 1 0 1 D , Y 2 1 7 L - Z 0 9 9 . 0 1 S、 Y 2 1 7 L - G 1 0 0 D  
, Y 2 1 7 L - S 1 0 1 D - Q 1 0 3 H , Y 2 1 7 L - S 1 0 1 G - A 1 5 1 V , Y 2 1

10

20

30

40

50



7 L - S 1 0 1 H - G 1 0 2 S , Y 2 1 7 L - S 1 0 1 H - Q 1 0 3 D , Y 2 1 7 L - G  
1 0 2 R - Q 1 0 3 C - Y 1 0 4 C - V 1 9 2 I , Y 2 1 7 L - Q 1 0 3 D , Y 2 1 7 L  
- V 1 2 1 I - I 1 2 2 S - N 1 2 3 C , Y 2 1 7 L - V 1 2 1 L - N 1 2 3 C , Y 2 1  
7 L - I 1 2 2 S - N 1 2 3 S , Y 2 1 7 L - M 1 2 4 I , Y 2 1 7 L - M 1 2 4 V , Y  
2 1 7 L - L 1 2 6 F - P 1 2 9 Z - S 1 8 2 N , Y 2 1 7 L - L 1 2 6 Y , Y 2 1 7 L  
- G 1 2 7 S - P 1 2 9 D , Y 2 1 7 L - Z 1 2 7 . 0 1 N - G 1 2 8 S - P 1 2 9 S ,  
Y 2 1 7 L - G 1 2 8 H - P 1 2 9 Y , Y 2 1 7 L - G 1 2 8 S - P 1 2 9 D , Y 2 1 7  
L - G 1 2 8 S - P 1 2 9 D - S 2 4 8 R , Y 2 1 7 L - G 1 2 8 S - P 1 2 9 G , Y 2  
1 7 L - P 1 2 9 G - G 1 3 1 Z , Y 2 1 7 L - P 1 2 9 G - S 1 3 0 H - S 1 3 2 Z ,  
Y 2 1 7 L - P 1 2 9 H - G 1 3 1 Z , Y 2 1 7 L - P 1 2 9 L , Y 2 1 7 L - P 1 2 9  
S - S 1 3 0 H - S 1 3 2 Z , Y 2 1 7 L - P 1 2 9 Z , Y 2 1 7 L - P 1 2 9 Z - S 1  
3 0 G , Y 2 1 7 L - P 1 2 9 Z - S 1 3 0 G - G 1 3 1 H - S 1 3 2 H , Y 2 1 7 L -  
P 1 2 9 Z - S 1 3 0 H , Y 2 1 7 L - S 1 3 0 V - G 1 3 1 D - S 1 3 2 I , S 8 7 T  
- A 8 8 L - S 8 9 G - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , N 6 1 P - S 6 3 H - G 9  
7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 8 7 G - A 8 8 V - S 8 9 A - G 9 7 A - G 1 2 8 A  
- Y 2 1 7 Q , P 8 6 S - S 8 7 G - A 8 8 V - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , Q  
5 9 S - N 6 1 P - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 2 4 G - N 2 5 G - G 9 7 A  
- G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , N 6 1 P - N 6 2 S - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q ,  
G 9 7 A - G 1 2 8 A - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S - Y 2 1 7 Q , L 7 5 S -  
N 7 6 Y - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , G 9 7 A - G 1 2 8 A - V 2 0 3 Y - Y  
2 1 7 Q , T 5 5 P - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , A 8 8 V - L 9 0 I - G 9 7  
A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , G 9 7 A - G 1 2 8 A - G 2 1 1 R - N 2 1 2 S - K 2 1  
3 V - Y 2 1 7 Q , G 2 3 A - S 2 4 G - N 2 5 G - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q  
, T 2 2 N - S 2 4 A - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 2 4 R - G 9 7 A - G 1  
2 8 A - Y 2 1 7 Q , G 9 7 A - A 9 8 S - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , G 9 7 A - G 1 2  
8 A - T 1 5 8 G - S 1 5 9 G - Y 2 1 7 Q , Q 5 9 E - N 6 1 P - G 9 7 A - G 1 2 8  
A - Y 2 1 7 Q , G 9 7 A - A 9 8 E - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , G 9 7 A - G 1 2 8 A  
- Y 2 1 7 Q - P 8 6 S - S 8 7 G - A 8 8 V - A 1 1 6 N - N 1 1 7 S - N 1 1 8 G ,  
G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 6 3 T - P 8 6 S - S 8 7 G - A 8 8 V , G 9 7  
A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - P 8 6 S - S 8 7 G - A 8 8 V - P 2 3 9 R , G 9 7 A -  
G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - N 6 1 P - N 6 2 S - P 1 9 4 L - A 2  
3 2 T , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S - A  
1 3 3 V - L 2 6 7 V , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - A 1 3 4 T - L 2 6 7 V ,  
G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 R - P 4 0 E - P 1 2 9 E - S 1 5 9 K - K  
2 6 5 R , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - A 1 3 4 T - G 2 1 1 T , G 9 7 A - G  
1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 R - P 1 2 9 E , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - I  
1 1 1 V - S 1 6 1 P , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - P 1 2 9 Q , G  
9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - I 1 1 5 V - L 2 6 7 V , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y  
2 1 7 Q - P 8 6 S - S 8 7 G - A 8 8 V - A 1 1 6 S - N 1 1 7 G - N 1 1 8 R , G 9  
7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - V 2 0 3 Y - L 2 6 7 V , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2  
1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - S 7 8 N - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8  
A - Y 2 1 7 Q - P 5 2 S - T 5 5 P - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q  
- Q 5 9 S - N 6 1 P - A 1 1 6 S - N 1 1 7 G - N 1 1 8 R , G 9 7 A - G 1 2 8 A -  
Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S , G 9 7 A - G  
1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - P 8 6 S - S 8 7 G - A 8 8 V - T 2 4 2 R , G 9 7 A - G 1 2  
8 A - Y 2 1 7 Q - P 4 0 E - T 5 5 P - N 2 6 9 K , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7  
Q - G 2 3 A - S 2 4 G - N 2 5 G - A 1 1 6 N - N 1 1 7 S - N 1 1 8 G , G 9 7 A -  
G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - V 8 L - N 2 5 Y - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S , G  
9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - S 7 8 N - S 8 7 T  
- A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - G 2 1 1 T -

10

20

30

40

50

L 2 6 7 V , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 R - A 1 1 6 N - N 1 1 7 S -  
N 1 1 8 G , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 R - A 1 2 8 S - P 1 2 9 G ,  
G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S - N 2 4 0 K  
, G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 2 5 Y - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S  
, G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - A 1 3 4 T , G  
9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S - L 2 6 7 V ,  
G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 8 7 G - A 8 8 V - S 8 9 A - A 1 1 6 N - N 1  
1 7 S - N 1 1 8 G , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 6 1 P - P 1 2 9 Q - S 1  
3 0 G - G 1 3 1 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 6 1 P - S 7 8 N - S 8 7  
T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P -  
P 1 2 9 V - P 1 9 4 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - P 1 2 9 V ,  
G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - T 5 5 P - S 7 8 N - S 1 0  
1  
N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - S 7 8 N - I 1 1 5 V , G 9 7 A -  
G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 2 5 Y - S 8 7 G - A 8 8 V - S 8 9 A , G 9 7 A - G 1 2  
8 A - Y 2 1 7 Q - A 1 3 4 T - N 2 4 0 K , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2  
4 R - Q 5 9 S - N 6 1 P , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - G 2 3 A - S 2 4 G -  
N 2 5 G - P 2 3 9 R , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - A 1 1 6 S - N  
1 1 7 G - N 1 1 8 R , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - A 1 3 4 T - S 1 6 1 P ,  
G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - N 6 1 P - S 1 0  
1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 2 5 Y - Q 5 9 S - N 6 1 P  
, G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 2 5 Y - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S  
- A 1 3 7 T , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - G 2 3 A - S 2 4 G - N 2 5 G - N  
6 1 P - S 6 3 H , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - N 6 1 P - S 7 8 N  
- S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - P 1 2 9 Q - N 2 4 0  
K , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - A 1 3 4 T , G 9 7 A - G 1 2 8 A  
- Y 2 1 7 Q - N 2 5 Y - N 6 1 P - S 6 3 H , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S  
8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - P 1 2 9 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5  
P - L 7 5 H - N 7 6 G , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - S  
5 3 G - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A  
- G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - I 1 1 5 V , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q  
- T 5 5 P - A 1 1 6 N - N 1 1 7 S - N 1 1 8 G , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q  
- S 2 4 G - N 2 5 G - A 1 1 6 N - N 1 1 7 S - N 1 1 8 G , G 9 7 A - G 1 2 8 A -  
Y 2 1 7 Q - S 2 4 R - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A -  
Y 2 1 7 Q - G 2 3 A - S 2 4 G - N 2 5 G - G 2 1 1 R - N 2 1 2 S - K 2 1 3 V , G  
9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - T 5 5 P - N 6 1 P - S 7 8 N  
- S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - S 7 8 N -  
S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - I 1  
1 5 V - A 2 7 3 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 2 5 Y - T 5 5 P , G 9 7  
A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - T 5 5 P - N 6 1 P - S  
7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8  
A - Y 2 1 7 Q - Q 5 9 S - N 6 1 P - N 2 4 0 K , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q  
- S 1 6 1 P - L 2 6 7 V , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G -  
S 5 3 G - T 5 5 P - N 6 1 P - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N  
, G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N , G  
9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - N 6 1 P - S 1 0 1 N , G 9 7  
A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - T 5 5 P - S 1 0 1 N -  
V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 2 4 0 K , G 9 7 A - G 1 2 8 A -  
Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - T 5 5 P - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G  
- S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G -

10

20

30

40

50

T 5 5 P - S 1 0 1 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 6 1 P - S 6 3 H - A 1  
 2 8 S - P 1 2 9 Q , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 8 9 Y - P 1 2 9 Q - S 1  
 3 0 G - G 1 3 1 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G  
 1 3 1 S - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - I 1 1 5 V - N 2 4 0 K ,  
 G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 5 3 G - N 6 1 P - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9  
 G - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 1 6 1 P - V 2 0  
 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - N 2 4 0 K  
 , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - P 2 3 9 R , G  
 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - N 6 1 P - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L  
 - S 8 9 G - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G -  
 N 2 5 G - I 1 1 5 V - A 1 3 4 T , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - Y 6 Q - P 1  
 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - S 7  
 8 N - S 8 9 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - T 5 5 P -  
 S 7 8 N - A 8 8 V - S 1 0 1 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 6 1 P - S 6  
 3 H - S 7 8 N - I 1 1 1 V - A 1 3 4 T , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4  
 G - N 2 5 G - S 5 3 G - T 5 5 P - S 7 8 N - S 1 0 1 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y  
 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - S 7 8 N - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7  
 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 5 3 G - N 6 1 P - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A  
 - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 5 3 G - T 5 5 P - S 7 8 N - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y ,  
 G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 5 3 G - T 5 5 P - N 6 1 P - S 7 8 N - S 8 7  
 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 2 4 0 K  
 - A 2 7 3 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S  
 8 9 G - S 1 0 1 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - Q 5 9 S - N 6 1 P - S 8 7  
 T - A 8 8 L - S 8 9 G , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 6 1 P - S 6 3 H - S  
 7 8 N - S 1 6 1 P , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 6 1 P - S 6 3 H - S 7 8  
 N - I 1 1 1 V , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - A 1 2 8 S - P 1 2 9  
 Q , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 6 1 P - S 7 8 N - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y  
 , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 6 1 E - A 1 4 4 K , G 9 7 A - G 1 2 8 A -  
 Y 2 1 7 Q - A 1 3 4 T - P 2 3 9 R , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G -  
 N 2 5 G - S 5 3 G - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7  
 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - T 5 5 P - N 6 1 P - S  
 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 6 1 P - S 7 8 N - S 8  
 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7  
 Q - T 5 5 P - N 2 4 0 K , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G -  
 S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - P 1  
 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S - P 2 3 9 R , G 9 7 A - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q , G  
 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 5 3 G - N 6 1 P - S 1 0 1 N , G 9 7 A - G 1 2  
 8 A - Y 2 1 7 Q - I 1 1 1 V - P 1 2 9 Q - G 2 1 1 T , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2  
 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8  
 A - Y 2 1 7 Q - Q 5 9 S - N 6 1 P - S 8 7 G - A 8 8 V - S 8 9 A , G 9 7 A - G 1  
 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G -  
 S 1 0 1 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S  
 - S 1 6 2 K , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G  
 - G 1 3 1 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - V 2 0 3 Y , G 9 7 A -  
 G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 8 7 G - A 8 8 V - S 8 9 A - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G  
 1 3 1 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - T 5 5  
 P - N 6 1 P - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2  
 1 7 Q - I 1 1 1 V - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y  
 2 1 7 Q - I 1 1 1 V - A 2 7 3 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 6 1 P - S  
 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 2 2 N - S 2 4 A

10

20

30

40

50

- N 6 1 P - S 6 3 H , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y  
2 1 7 Q - S 5 3 G - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N - P 1 2 9  
S - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 1 5 9 K - L 2 6 7 V , G 9 7  
A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - P 4 0 E - S 5 3 Y - S 7 8 Y - P 8 6 S - S 8 7 G - A  
8 8 V , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 R - S 1 4 5 D , G 9 7 A - G 1 2  
8 A - Y 2 1 7 Q - I 1 1 1 V - S 1 5 9 K , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5  
5 P - P 1 2 9 L , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - Q 5 9 S - N 6 1 P - V 2 0 3  
Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S  
8 9 G - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2  
5 G - S 5 3 G - S 7 8 N - S 1 0 1 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 5 3 G  
- N 6 1 P - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9  
7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 8 9 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4  
R - P 1 2 9 V , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 8 7 G - A 8 8 V - S 8 9 A -  
A 1 1 6 N - N 1 1 7 S - N 1 1 8 G - P 1 7 2 H , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q  
- I 1 1 1 V - A 1 3 4 T , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - Q 5 9 S - N 6 1 P -  
P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - P 5 S - S  
8 7 G - A 8 8 V - S 8 9 A - A 1 1 6 G - N 1 1 7 R , Y 2 1 7 Q - N 6 1 P - A 9 7  
G - G 1 0 2 A - A 1 2 8 G - P 1 2 9 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4  
G - N 2 5 G - S 5 3 G - N 6 1 P - S 7 8 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S  
1 4 5 D - S 1 5 9 K - N 2 4 0 K - Q 2 7 5 E , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q -  
T 5 5 P - A 1 2 8 S - P 1 2 9 D , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - G 2 3 A - S  
2 4 G - N 2 5 G - A 1 2 8 S - P 1 2 9 D , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2  
4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - V 2 0 3 Y , G  
9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - I 1 1 1 V - P 2 3 9 R , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y  
2 1 7 Q - S 8 7 G - A 8 8 V - S 8 9 A - S 1 6 2 K , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1  
7 Q - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - I 1 1 5 V , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q  
- S 2 4 G - N 2 5 G - T 5 5 P - S 7 8 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5  
5 P - A 9 2 G , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G -  
S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 2  
2 N - S 2 4 A - T 5 5 P , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 5 3 G - S 8 7 T -  
A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S  
2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - T 5 5 P - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G , G  
9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S - S 1 5 9 K ,  
G 9 7 A - Y 2 1 7 Q - N 6 1 P - N 6 2 Q - G 1 0 0 N - A 1 2 8 G , G 9 7 A - G 1  
2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 R - S 7 8 N - S 1 8 2 P - L 2 6 7 V , G 9 7 A - G 1 2  
8 A - Y 2 1 7 Q - P 2 3 9 R - A 2 7 3 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 5  
3 G - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A -  
G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S - T 2 4 2 R , G 9 7 A  
- G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 3 F - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - G 2 1 1 T , G 9  
7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - L 7 5 H - N 7 6 G , G 9 7 A -  
G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 5 3 G - T 5 5 P - N 6 1 P - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8  
L  
- S 8 9 G , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - A 1  
4 4 K , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G  
- V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - Q 5 9 S - N 6 1 P - A 1 1 6 N -  
N 1 1 7 S - N 1 1 8 G , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 8 7 T - A 8 8 L - S  
8 9 G - I 1 1 1 V , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 R - S 1 4 5 D - P 2  
3 9 R - Q 2 7 5 E , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 1 4 5 D - A 2 7 3 S , G  
9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - K 1 4 1 E - T 2 4 2 R , G 9  
7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N - V 2 0 3

10

20

30

40

50

Y, G97A - G128A - Y217Q - A116N - N117S - N118G - P129Q - S130G - G131S, G97A - G128A - Y217Q - S89Y - G211T, G97A - G128A - Y217Q - S87G - A88V - S89A - A116N - N117S - N118G - A144T, G97A - G128A - Y217Q - S24G - N25G - S78N - S87T - A88L - S89G - S101N - V203Y, G97A - G128A - Y217Q - S24G - N25G - P129V, G97A - Y217Q - N61P - A128G - P129S - S130P, G97A - G128A - Y217Q - T55P - N61P - S87T - A88L - S89G - G110C - S130P, G97A - Y217Q - N123G - A128G, G97A - G128A - Y217Q - N61P - N62Q - G100N - G102A - M124I, S78N - G97A - G128A - Y217Q, G97A - S101N - G128A - Y217Q, G97A - G128A - A137V - Y217Q, N61P - G97A - G128A - Y217Q, G97A - G128A - S130P - Y217Q, G97A - Q103N - G128A - Y217Q, S63T - G97A - G128A - Y217Q, G97A - G102A - G128A - Y217Q, G97A - N109D - G128A - Y217Q - S248R, S87R - G97A - G128A - Y217Q, G97A - G128A - S188D - Y217Q, S87D - G97A - G128A - Y217Q - S248R, G97A - G128A - S188D - S248R - Y217Q, G97A - G128A - S248D - Y217Q, S78N - G97A - G128A - Y217Q - L267V, S78N - G97A - G128A - Y217Q - S161P, S78N - G97A - G128A - Y217Q - I115V, S78N - G97A - G128A - Y217Q - A273S, S78N - G97A - G128A - Y217Q - G211T, S78N - G97A - G128A - Y217Q, S78N - G97A - G128A - Y217Q - I111V, S78N - G97A - G128A - Y217Q - V147L, S78N - G97A - G128A - Y217Q - I108V, S78N - G97A - G128A - Y217Q - S89Y, S78N - G97A - G128A - Y217Q - A138T, G97A - G128A - Y217Q - A134T - K213L, G97A - G128A - Y217Q - G23A - S24G - N25G - P129V, G97A - G128A - Y217Q - S24R - P239R, 及び G97A - G128A - Y217Q - S24R - S87T - A88L - S89G, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、この変異体のアミノ酸位置は、配列番号2のアミノ酸配列に対応させることにより番号付けされる。

【0137】

本発明の第八態様による変異体は、配列番号2及び/又は配列番号4の配列を有するプロテアーゼと比較して、増大したタンパク質分解活性及び/又は増大したクリーニング活性を有し得、並びに、成熟型であり得る。本発明の第八態様による変異体は、配列番号2又は配列番号4に対して少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み得、ここで、この変異体は、タンパク質分解活性を有し、選択的に、配列番号2又は配列番号4の配列を有するプロテアーゼと比較して、向上したタンパク質分解活性及び/又は向上したクリーニング活性を有する。

【0138】

本発明の第八態様による変異体は、位置24、25、40、52、53、55、58、59、61、62、63、68、78、86、87、88、89、92、96、97、100、101、103、104、106、111、114、115、116、117、118、123、124、125、126、128、129、130、131、132、133、134、144、145、159、161、162、167、194、203、206、213、217、227、232、239、240、242、265、267及び275からなる群から選択される位置において3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14又は15個のアミノ酸置換を含み得る。第八態様による変異体は、群(a)及び(b)から選択される合計で3、4、5、6、7、8、9、10、11、12

、13、14又は15個のアミノ酸置換を含み得る：(a) N61E, A144K, P129E、P239R, P40E, Q103E, Q206E, Q7275E, S145D, S159K, S162K, S24R, S63H, S87D及びT242Rからなる群から選択される帯電アミノ酸置換、並びに(b) A114G, A116N, A133V, A134T, A232T, A88V, A92G, F58G, G100T, G128A, G131S, G97A, I111V, I115V, K213L, K265N, L126A, L267V, L96T, M124V, N117S, N118G, N123G, N240K, N25G, N61P, N62Q, N62R, N62S, P129Q, P129V, P194L, P239V, P52L, P86S, Q59S, S101N, S125A, S130G, S132N, S161P, S24G, S53G, S78N, S87G, S89Y, T55P, V203Y, V227T, V68A, W106F, Y104N, Y167A, 及びY217Qからなる群から選択される中性アミノ酸置換。第八態様による変異体は、配列番号2に対して少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。

10

## 【0139】

第九態様では、本発明は、以下の群から選択される単離された又は非自然発生型のプロテアーゼ変異体を提供する：

(a) タンパク質分解活性を有するプロテアーゼ変異体であって、この変異体は、配列番号2に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、群(i)~(vii)から選択される配列番号2と比較して少なくとも1組のアミノ酸置換を含む、プロテアーゼ変異体：

20

(i) Q059V - S078N - G097A - I108V - G128A - V147Q - G211A - Y217Q - N252Q, S078N - G097A - I108V - G128A - V147Q - G211A - Y217Q, S078N - G097A - I108V - G128A - V147Q / - G211A - Y217Q - N252Q, S078N - G097A - I108V - G128A - V147Q - Y217Q - N252Q, 及びS078N - S087E - G097A - M124I - G128A - Y217Q - S224A、

(ii) Q059V - S078N - G097A - I108V - G128A - V147Q - G211A - Y217Q - N252Q, S078N - G097A - I108V - G128A - V147Q - G211A - Y217Q, S078N - G097A - I108V - G128A - V147Q - G211A - Y217Q - N252Q, S078N - G097A - I108V - G128A - V147Q - Y217Q - N252Q, 及びS078N - S087E - G097A - M124I - G128A - Y217Q - S224A、

30

(iii) G097A - M124V - Y167A - Y217Q, V068A - Y167A - Y217Q, G097A - I111V - M124V - Y167A, I111V - M124V - Y167A - Y217Q, V068A - I111V - Y167A - Y217Q, G097A - I111V - M124V - Y167A - Y217Q, 及びP052L - V068A - I111V、

(iv) G097A - N123A - Y217Q, G097A - N123V - Y217Q, N061P - G102A - G128S - Y217Q, N061P - S101N - G102A - G128S - Y217Q, Y217Q, S078N - G097A - I111V - N123Q - Y217Q, 及びG102A - N123Q - Y217Q、

40

(v) G097A - N123A - Y217Q, G097A - N123V - Y217Q, N061P - N062Q - G097A - G100D - Y217Q, N061P - S101N - G102A - G128S - Y217Q, Y217Q, N061P - G102A - G128S - Y217Q, S078N - G097A - I111V - N123Q - Y217Q, 及びG102A - N123Q - Y217Q、

(vi) N061P - N062Q - G097A - G100N - Y217Q, N061P - G097A - M124I - Y217Q, G102A - N123Q - Y217Q, S0

50

2 4 G - N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - N 1 2 3 Q -  
Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - N 1 2 3 Q - Y 2 1 7  
Q , N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - N 1 2 3 Q - Y 2 1 7 Q , N 0 6 1 P - N 0  
6 2 Q - G 0 9 7 A - G 1 0 0 Q - P 2 1 0 S - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - N 0 6 1 P -  
G 1 0 2 A - P 1 2 9 S - P 2 1 0 S - Y 2 1 7 Q , G 0 9 7 A - I 1 1 1 V - M 1 2 4  
V - P 2 1 0 S - Y 2 1 7 Q , G 0 9 7 A - N 1 2 3 Q - P 2 1 0 S - Y 2 1 7 Q , N 0  
6 1 P - G 0 9 7 A - N 1 2 3 Q - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - S 0 5 3 G -  
N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - M 1 2 4 I - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - N 0 6 1  
P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - M 1 2 4 I - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - G 0  
9 7 A - M 1 2 4 I - Y 2 1 7 Q , N 0 6 1 P - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - I 1 1 1 V -  
M 1 2 4 I - Y 2 1 7 Q , N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - M 1 2 4 V - Y 2 1 7 Q , N 0 6 1  
P - N 0 6 2 Q - G 1 0 0 N - G 1 0 2 A - Y 2 1 7 Q , N 0 6 1 P - N 0 6 2 Q - G 0  
9 7 A - G 1 0 0 Q - S 1 0 1 N - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - S 0 5 3 G -  
N 0 6 1 P - N 0 6 2 Q - G 0 9 7 A - G 1 0 0 N - S 1 0 1 N - Y 2 1 7 Q , S 0 7 8  
N - G 0 9 7 A - I 1 1 1 V - N 1 2 3 Q - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - N 0  
6 2 Q - G 0 9 7 A - G 1 0 0 N - S 1 0 1 N - Y 2 1 7 Q , N 0 6 1 P - N 0 6 2 Q -  
G 0 9 7 A - G 1 0 0 N - S 1 0 1 N - Y 2 1 7 Q , N 0 6 1 P - N 0 6 2 Q - S 0 7 8  
N - G 0 9 7 A - G 1 0 0 N - I 1 1 1 V - Y 2 1 7 Q , N 0 6 1 P - N 0 6 2 Q - G 0  
9 7 A - G 1 0 0 D - Y 2 1 7 Q , N 0 6 1 P - N 0 6 2 Q - G 0 9 7 A - G 1 0 0 Q -  
Y 2 1 7 Q , N 0 6 1 P - S 1 0 1 N - G 1 0 2 A - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q , N 0 6 1  
P - G 1 0 2 A - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - N 0  
6 1 P - S 1 0 1 N - G 1 0 2 A - P 1 2 9 S - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - N 0 6 1 P -  
S 1 0 1 N - G 1 0 2 A - P 1 2 9 S - Y 2 1 7 Q , N 0 6 1 P - S 0 7 8 N - G 1 0 2  
A - I 1 1 1 V - P 1 2 9 S - Y 2 1 7 Q , G 0 9 7 A - N 1 2 3 V - Y 2 1 7 Q , S 0  
5 3 G - N 0 6 1 P - G 1 0 2 A - P 1 2 9 S - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G -  
S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - N 0 6 2 Q - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - I 1 1 1 V - Y 2 1 7  
Q , S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - N 0 6 2 Q - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - I 1 1 1 V - Y 2  
1 7 Q , N 0 6 1 P - N 0 6 2 Q - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - I 1 1 1 V - Y 2 1 7 Q ,  
N 0 6 1 P - N 0 6 2 Q - G 0 9 7 A - I 1 1 1 V - Y 2 1 7 Q , N 0 6 2 Q - S 0 7 8  
N - G 0 9 7 A - I 1 1 1 V - Y 2 1 7 Q , N 0 6 2 Q - G 0 9 7 A - I 1 1 1 V - Y 2  
1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N -  
I 1 1 1 V - M 1 2 4 V - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1  
N - I 1 1 1 V - M 1 2 4 V - Y 2 1 7 Q , N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - I 1  
1 1 V - M 1 2 4 V - Y 2 1 7 Q , G 0 9 7 A - N 1 2 3 Q - Y 2 1 7 Q , N 0 6 1 P -  
G 0 9 7 A - I 1 1 1 V - M 1 2 4 V - Y 2 1 7 Q , S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - I 1 1 1  
V - M 1 2 4 V - Y 2 1 7 Q , G 0 9 7 A - I 1 1 1 V - M 1 2 4 I - Y 2 1 7 Q , S 0  
5 3 G - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - I 1 1 1 V - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q , S 0 7 8 N -  
G 0 9 7 A - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - G 1 2 8  
S - Y 2 1 7 Q , G 0 9 7 A - N 1 2 3 A - Y 2 1 7 Q 及び Y 2 1 7 Q、並びに、  
(v i i ) S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - T 0 5 5 P - N 0 6  
1 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - N 0 6 1 P - S  
0 7 8 N - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A , S 0 2 4 G - T 0 5 5 P - N 0 6 1 P  
- S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - S 0 5  
3 G - N 0 6 1 P - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S  
0 2 4 G - S 0 5 3 G - T 0 5 5 P - N 0 6 1 P - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N  
- G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2  
8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 9 N , N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - T 0 5 5 P - S 0 7 8 N - G  
0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - T 0 5 5 P  
- G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - N 0 6  
1 P - G 0 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 6 1 P - S 0 7 8 N - G

10

20

30

40

50

097A - S101N - G128A - Y217Q, S024G - S053G - T055P  
 - N061P - S078N - G097A - G128A - Y217Q, S024G - T05  
 5P - N061P - G097A - G128A - Y217Q, S024G - S038G - S  
 053G - S078N - S101N - G128A - Y217Q, S053G - S078N  
 - G097A - S101N - G128A - Y217Q, N025G - S078N - G09  
 7A - G128A - Y217Q, S024G - N025G - S053G - N061P - G  
 097A - G128A - S130G - Y217Q, 及びS024G - S053G - S07  
 8N - G097A - S101N - G128A - Y217Q、並びに、

(b) タンパク質分解活性を有するプロテアーゼ変異体であって、この変異体は、配列  
 番号6のアミノ酸配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、9  
 5%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、群(i)  
 ) ~ (xii) から選択される配列番号6と比較して少なくとも1組のアミノ酸置換を含  
 む、プロテアーゼ変異体：

(i) A001C, A001D, A001E, A001F, A001H, A001K  
 , A001L, A001M, A001N, A001P, A001Q, A001R, A00  
 1S, A001T, A001V, A013C, A013S, A015C, A015D, A  
 015E, A015L, A015R, A048C, A048E, A048S, A073N  
 , A073T, A074G, A074S, A085C, A085G, A085S, A08  
 5T, A085V, A088M, A088S, A092S, A098G, A114G, A  
 133E, A133P, A133R, A137E, A137H, A137R, A142C  
 , A144D, A144G, A144H, A144K, A144L, A144N, A14  
 4R, A152S, A153G, A153S, A153V, A176C, A179G, A  
 187C, A187F, A187G, A187L, A187N, A187P, A187Q  
 , A187S, A187T, A187V, A187W, A200G, A216C, A21  
 6H, A216R, A216W, A223S, A228S, A230G, A230S, A  
 230T, A230V, A231V, A232C, A232V, A272E, A272G  
 , A272K, A272P, A272R, A273D, A273G, A273H, A27  
 3L, A273P, A273Q, A273R, A273T, A273V, A274H, A  
 274M, A274R, D036E, D036N, D036Q, D036S, D041C  
 , D060G, D099A, D099H, D099Q, D120E, D181A, D18  
 1G, D181H, D181T, D197T, D259A, D259G, D259H, D  
 259N, D259P, D259Q, D259S, D259T, E156A, E156C  
 , E156G, E156H, E156L, E156Q, E156S, E156V, E19  
 5G, E251C, E251I, E251L, E251Q, E251T, F058Y, F  
 189A, F189G, F189H, F189L, F189R, F189S, F189T  
 , F189W, F189Y, F261C, F261D, F261E, F261K, F26  
 1P, G020C, G020E, G020F, G020H, G020L, G020N, G  
 020Q, G020R, G020T, G020Y, G024A, G024D, G024P  
 , G046D, G053A, G053D, G053E, G053F, G053L, G05  
 3M, G053Q, G053R, G053S, G053Y, G097K, G097M, G  
 097R, G131C, G131D, G131R, G146A, G157A, G157N  
 , G157P, G157S, G157T, G160A, G160L, G160R, G16  
 0V, G166C, G166I, G166L, G166Q, G166V, G166W, G  
 169A, G178A, G211E, G211K, G215C, G215D, G215E  
 , G215H, G215L, G215S, G215T, G215W, G258A, G25  
 8D, G258P, G258S, H017I, H039S, H226L, H238N, H  
 238Y, I011L, I011T, I011V, I031C, I031F, I031L  
 , I079E, I079F, I079K, I079L, I079M, I079Q, I07  
 9R, I107L, I111M, I175L, I205A, I205C, I205V, I  
 268L, I268M, K012A, K012C, K012E, K012F, K012G

10

20

30

40

50



, K 0 1 2 H , K 0 1 2 L , K 0 1 2 N , K 0 1 2 S , K 0 1 2 T , K 0 1 2 W , K 0 2  
7 A , K 0 2 7 N , K 0 2 7 S , K 0 2 7 T , K 0 4 3 A , K 0 4 3 C , K 0 4 3 D , K  
0 4 3 E , K 0 4 3 F , K 0 4 3 G , K 0 4 3 H , K 0 4 3 I , K 0 4 3 L , K 0 4 3 M  
, K 0 4 3 N , K 0 4 3 P , K 0 4 3 Q , K 0 4 3 R , K 0 4 3 T , K 0 4 3 V , K 0 4  
3 W , K 0 4 3 Y , K 1 3 6 G , K 1 3 6 H , K 1 4 1 A , K 1 4 1 G , K 1 4 1 H , K  
1 4 1 L , K 1 4 1 M , K 1 4 1 N , K 1 4 1 Q , K 1 4 1 R , K 1 4 1 T , K 1 4 1 V  
, K 1 4 1 W , K 1 7 0 A , K 1 7 0 C , K 1 7 0 G , K 1 7 0 Q , K 1 7 0 S , K 2 1  
3 A , K 2 1 3 G , K 2 1 3 H , K 2 1 3 I , K 2 1 3 L , K 2 1 3 N , K 2 1 3 Q , K  
2 1 3 R , K 2 1 3 S , K 2 1 3 T , K 2 1 3 V , K 2 3 7 A , K 2 3 7 H , K 2 3 7 I  
, K 2 3 7 L , K 2 3 7 N , K 2 3 7 S , K 2 3 7 T , K 2 3 7 V , K 2 5 6 A , K 2 5  
6 C , K 2 5 6 D , K 2 5 6 E , K 2 5 6 G , K 2 5 6 H , K 2 5 6 M , K 2 5 6 P , K  
2 5 6 Q , K 2 5 6 S , K 2 5 6 T , K 2 5 6 V , K 2 5 6 W , K 2 6 5 G , K 2 6 5 H  
, K 2 6 5 N , K 2 6 5 S , K 2 6 5 Y , L 0 1 6 E , L 0 4 2 C , L 0 4 2 F , L 0 4  
2 M , L 0 4 2 V , L 0 7 5 G , L 0 7 5 H , L 0 7 5 I , L 0 7 5 T , L 0 8 2 A , L  
0 8 2 E , L 0 8 2 F , L 0 8 2 H , L 0 8 2 R , L 0 8 2 S , L 0 8 2 T , L 0 9 0 M  
, L 1 3 5 F , L 1 9 6 M , L 2 0 9 A , L 2 0 9 C , L 2 0 9 E , L 2 0 9 G , L 2 0  
9 H , L 2 0 9 R , L 2 0 9 S , L 2 3 3 E , L 2 3 3 G , L 2 3 3 S , L 2 3 5 M , L  
2 3 5 R , L 2 3 5 V , L 2 3 5 W , L 2 5 7 C , L 2 5 7 D , L 2 5 7 E , L 2 5 7 G  
, L 2 5 7 P , L 2 5 7 R , L 2 5 7 W , L 2 6 7 E , L 2 6 7 F , M 0 5 0 L , M 0 5  
0 Y , M 1 1 9 C , M 1 1 9 I , M 1 2 4 L , M 2 2 2 A , M 2 2 2 F , M 2 2 2 L , M  
2 2 2 S , M 2 2 2 T , N 0 2 5 C , N 0 2 5 E , N 0 2 5 P , N 0 5 6 D , N 0 5 6 S  
, N 0 6 1 A , N 0 6 1 C , N 0 6 1 D , N 0 6 1 G , N 0 6 1 I , N 0 6 1 K , N 0 6  
1 L , N 0 6 1 Q , N 0 6 1 R , N 0 6 2 A , N 0 6 2 C , N 0 6 2 H , N 0 6 2 L , N  
0 6 2 Q , N 0 6 2 R , N 0 6 2 S , N 0 6 2 T , N 0 6 2 V , N 0 6 2 Y , N 0 7 6 A  
, N 0 7 6 D , N 0 7 6 E , N 0 7 6 L , N 0 7 6 M , N 0 7 6 P , N 0 7 6 Q , N 0 7  
6 S , N 0 7 6 T , N 0 7 6 V , N 0 7 8 D , N 0 7 8 E , N 0 7 8 F , N 0 7 8 G , N  
0 7 8 H , N 0 7 8 K , N 0 7 8 P , N 0 7 8 Q , N 0 7 8 R , N 1 0 1 D , N 1 0 1 F  
, N 1 0 1 R , N 1 1 7 G , N 1 1 7 R , N 1 1 7 S , N 1 1 8 A , N 1 1 8 D , N 1 1  
8 H , N 1 1 8 Q , N 1 1 8 R , N 1 1 8 S , N 1 1 8 T , N 1 8 4 C , N 1 8 4 E , N  
1 8 4 P , N 1 8 4 R , N 2 1 2 C , N 2 1 2 D , N 2 1 2 E , N 2 1 2 R , N 2 1 2 W  
, N 2 1 8 C , N 2 1 8 D , N 2 1 8 E , N 2 1 8 F , N 2 1 8 G , N 2 1 8 M , N 2 1  
8 P , N 2 1 8 R , N 2 1 8 T , N 2 1 8 V , N 2 1 8 W , N 2 4 0 A , N 2 4 0 G , N  
2 4 0 Q , N 2 4 0 S , N 2 4 0 W , N 2 4 3 C , N 2 4 3 G , N 2 4 3 S , N 2 5 2 D  
, N 2 5 2 E , N 2 5 2 V , N 2 6 9 C , N 2 6 9 H , P 0 0 5 A , P 0 0 5 D , P 0 0  
5 M , P 0 0 5 Q , P 0 0 5 V , P 0 0 5 W , P 0 1 4 A , P 0 1 4 D , P 0 1 4 F , P  
0 1 4 K , P 0 1 4 M , P 0 1 4 R , P 0 1 4 V , P 0 4 0 F , P 0 4 0 R , P 0 4 0 W  
, P 0 5 7 A , P 0 5 7 W , P 1 2 9 E , P 1 2 9 R , P 1 2 9 V , P 1 7 2 E , P 1 7  
2 K , P 1 7 2 R , P 1 9 4 E , P 1 9 4 H , P 1 9 4 R , P 1 9 4 W , P 2 0 1 A , P  
2 0 1 G , P 2 0 1 T , P 2 1 0 E , P 2 1 0 L , P 2 3 9 A , P 2 3 9 G , P 2 3 9 H  
, P 2 3 9 K , P 2 3 9 N , P 2 3 9 R , P 2 3 9 T , Q 0 0 2 D , Q 0 0 2 E , Q 0 0  
2 G , Q 0 0 2 I , Q 0 0 2 K , Q 0 0 2 L , Q 0 0 2 P , Q 0 0 2 R , Q 0 0 2 V , Q  
0 1 0 D , Q 0 1 0 R , Q 0 1 0 W , Q 0 1 9 C , Q 0 1 9 D , Q 0 1 9 E , Q 0 1 9 H  
, Q 0 1 9 L , Q 0 1 9 P , Q 0 1 9 R , Q 0 5 9 A , Q 0 5 9 C , Q 0 5 9 D , Q 0 5  
9 E , Q 0 5 9 L , Q 0 5 9 R , Q 0 5 9 S , Q 0 5 9 T , Q 0 5 9 W , Q 1 0 3 W , Q  
1 8 5 D , Q 1 8 5 E , Q 1 8 5 K , Q 1 8 5 R , Q 1 8 5 W , Q 2 0 6 D , Q 2 0 6 G  
, Q 2 0 6 H , Q 2 0 6 L , Q 2 0 6 V , Q 2 0 6 W , Q 2 1 7 A , Q 2 1 7 C , Q 2 1  
7 E , Q 2 1 7 F , Q 2 1 7 G , Q 2 1 7 H , Q 2 1 7 K , Q 2 1 7 L , Q 2 1 7 R , Q  
2 1 7 V , Q 2 4 5 A , Q 2 4 5 D , Q 2 4 5 E , Q 2 4 5 H , Q 2 4 5 M , Q 2 4 5 R  
, Q 2 7 1 A , Q 2 7 1 C , Q 2 7 1 D , Q 2 7 1 E , Q 2 7 1 F , Q 2 7 1 G , Q 2 7  
1 L , Q 2 7 1 P , Q 2 7 1 R , Q 2 7 1 T , Q 2 7 1 W , Q 2 7 1 Y , Q 2 7 5 A , Q

10

20

30

40

50

2 7 5 F , Q 2 7 5 G , Q 2 7 5 I , Q 2 7 5 L , Q 2 7 5 P , Q 2 7 5 R , R 1 8 6 A  
, R 1 8 6 H , R 1 8 6 I , R 1 8 6 L , R 1 8 6 M , R 1 8 6 V , R 1 8 6 W , S 0 0  
3 D , S 0 0 3 E , S 0 0 3 F , S 0 0 3 K , S 0 0 3 R , S 0 0 9 C , S 0 0 9 E , S  
0 0 9 K , S 0 1 8 C , S 0 1 8 D , S 0 1 8 R , S 0 3 7 A , S 0 3 7 D , S 0 3 7 E  
, S 0 3 7 G , S 0 3 7 H , S 0 3 7 K , S 0 3 7 L , S 0 3 7 P , S 0 3 7 R , S 0 3  
7 Y , S 0 3 8 D , S 0 3 8 M , S 0 3 8 P , S 0 3 8 R , S 0 3 8 Y , S 0 4 9 C , S  
0 4 9 T , S 0 6 3 A , S 0 6 3 C , S 0 6 3 D , S 0 6 3 F , S 0 6 3 L , S 0 6 3 M  
, S 0 6 3 R , S 0 6 3 Y , S 0 8 7 C , S 0 8 7 D , S 0 8 7 K , S 0 8 7 L , S 0 8  
7 M , S 0 8 7 N , S 0 8 7 R , S 0 8 7 Y , S 0 8 9 A , S 0 8 9 C , S 0 8 9 D , S  
0 8 9 E , S 0 8 9 F , S 0 8 9 G , S 0 8 9 H , S 0 8 9 I , S 0 8 9 K , S 0 8 9 P  
, S 0 8 9 R , S 0 8 9 V , S 0 8 9 Y , S 1 0 5 T , S 1 2 5 A , S 1 3 0 C , S 1 3  
0 D , S 1 3 0 E , S 1 3 0 K , S 1 3 0 R , S 1 3 0 W , S 1 4 5 D , S 1 4 5 G , S  
1 4 5 L , S 1 4 5 R , S 1 4 5 T , S 1 5 9 C , S 1 5 9 D , S 1 5 9 L , S 1 5 9 P  
, S 1 5 9 W , S 1 6 1 C , S 1 6 1 E , S 1 6 1 R , S 1 6 2 C , S 1 6 2 E , S 1 6  
2 W , S 1 6 3 A , S 1 7 3 T , S 1 7 3 V , S 1 8 2 C , S 1 8 2 E , S 1 8 2 R , S  
1 8 3 C , S 1 8 3 D , S 1 8 3 P , S 1 8 3 R , S 1 8 8 C , S 1 8 8 D , S 1 8 8 E  
, S 1 8 8 F , S 1 8 8 K , S 1 8 8 L , S 1 8 8 P , S 1 8 8 R , S 1 8 8 W , S 1 9  
0 A , S 1 9 0 C , S 1 9 0 G , S 1 9 0 T , S 1 9 1 G , S 2 0 4 E , S 2 0 4 G , S  
2 0 4 R , S 2 0 4 Y , S 2 0 7 G , S 2 2 4 G , S 2 2 4 T , S 2 3 6 C , S 2 3 6 D  
, S 2 3 6 E , S 2 3 6 G , S 2 4 8 C , S 2 4 8 D , S 2 4 8 E , S 2 4 8 H , S 2 4  
8 R , S 2 4 9 E , S 2 4 9 L , S 2 4 9 R , S 2 6 0 A , S 2 6 0 C , S 2 6 0 E , S  
2 6 0 G , S 2 6 0 K , S 2 6 0 Q , S 2 6 0 R , S 2 6 0 V , S 2 6 0 Y , T 0 2 2 L  
, T 0 2 2 P , T 0 5 5 C , T 0 5 5 D , T 0 5 5 E , T 0 5 5 I , T 0 5 5 K , T 0 5  
5 M , T 0 5 5 R , T 0 5 5 S , T 0 5 5 V , T 0 5 5 W , T 0 5 5 Y , T 0 7 1 A , T  
1 5 8 A , T 1 5 8 D , T 1 5 8 E , T 1 5 8 G , T 1 5 8 L , T 1 5 8 P , T 1 5 8 Q  
, T 1 5 8 R , T 1 5 8 V , T 1 5 8 Y , T 1 6 4 A , T 1 6 4 G , T 1 6 4 K , T 1 6  
4 Q , T 1 6 4 R , T 2 0 8 S , T 2 2 0 A , T 2 4 2 D , T 2 4 2 G , T 2 4 4 D , T  
2 4 4 E , T 2 4 4 R , T 2 5 3 E , T 2 5 3 R , T 2 5 3 Y , T 2 5 4 G , T 2 5 5 C  
, T 2 5 5 D , T 2 5 5 E , T 2 5 5 K , T 2 5 5 R , V 0 0 4 D , V 0 0 4 E , V 0 0  
4 T , V 0 2 6 A , V 0 2 8 I , V 0 2 8 L , V 0 3 0 I , V 0 4 4 A , V 0 4 4 C , V  
0 4 4 P , V 0 4 4 T , V 0 4 5 C , V 0 4 5 D , V 0 4 5 E , V 0 4 5 G , V 0 4 5 I  
, V 0 4 5 N , V 0 4 5 R , V 0 4 5 T , V 0 5 1 H , V 0 7 2 L , V 0 8 1 A , V 0 8  
1 G , V 0 8 1 H , V 0 8 1 R , V 0 8 1 S , V 0 8 4 I , V 0 8 4 M , V 0 9 5 A , V  
0 9 5 C , V 1 4 3 A , V 1 4 3 C , V 1 4 3 E , V 1 4 3 F , V 1 4 3 G , V 1 4 3 H  
, V 1 4 3 Q , V 1 4 3 T , V 1 4 3 W , V 1 4 7 A , V 1 4 7 Q , V 1 4 7 S , V 1 4  
8 I , V 1 4 8 L , V 1 4 9 C , V 1 4 9 I , V 1 4 9 L , V 1 6 5 C , V 1 6 5 L , V  
1 8 0 A , V 1 8 0 C , V 1 8 0 M , V 1 8 0 S , V 1 9 2 C , V 1 9 2 F , V 1 9 2 G  
, V 1 9 2 I , V 1 9 2 Q , V 1 9 2 Y , V 2 0 3 A , V 2 0 3 C , V 2 0 3 D , V 2 0  
3 E , V 2 0 3 G , V 2 0 3 K , V 2 0 3 M , V 2 0 3 R , V 2 0 3 S , V 2 7 0 C , V  
2 7 0 G , V 2 7 0 L , V 2 7 0 P , W 2 4 1 F , W 2 4 1 L , Y 0 0 6 A , Y 0 0 6 C  
, Y 0 0 6 D , Y 0 0 6 E , Y 0 0 6 M , Y 0 0 6 N , Y 0 0 6 R , Y 0 0 6 S , Y 0 2  
1  
C , Y 0 9 1 W , Y 1 0 4 T , Y 1 0 4 V , Y 1 0 4 W , Y 2 1 4 H , Y 2 1 4 Q , Y 2  
6 2 C , Y 2 6 2 D , Y 2 6 2 E , Y 2 6 2 H , Y 2 6 2 I , Y 2 6 2 R , 及び Y 2 6 2  
V、

10

20

30

40

( i i ) A 0 0 1 C , A 0 0 1 E , A 0 0 1 P , A 0 1 5 C , A 0 1 5 E , A 0 4 8  
C , A 0 4 8 E , A 0 7 3 T , A 0 8 5 C , A 0 8 5 G , A 0 8 8 I , A 0 8 8 M , A 1  
1 4 G , A 1 2 8 H , A 1 3 7 R , A 1 4 2 C , A 1 8 7 C , A 1 8 7 F , A 1 8 7 L ,  
A 1 8 7 N , A 1 8 7 P , A 1 8 7 W , A 2 1 6 C , A 2 1 6 H , A 2 3 0 G , A 2 3 0  
S , A 2 7 3 D , A 2 7 3 H , A 2 7 3 P , A 2 7 3 Q , A 2 7 3 R , A 2 7 3 T , A 2

50

7 4 H , D 0 3 6 N , D 0 3 6 Q , D 0 3 6 S , D 0 4 1 C , D 0 4 1 N , D 0 9 9 A ,  
D 0 9 9 H , D 0 9 9 N , D 0 9 9 Q , D 0 9 9 S , D 1 9 7 T , D 2 5 9 H , E 1 5 6  
C , E 1 5 6 G , E 1 5 6 H , E 1 5 6 L , E 1 5 6 Q , F 0 5 8 G , F 1 8 9 A , F 1  
8 9 G , F 1 8 9 H , F 1 8 9 L , F 1 8 9 R , F 1 8 9 S , F 1 8 9 T , F 2 6 1 C ,  
F 2 6 1 D , F 2 6 1 E , G 0 4 6 D , G 0 5 3 E , G 0 5 3 L , G 0 5 3 M , G 0 5 3  
Q , G 0 5 3 R , G 1 3 1 C , G 1 3 1 D , G 1 4 6 A , G 1 5 7 N , G 1 5 7 P , G 1  
5 7 T , G 1 6 0 V , G 1 7 8 A , G 2 1 5 C , G 2 1 5 L , G 2 5 8 A , G 2 5 8 P ,  
H 0 3 9 A , H 0 3 9 S , H 0 6 7 T , H 2 3 8 Y , I 0 1 1 L , I 0 3 1 F , I 0 7 9  
E , I 1 1 1 M , I 1 7 5 L , I 2 6 8 M , K 0 1 2 A , K 0 1 2 C , K 0 1 2 E , K 0  
1 2 F , K 0 1 2 G , K 0 1 2 H , K 0 1 2 L , K 0 1 2 N , K 0 1 2 W , K 0 2 7 N ,  
K 0 2 7 S , K 0 2 7 T , K 0 4 3 C , K 0 4 3 D , K 0 4 3 G , K 0 4 3 L , K 0 4 3  
R , K 0 4 3 W , K 1 3 6 E , K 1 3 6 G , K 1 4 1 G , K 1 4 1 L , K 1 4 1 M , K 1  
4 1 N , K 1 4 1 R , K 1 7 0 C , K 1 7 0 Q , K 2 1 3 V , K 2 5 6 D , K 2 6 5 G ,  
K 2 6 5 N , K 2 6 5 Q , K 2 6 5 S , K 2 6 5 Y , L 0 4 2 C , L 0 4 2 F , L 0 7 5  
G , L 0 7 5 V , L 0 8 2 A , L 0 8 2 E , L 0 8 2 F , L 0 8 2 H , L 0 8 2 R , L 0  
8 2 S , L 0 9 0 M , L 0 9 0 T , L 1 2 6 W , L 2 3 3 E , L 2 3 3 G , L 2 3 3 S ,  
L 2 3 5 V , L 2 5 7 D , L 2 5 7 E , L 2 5 7 G , L 2 5 7 P , L 2 5 7 R , L 2 5 7  
W , M 0 5 0 L , M 2 2 2 A , M 2 2 2 F , M 2 2 2 L , M 2 2 2 S , M 2 2 2 T , N 0  
2 5 R , N 0 5 6 S , N 0 6 2 C , N 0 6 2 H , N 0 6 2 L , N 0 6 2 Q , N 0 6 2 R ,  
N 0 6 2 T , N 0 6 2 Y , N 0 7 6 D , N 0 7 6 P , N 0 7 8 D , N 0 7 8 E , N 0 7 8  
F , N 0 7 8 R , N 0 7 8 V , N 1 1 7 G , N 1 1 8 L , N 1 8 4 P , N 2 6 9 C , N 2  
6 9 H , N 2 6 9 Q , P 0 0 5 V , P 0 0 5 W , P 0 1 4 K , P 0 5 7 A , P 0 5 7 W ,  
P 0 8 6 F , P 1 2 9 V , P 2 0 1 T , P 2 2 5 G , P 2 2 5 S , P 2 3 9 A , P 2 3 9  
G , P 2 3 9 H , P 2 3 9 N , P 2 3 9 T , Q 0 0 2 D , Q 0 0 2 I , Q 0 0 2 K , Q 0  
0 2 L , Q 0 0 2 P , Q 0 0 2 R , Q 0 0 2 V , Q 0 1 0 W , Q 0 1 9 L , Q 0 1 9 P ,  
Q 0 5 9 C , Q 0 5 9 D , Q 0 5 9 E , Q 0 5 9 W , Q 1 8 5 W , Q 2 1 7 C , Q 2 4 5  
A , Q 2 4 5 H , Q 2 7 1 C , Q 2 7 1 D , Q 2 7 1 E , Q 2 7 1 L , Q 2 7 1 W , Q 2  
7 5 A , Q 2 7 5 G , R 1 8 6 M , S 0 0 9 C , S 0 0 9 L , S 0 1 8 C , S 0 1 8 D ,  
S 0 3 7 E , S 0 3 7 H , S 0 3 7 K , S 0 3 7 L , S 0 3 7 P , S 0 3 8 P , S 0 3 8  
Y , S 0 4 9 C , S 0 4 9 N , S 0 6 3 C , S 0 6 3 D , S 0 6 3 F , S 0 6 3 L , S 0  
6 3 Y , S 0 8 7 C , S 0 8 7 K , S 0 8 7 L , S 0 8 7 N , S 0 8 7 R , S 0 8 7 Y ,  
S 0 8 9 D , S 0 8 9 E , S 0 8 9 F , S 0 8 9 G , S 0 8 9 P , S 0 8 9 W , S 1 0 5  
T , S 1 2 5 A , S 1 3 0 C , S 1 4 5 D , S 1 5 9 D , S 1 5 9 P , S 1 6 3 A , S 1  
7 3 V , S 1 8 2 P , S 1 8 3 P , S 1 9 0 A , S 1 9 0 G , S 1 9 1 G , S 2 0 4 E ,  
S 2 2 4 G , S 2 4 8 E , S 2 4 8 H , S 2 4 9 E , S 2 6 0 V , S 2 6 0 Y , T 0 2 2  
P , T 0 5 5 E , T 0 5 5 M , T 0 5 5 R , T 0 5 5 W , T 1 5 8 D , T 1 5 8 E , T 1  
6 4 A , T 1 6 4 G , T 1 6 4 K , T 1 6 4 Q , T 1 6 4 R , T 2 2 0 A , T 2 4 2 G ,  
T 2 4 2 P , T 2 5 3 E , T 2 5 5 C , T 2 5 5 G , V 0 0 4 D , V 0 0 4 T , V 0 4 4  
A , V 0 4 4 L , V 0 4 4 P , V 0 4 4 T , V 0 4 5 C , V 0 4 5 G , V 0 4 5 I , V 0  
4 5 K , V 0 4 5 L , V 0 4 5 N , V 0 4 5 R , V 0 4 5 T , V 0 4 5 V , V 0 5 1 H ,  
V 0 8 1 A , V 0 8 1 G , V 0 8 1 H , V 0 8 1 R , V 0 8 4 S , V 1 4 3 G , V 1 4 7  
A , V 1 4 8 L , V 1 6 5 C , V 1 8 0 S , V 2 0 3 D , V 2 0 3 G , V 2 0 3 S , V 2  
7 0 C , V 2 7 0 G , V 2 7 0 P , V 2 7 0 S , W 2 4 1 L , Y 1 0 4 T , Y 2 1 4 H ,  
Y 2 1 4 Q , Y 2 6 2 D , Y 2 6 2 E , Y 2 6 2 G , Y 2 6 2 H , Y 2 6 2 L , Y 2 6 2  
N , Y 2 6 3 G , 及び Y 2 6 3 W、

10

20

30

40

( i i i ) A 0 0 1 E , A 0 0 1 E - A 0 8 8 T , A 0 0 1 E - A 1 1 6 T , A 0 0  
1 E - A 1 2 8 S , A 0 0 1 E - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V , A 0 0 1 E - G  
0 2 4 E , A 0 0 1 E - G 1 3 1 H , A 0 0 1 E - G 1 3 1 H - G 1 6 9 A - N 2 4 3 V  
, A 0 0 1 E - G 1 6 9 A , A 0 0 1 E - K 0 4 3 Y , A 0 0 1 E - K 2 5 6 R , A 0 0  
1 E - L 2 5 7 G , A 0 0 1 E - N 0 7 6 D , A 0 0 1 E - N 0 7 6 D - N 1 0 9 G - A

50

1 2 8 S , A 0 0 1 E - N 1 0 9 G , A 0 0 1 E - N 2 1 8 S , A 0 0 1 E - N 2 4 3 V  
, A 0 0 1 E - Q 1 0 3 H , A 0 0 1 E - Q 2 0 6 D , A 0 0 1 E - S 0 3 3 T , A 0 0  
1 E - S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - N 2 1 8 S , A 0 0 1 E - S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - N  
2 4 3 V , A 0 0 1 E - S 0 6 3 G , A 0 0 1 E - S 1 6 2 G , A 0 0 1 E - S 2 4 8 N  
, A 0 0 1 E - S 2 4 9 A , A 0 0 1 E - T 1 5 8 S , A 0 8 8 T - A 1 2 8 S , A 0 8  
8 T - G 1 6 9 A , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - Q 2 0 6 D , A 1 1 6 T - G  
1 6 9 A , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S , A 1 1 6 T - Q 2 0 6 D , A 1 2 8 S , A 1 2 8 S  
- G 1 3 1 H , A 1 2 8 S - G 1 6 9 A , A 1 2 8 S - N 2 1 8 S , A 1 2 8 S - N 2 4  
3 V , A 1 2 8 S - Q 2 0 6 D , G 0 2 4 E , G 0 2 4 E - A 0 8 8 T , G 0 2 4 E - A  
1 2 8 S , G 0 2 4 E - G 1 3 1 H , G 0 2 4 E - K 0 4 3 Y , G 0 2 4 E - N 0 7 6 D  
, G 0 2 4 E - N 2 1 8 S , G 0 2 4 E - Q 1 0 3 H , G 0 2 4 E - Q 2 0 6 D , G 0 2  
4 E - S 0 3 3 T , G 0 2 4 E - S 0 6 3 G , G 0 2 4 E - S 1 6 2 G , G 0 2 4 E - S  
2 4 8 N , G 0 2 4 E - S 2 4 9 A , G 1 3 1 H - G 1 6 9 A , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S  
, G 1 3 1 H - N 2 4 3 V , G 1 3 1 H - Q 2 0 6 D , G 1 6 9 A , G 1 6 9 A - K 2 5  
6 R , G 1 6 9 A - L 2 5 7 G , G 1 6 9 A - N 2 1 8 S , G 1 6 9 A - N 2 4 3 V , G  
1 6 9 A - Q 2 0 6 D , G 1 6 9 A - S 2 4 8 N , G 1 6 9 A - S 2 4 9 A , K 0 4 3 Y  
, K 0 4 3 Y - A 1 1 6 T , K 0 4 3 Y - A 1 2 8 S , K 0 4 3 Y - G 1 3 1 H , K 0 4  
3 Y - G 1 6 9 A , K 0 4 3 Y - L 2 5 7 G , K 0 4 3 Y - N 0 7 6 D , K 0 4 3 Y - N  
1 0 9 G , K 0 4 3 Y - N 2 1 8 S , K 0 4 3 Y - Q 1 0 3 H , K 0 4 3 Y - Q 2 0 6 D  
, K 0 4 3 Y - S 0 6 3 G , K 0 4 3 Y - S 1 6 2 G , K 0 4 3 Y - S 2 4 8 N , K 0 4  
3 Y - S 2 4 9 A , K 0 4 3 Y - T 1 5 8 S , N 0 7 6 D , N 0 7 6 D - A 0 8 8 T , N  
0 7 6 D - A 1 1 6 T , N 0 7 6 D - A 1 2 8 S , N 0 7 6 D - G 1 3 1 H , N 0 7 6 D  
- G 1 6 9 A , N 0 7 6 D - N 2 1 8 S , N 0 7 6 D - N 2 4 3 V , N 0 7 6 D - Q 1 0  
3 H , N 0 7 6 D - Q 2 0 6 D , N 0 7 6 D - S 1 6 2 G , N 0 7 6 D - S 2 4 8 N , N  
0 7 6 D - S 2 4 9 A , N 1 0 9 G - G 1 6 9 A , N 1 0 9 G - Q 2 0 6 D , N 1 0 9 G  
- S 2 4 8 N , N 2 1 8 S , N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , N 2 1  
8 S - S 2 4 8 N , N 2 1 8 S - S 2 4 9 A , P 0 4 0 E - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - G  
1 3 1 H , Q 1 0 3 H , Q 1 0 3 H - G 1 6 9 A , Q 1 0 3 H - Q 2 0 6 D , Q 2 0 6 D  
, Q 2 0 6 D - K 2 5 6 R , Q 2 0 6 D - L 2 5 7 G , Q 2 0 6 D - N 2 1 8 S , Q 2 0  
6 D - N 2 4 3 V , Q 2 0 6 D - S 2 4 8 N , Q 2 0 6 D - S 2 4 9 A , S 0 1 8 T - Y  
0 2 1 N - S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R  
, S 0 3 3 T , S 0 3 3 T - A 0 8 8 T , S 0 3 3 T - A 1 1 6 T , S 0 3 3 T - A 1 2  
8 S , S 0 3 3 T - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - N 2 4 3 P , S 0 3 3 T - G 1 3 1 H , S  
0 3 3 T - G 1 6 9 A , S 0 3 3 T - K 0 4 3 Y , S 0 3 3 T - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T  
- L 2 5 7 G , S 0 3 3 T - N 0 7 6 D , S 0 3 3 T - N 0 7 6 D - A 1 2 8 S - N 2 1  
8 S , S 0 3 3 T - N 0 7 6 D - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S  
2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T - N 1 0 9 G , S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S  
- N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T - N 2 1 8 S , S 0 3 3 T - P 0 4  
0 E - Q 1 0 3 H - N 1 0 9 G , S 0 3 3 T - Q 1 0 3 H - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H , S  
0 3 3 T - Q 2 0 6 D , S 0 3 3 T - S 0 6 3 G , S 0 3 3 T - S 0 6 3 G - Q 1 0 3 H  
- N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - G 1 6 9 A - N 2 4 3 P , S 0 3 3 T - S 0 6  
3 G - Q 1 0 3 H - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - G 1 6 9 A - N 2 4 3 V , S  
0 3 3 T - S 1 6 2 G , S 0 3 3 T - S 2 4 8 N , S 0 3 3 T - S 2 4 9 A , S 0 6 3 G  
- A 1 1 6 T , S 0 6 3 G - G 1 3 1 H , S 0 6 3 G - G 1 6 9 A , S 0 6 3 G - N 1 0  
9 G - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H , S 0 6 3 G - N 2 1 8 S , S 0 6 3 G - N 2 4 3 V , S  
0 6 3 G - Q 2 0 6 D , S 0 6 3 G - S 2 4 9 A , S 1 6 2 G - G 1 6 9 A , S 1 6 2 G  
- N 2 1 8 S , S 1 6 2 G - Q 2 0 6 D , S 1 6 2 G - S 2 4 9 A , S 2 4 8 N - K 2 5  
6 R , S 2 4 8 N - S 2 4 9 A , S 2 4 9 A - K 2 5 6 R , S 2 4 9 A - L 2 5 7 G , T  
1 5 8 S - G 1 6 9 A , T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , T 1 5 8 S - Q 2 0 6 D , 及 び T 1 5  
8 S - S 1 6 2 G、

10

20

30

40

50

( i v ) A 0 0 1 E , A 0 0 1 E - A 0 8 8 T , A 0 0 1 E - A 1 1 6 T , A 0 0 1 E - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V , A 0 0 1 E - G 0 2 4 E , A 0 0 1 E - G 1 3 1 H - G 1 6 9 A - N 2 4 3 V , A 0 0 1 E - G 1 6 9 A , A 0 0 1 E - K 0 4 3 Y , A 0 0 1 E - L 2 5 7 G , A 0 0 1 E - N 0 7 6 D , A 0 0 1 E - N 0 7 6 D - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S , A 0 0 1 E - N 1 0 9 G , A 0 0 1 E - Q 1 0 3 H , A 0 0 1 E - Q 2 0 6 D , A 0 0 1 E - S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - N 2 1 8 S , A 0 0 1 E - S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V , A 0 0 1 E - S 2 4 8 N , A 0 0 1 E - T 1 5 8 S , A 0 8 8 T - G 1 6 9 A , A 0 8 8 T - Q 2 0 6 D , A 1 1 6 T - G 1 6 9 A , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S , A 1 1 6 T - Q 2 0 6 D , A 1 2 8 S - G 1 3 1 H , A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 2 8 S - Q 2 0 6 D , G 0 2 4 E - K 0 4 3 Y , G 0 2 4 E - N 0 7 6 D , G 0 2 4 E - Q 2 0 6 D , G 1 3 1 H - G 1 6 9 A , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S , G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , G 1 3 1 H - Q 2 0 6 D , G 1 3 1 H - S 2 4 8 N , G 1 6 9 A - K 2 5 6 R , G 1 6 9 A - N 2 1 8 S , G 1 6 9 A - N 2 4 3 V , G 1 6 9 A - Q 2 0 6 D , G 1 6 9 A - S 2 4 9 A , K 0 4 3 Y - G 1 6 9 A , K 0 4 3 Y - N 0 7 6 D , K 0 4 3 Y - N 2 1 8 S , K 0 4 3 Y - Q 2 0 6 D , N 0 6 1 P - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V , N 0 6 1 P - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V , N 0 6 1 S - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - S 2 6 0 P , N 0 6 1 S - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V , N 0 7 6 D , N 0 7 6 D - G 1 3 1 H , N 0 7 6 D - L 2 5 7 G , N 0 7 6 D - N 1 0 9 G , N 0 7 6 D - Q 1 0 3 H , N 0 7 6 D - Q 2 0 6 D , N 0 7 6 D - S 2 4 9 A , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - G 1 6 9 A , N 1 0 9 G - N 2 4 3 P - S 2 4 8 A - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - N 2 4 3 P - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 A - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 2 1 8 S - S 2 4 9 A , N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , P 0 4 0 E - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H , Q 1 0 3 H - Q 2 0 6 D , Q 2 0 6 D , Q 2 0 6 D - K 2 5 6 R , Q 2 0 6 D - L 2 5 7 G , Q 2 0 6 D - N 2 1 8 S , Q 2 0 6 D - S 2 4 8 N , Q 2 0 6 D - S 2 4 9 A , S 0 0 9 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - K 1 4 1 R - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 0 0 9 T - S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - A 1 2 8 S - K 1 4 1 R - N 2 4 3 V , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - N 0 6 1 S - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 6 0 P , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - N 0 6 1 S - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 6 0 P , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T , S 0 3 3 T - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - N 2 4 3 P , S 0 3 3 T - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V , S 0 3 3 T - G 1 6 9 A , S 0 3 3 T - N 0 7 6 D - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S , S 0 3 3 T - N 0 7 6 D - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 P - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T - P 0 4 0 E - Q 1 0 3 H - N 1 0 9 G , S 0 3 3 T - Q 1 0 3 H - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H , S 0 3 3 T - S 0 6 3 G - Q 1 0 3 H - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - G 1 6 9 A - N 2 4 3 P , S 0 3 3 T - S 0 6 3 G - Q 1 0 3 H - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - G 1 6 9 A - N 2 4 3 V , S 0 6 3 G - G 1 3 1 H , S 0 6 3 G - G 1 6 9 A , S 0 6 3 G - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H , S 0 6 3 G - Q 2 0 6 D , S 1 6 2 G - Q 2 0 6 D , T 1 5 8 S - Q 2 0 6 D , 及び T 1 5 8 S - S 1 6 2 G、

10

20

30

40

( v ) A 0 0 1 E - A 0 8 8 T , A 0 0 1 E - A 1 2 8 S , A 0 0 1 E - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V , A 0 0 1 E - G 0 2 4 E , A 0 0 1 E - G 0 2 4 E - S 2 0 4 E - Q 2 0 6 D , A 0 0 1 E - G 1 3 1 H - G 1 6 9 A - N 2 4 3 V , A 0 0 1 E - K 0 4 3 Y , A 0 0 1 E - N 0 7 6 D , A 0 0 1 E - N 0 7 6 D - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S

50

, A 0 0 1 E - N 2 1 8 S , A 0 0 1 E - N 2 4 3 V , A 0 0 1 E - Q 1 0 3 H , A 0 0 1 E - Q 2 0 6 D , A 0 0 1 E - S 0 3 3 T , A 0 0 1 E - S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - N 2 1 8 S , A 0 0 1 E - S 1 6 2 G , A 1 1 6 T - Q 2 0 6 D , A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 2 8 S - Q 2 0 6 D , G 0 2 4 E - Q 2 0 6 D , G 1 3 1 H - Q 2 0 6 D , K 0 4 3 Y - G 1 3 1 H , K 0 4 3 Y - Q 1 0 3 H , K 0 4 3 Y - Q 2 0 6 D , K 0 4 3 Y - S 1 6 2 G , N 0 6 1 S - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 6 0 P , N 0 7 6 D - A 1 2 8 S , N 0 7 6 D - Q 2 0 6 D , N 0 7 6 D - S 1 6 2 G , N 0 7 6 D - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - N 2 4 3 P - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - Q 2 0 6 D , N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , P 0 4 0 E - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H , Q 1 0 3 H - Q 2 0 6 D , Q 2 0 6 D - K 2 5 6 R , Q 2 0 6 D - N 2 4 3 V , Q 2 0 6 D - S 2 4 8 N , Q 2 0 6 D - S 2 4 9 A , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - N 0 6 1 S - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 6 0 P , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - N 0 6 1 S - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 6 0 P , S 0 3 3 T - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - N 2 4 3 P , S 0 3 3 T - N 0 7 6 D - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S , S 0 3 3 T - N 0 7 6 D - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T - P 0 4 0 E - Q 1 0 3 H - N 1 0 9 G , S 0 3 3 T - S 0 6 3 G - Q 1 0 3 H - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - G 1 6 9 A - N 2 4 3 P , S 0 6 3 G - Q 2 0 6 D , S 1 6 2 G - Q 2 0 6 D , 及び T 1 5 8 S - Q 2 0 6 D、

10

20

( v i ) A 0 0 1 E , A 0 0 1 E - A 1 2 8 S , A 0 0 1 E - G 0 2 4 E , A 0 0 1 E - G 1 3 1 H , A 0 0 1 E - G 1 6 9 A , A 0 0 1 E - K 0 4 3 Y , A 0 0 1 E - K 2 5 6 R , A 0 0 1 E - L 2 5 7 G , A 0 0 1 E - N 0 7 6 D , A 0 0 1 E - N 1 0 9 G , A 0 0 1 E - N 2 1 8 S , A 0 0 1 E - N 2 4 3 V , A 0 0 1 E - Q 1 0 3 H , A 0 0 1 E - Q 2 0 6 D , A 0 0 1 E - S 0 3 3 T , A 0 0 1 E - S 0 6 3 G , A 0 0 1 E - S 1 6 2 G , A 0 0 1 E - S 2 4 8 N , A 0 0 1 E - S 2 4 9 A , A 0 0 1 E - T 1 5 8 S , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - Q 2 0 6 D , A 1 1 6 T - A 1 2 8 S , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H , A 1 1 6 T - Q 2 0 6 D , A 1 1 6 T - S 2 4 8 N , A 1 2 8 S , A 1 2 8 S - G 1 3 1 H , A 1 2 8 S - Q 2 0 6 D , G 0 2 4 E , G 0 2 4 E - N 0 7 6 D , G 0 2 4 E - N 1 0 9 G , G 0 2 4 E - Q 2 0 6 D , G 1 3 1 H , G 1 3 1 H - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - Q 2 0 6 D , G 1 6 9 A - K 2 5 6 R , G 1 6 9 A - Q 2 0 6 D , K 0 4 3 Y , K 0 4 3 Y - A 0 8 8 T , K 0 4 3 Y - A 1 1 6 T , K 0 4 3 Y - A 1 2 8 S , K 0 4 3 Y - G 1 3 1 H , K 0 4 3 Y - G 1 6 9 A , K 0 4 3 Y - K 2 5 6 R , K 0 4 3 Y - L 2 5 7 G , K 0 4 3 Y - N 0 7 6 D , K 0 4 3 Y - N 1 0 9 G , K 0 4 3 Y - N 2 1 8 S , K 0 4 3 Y - N 2 4 3 V , K 0 4 3 Y - Q 1 0 3 H , K 0 4 3 Y - S 0 6 3 G , K 0 4 3 Y - S 1 6 2 G , K 0 4 3 Y - S 2 4 8 N , K 0 4 3 Y - S 2 4 9 A , K 0 4 3 Y - T 1 5 8 S , N 0 7 6 D - A 0 8 8 T , N 0 7 6 D - A 1 1 6 T , N 0 7 6 D - A 1 2 8 S , N 0 7 6 D - G 1 3 1 H , N 0 7 6 D - G 1 6 9 A , N 0 7 6 D - N 1 0 9 G , N 0 7 6 D - N 2 1 8 S , N 0 7 6 D - N 2 4 3 V , N 0 7 6 D - Q 1 0 3 H , N 0 7 6 D - Q 2 0 6 D , N 0 7 6 D - S 2 4 8 N , N 0 7 6 D - T 1 5 8 S , N 1 0 9 G , N 1 0 9 G - G 1 6 9 A , N 1 0 9 G - Q 2 0 6 D , N 1 0 9 G - S 1 6 2 G , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S , N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , Q 1 0 3 H , Q 1 0 3 H - A 1 2 8 S , Q 1 0 3 H - G 1 3 1 H , Q 1 0 3 H - Q 2 0 6 D , Q 1 0 3 H - S 2 4 8 N , Q 1 0 3 H - S 2 4 9 A , Q 1 0 3 H - T 1 5 8 S , Q 2 0 6 D , Q 2 0 6 D - K 2 5 6 R , Q 2 0 6 D - L 2 5 7 G , Q 2 0 6 D - N 2 1 8 S , Q 2 0 6 D - N 2 4 3 V , Q 2 0 6 D - S 2 4 8 N , Q 2 0 6 D - S 2 4 9 A , S 0 3 3 T , S 0 3 3 T - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T - S 0 6 3 G , S 0 3 3 T - S 2 4 9 A , S 0 6 3 G - A 0 8 8 T , S 0 6 3 G - G 1 3 1 H , S 0 6 3 G - G 1 6 9 A , S 0 6 3 G - N 0 7 6 D , S 0 6 3 G - N 1 0 9 G , S 0 6 3 G - N 2 1 8 S , S 0 6 3 G - Q 1 0 3 H , S 0 6 3 G - Q 2 0 6 D , S 1 6 2 G - Q 2 0 6 D ,

30

40

50

S 1 6 2 G - S 2 4 9 A , S 2 4 8 N - S 2 4 9 A , S 2 4 9 A - K 2 5 6 R , T 1 5 8 S - Q 2 0 6 D , 及び T 1 5 8 S - S 2 4 9 A、

( v i i ) G 1 3 1 H - S 1 6 2 G , G 1 3 1 H - S 2 4 8 N , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S , K 0 4 3 Y - G 1 3 1 H , K 0 4 3 Y - S 1 6 2 G , Q 1 0 3 H - A 1 2 8 S , Q 1 0 3 H - N 2 1 8 S , S 0 3 3 T - Q 1 0 3 H , S 0 6 3 G - A 0 8 8 T , S 0 6 3 G - G 1 3 1 H , S 0 6 3 G - S 2 4 8 N , 及び T 1 5 8 S - S 1 6 2 G、

( v i i i ) A 0 1 5 S - A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - A 0 9 8 S - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 0 9 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - G 1 4 6 C , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G - L 2 6 7 M , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - I 2 6 8 V , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - Q 2 7 1 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - Q 2 7 5 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G ,

10

20

30

40

50

A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8  
T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 3 8 E - N 2  
1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H ,  
A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - K 1 4 1 E - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7  
G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - K 2  
3 7 R - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R ,  
A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8  
S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2  
5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G ,  
A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1  
H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2  
4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V -  
S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8  
N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2  
4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V -  
S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8  
T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2  
1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T -  
G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - K 2 5 6  
R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - G 1  
3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N -  
K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8  
N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - I 2 3 4 T - S 2  
4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R -  
L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8  
T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1  
5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H -  
T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - G 1  
3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G ,  
A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6  
R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2  
4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N -  
K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6  
R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0  
8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T -  
G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1  
H - V 1 4 9 L - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0  
8 8 T - I 1 0 7 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - A 2 2 3 G - S 2 4 8 N -  
K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - I 1 0 7 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8  
N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - I 1 0 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2  
1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - K 2 1 3 N - N 2 4 3 V -  
S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - L 2 5 7  
G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - A 2 3 2 S - N 2 4 3 V - K 2  
5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - D 1 4 0 G - S 2 4 8 N -  
L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - D 1 4 0 G - T 1 5 8  
S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1  
3 1 H - K 1 4 1 E - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H -  
N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8  
S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2

10

20

30

40

50







8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L  
2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T  
- T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - T 1 5  
8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T  
1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T  
- T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5  
8 S - N 2 1 8 S - Q 2 4 5 K - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N  
2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R  
, A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - T 1 5  
8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S  
2 4 8 N - L 2 5 7 G - Q 2 7 5 K , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T  
- T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4  
8 N , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T  
1 5 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - V 2 0 3 I - N 2 1 8 S  
- K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - V 1 4 7 I - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5  
6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - Y 1 0 4 H - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N  
2 4 3 V , A 1 1 6 T - D 1 4 0 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N  
, A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - K 1 4 1 E - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5  
7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N  
2 4 3 V , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T  
- G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3  
1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N  
2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H  
- N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5  
6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - W 2 4 1 R - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K  
2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R  
, A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3  
1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T  
1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S  
- S 2 4 8 N - L 2 5 7 G - N 2 6 9 D , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1  
8 S - S 2 4 8 N - Q 2 7 1 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K  
2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T  
- G 1 3 1 H - V 1 3 9 I - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - G 1 3  
1 H - V 1 5 0 A - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A  
1 1 6 T - G 1 5 7 E - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T  
- K 1 4 1 E - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1  
6 T - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - N  
2 1 8 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G  
, A 1 1 6 T - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , A 1 1  
6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K  
2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G  
, A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - T 1 5  
8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , G 0 2 4 S - G 0 5 3 S - N 0 7 8 S - G  
0 9 7 A - N 1 0 1 S , G 0 5 3 S - A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H  
- T 1 5 8 S - G 1 6 9 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , G 0 6  
5 D - A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , G 1 3 1 H - K 1 4 1 R - T  
1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , G 1 3 1 H - K 2 5 6 R , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S  
- K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - N 2 1  
8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , G  
1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N

10

20

30

40

50

, G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 0 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - I 2 6 8 V , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G - N 2 6 9 S , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N , I 1 0 7 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , I 1 0 7 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , K 2 5 6 R , K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , L 0 9 0 I - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V , L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - W 2 4 1 R - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G - Q 2 7 1 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - I 2 3 4 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - K 1 4 1 E - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - W 2 4 1 R - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 3 7 R - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - K 1 4 1 E - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , S 0 0 3 P - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8

10

20

30

40

50

S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , S 0 0 3 P - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1  
 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , S 0 0 3 P - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S -  
 L 2 5 7 G , S 0 0 3 P - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , S 1 0 5 H - W 1 0 6 G - I 1 0 7  
 L - I 1 0 8 S - N 1 0 9 A - G 1 1 0 A - I 1 1 1 S - E 1 1 2 N - W 1 1 3 G - A 1  
 1 4 P , S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , T 1 5 8 S , T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , T 1 5 8 S -  
 N 2 1 8 S , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 3 3  
 S - S 2 4 8 N , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2  
 4 3 V - K 2 5 6 R , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , T 1 5 8 S -  
 N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8  
 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , T 1  
 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N -  
 K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , T 1 5 8  
 S - S 2 4 8 N , T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , V 0 0 4 A - A 0  
 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , V 0 0 4 L -  
 A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , Y 0 0 6  
 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , 及び Y 1 0 4 H - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H -  
 N 2 4 3 V - S 2 4 8 N、

10

( i x ) A 0 8 8 T - A 0 9 8 S - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7  
 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1  
 3 1 H - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V ,  
 A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8  
 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1  
 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T -  
 G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1  
 H - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2  
 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T -  
 A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1  
 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1  
 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H -  
 T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8  
 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0  
 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G ,  
 A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - V 1 5 0 A - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7  
 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - K 2  
 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T -  
 N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - N 2 1 8  
 S - N 2 4 3 V - Q 2 7 1 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2  
 4 8 N , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T -  
 A 1 1 6 T - T 1 5 8 S , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S , A 0 8 8 T - A 1 1 6  
 T - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R - L 2  
 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G ,  
 A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - A 1 1 6  
 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1  
 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S -  
 N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 3 8 E - N 2 1 8 S - N 2 4 3  
 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - G 1 3 1 D - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0  
 8 8 T - G 1 3 1 H , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H -  
 N 2 1 8 S - K 2 3 7 R - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8  
 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2  
 5 6 R , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G ,

20

30

40

50

A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3  
V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - G 1  
3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S -  
N 2 1 8 S - I 2 3 4 T - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8  
S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1  
3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H -  
T 1 5 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6  
R , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - G 1  
3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H -  
V 1 4 9 L - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8  
T - I 1 0 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2  
5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - K 2 1 3 N - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R ,  
A 0 8 8 T - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1  
H - D 1 4 0 G - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1  
3 1 H - K 1 4 1 E - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H -  
L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3  
V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1  
3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - Q 2 7 5 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G -  
A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6  
T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1  
0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T -  
N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0  
8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T -  
N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G - I 2 6 8  
V , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2  
4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S -  
N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1  
H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1  
0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G -  
A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - V 1 4 9 A - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8  
T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - W 2 4 1 L - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2  
5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - M 1 2 4 I - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S -  
N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8  
S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2  
1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T -  
N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8  
N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0  
8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T -  
N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 2 D - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7  
G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2  
5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V -  
L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8  
N , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2  
5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N ,  
A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G - Q 2 7 1  
P , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - V 1 4 8 A - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , A 0  
8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 3 7 E - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N -  
K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - D 1 4 0 G - N 2 4 3 V , A 0 8 8  
T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - A 1 5 2 S - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2

10

20

30

40

50

5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - D 1 4 0 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V -  
S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - K 2 5 6 R - L 2 5 7  
G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1  
0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S -  
L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , A 0 8 8  
T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0  
8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G -  
G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8  
S - L 2 3 3 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1  
5 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S -  
N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1  
H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1  
3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - W 2 4 1 R - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T -  
N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8  
T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1  
0 9 G - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G ,  
A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9  
G - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - T 2 5 5 K - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1  
0 9 G - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V -  
S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7  
G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2  
1 8 S - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V -  
L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8  
N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 0  
8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G -  
T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8  
S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - Q 2 7 5 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - S 2  
4 8 N , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T -  
N 1 0 9 G - W 2 4 1 R - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3  
V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2  
5 7 G , A 0 8 8 T - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T -  
S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8  
T - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G - I 2 6 8 V , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , A 0  
8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S -  
L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8  
S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2  
4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - Q 2 4 5 K -  
S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6  
R , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1  
5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G - Q 2 7 5 K , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S -  
N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7  
G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2  
4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T -  
T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8  
N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1  
5  
8 S - V 2 0 3 I - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - Y 1 0 4 H - A  
1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - Y 1 0 4 H - N 1 0 9 G  
- A 1 1 6 T - A 1 5 3 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G - N 2 6  
9 D , A 0 8 8 T - Y 1 0 4 H - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - A 1 3 7 E - T 1 5 8 S - N

10

20

30

40

50

2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 9 8 S - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S  
 - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - D 1 4  
 0 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - K  
 1 4 1 E - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H  
 - N 2 1 8 S - W 2 4 1 R - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1  
 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R - L  
 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , A 1 1 6 T  
 - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3  
 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - V 1 3 9 I - N  
 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - G 1 5 7 E - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V  
 - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - N 2 1  
 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - S  
 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - L 2 5 7 G  
 - Q 2 7 1 R , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5  
 7 G , G 0 5 3 S - A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - G  
 1 6 9 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , G 0 6 5 D - A 0 8 8 T  
 - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , G 1 3  
 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , G 1 3 1 H - S  
 2 4 8 N - K 2 5 6 R , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R  
 , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , K 2 5 6 R , K 2 5 6 R - L 2 5  
 7 G , L 0 9 0 I - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V , L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A  
 1 1 6 T - G 1 3 1 H , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G  
 - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1  
 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - A  
 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R  
 , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - I 2 3 4 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5  
 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A  
 1 1 6 T - N 2 1 8 S - W 2 4 1 R - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G  
 , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5  
 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K  
 2 3 7 R - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S  
 - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V , N 1 0  
 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - S  
 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - A 1 3 7 V - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S  
 - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - K 1 4 1 E - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3  
 1 H - T 1 5 8 S , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L  
 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G  
 , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - Q 2 7 1 R , N 1 0 9 G - N 2 1  
 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N  
 1 0 9 G - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G  
 - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4  
 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K  
 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G  
 , N 2 4 3 V , P 0 1 4 L - A 0 1 5 L - L 0 1 6 C - H 0 1 7 T - S 0 1 8 L - Q 0 1  
 9 K - G 0 2 0 A - Y 0 2 1 T - T 0 2 2 L - G 0 2 3 E , S 0 0 3 P - N 1 0 9 G - A  
 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , S 0 0 3 P - N 1 0 9 G  
 - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - L 2 5 7 G , S 0 0 3 P - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , S 1 0  
 5 H - W 1 0 6 G - I 1 0 7 L - I 1 0 8 S - N 1 0 9 A - G 1 1 0 A - I 1 1 1 S - E  
 1 1 2 N - W 1 1 3 G - A 1 1 4 P , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R  
 , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4

10

20

30

40

50



8 N - K 2 5 6 R , T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , T 1 5 8 S - S 2 4 8 N , T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , V 0 0 4 A - A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , V 0 0 4 A - A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , V 0 0 4 M - A 1 1 6 T - V 1 4 8 A - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , Y 0 0 6 H - N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , Y 1 0 4 H - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N , Y 1 0 4 H - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , 及び Y 1 0 4 H - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G、

( x ) A 0 4 5 S - S 2 3 6 G , A 0 4 5 S - S 2 3 6 Y , A 1 3 4 T - S 2 6 0 G , G 0 2 4 A - S 0 3 7 W , I 0 3 1 V - S 0 3 8 W , I 1 1 5 T - S 1 8 3 T , I 1 1 5 V - N 1 8 4 Y , N 0 2 5 K - P 1 2 9 K , N 0 2 5 K - P 1 2 9 R , N 0 2 5 K - S 0 3 7 P , N 0 6 1 D - S 2 6 0 I , Q 0 1 0 L - S 0 3 7 P , Q 0 1 0 R - S 0 3 7 T , Q 0 1 9 L - S 2 6 0 N , Q 0 1 9 L - S 2 6 0 P , S 0 3 7 P - T 2 5 4 S , S 1 6 1 P - T 2 5 3 A , 及び S 1 6 2 L - D 1 8 1 H、

( x i ) A 0 4 5 S - S 2 3 6 G , A 0 4 5 S - S 2 3 6 Y , A 1 3 3 V - S 2 6 0 N , A 1 3 4 T - S 2 6 0 G , G 0 2 4 A - S 0 3 7 W , I 0 3 1 V - S 0 3 8 W , I 1 1 5 T - S 1 8 3 T , I 1 1 5 V - N 1 8 4 Y , N 0 2 5 K - P 1 2 9 R , N 0 2 5 K - S 0 3 7 P , N 0 6 1 D - S 2 6 0 I , Q 0 1 0 R - S 0 3 7 T , Q 0 1 9 L - S 2 6 0 N , Q 0 1 9 L - S 2 6 0 P , 及び S 1 6 2 L - D 1 8 1 H、並びに、

( x i i ) A 0 4 5 S - S 2 3 6 G , A 0 4 5 S - S 2 3 6 Y , I 1 1 5 T - S 1 8 3 T , N 0 2 5 K - S 0 3 7 P , N 0 6 1 S - S 2 6 0 P , Q 0 1 0 L - S 0 3 7 P , Q 0 1 0 R - S 0 3 7 T , Q 0 1 9 L - S 2 6 0 N , S 0 3 7 P - T 2 5 4 S , 及び S 1 6 1 P - S 2 6 0 P。ここで、この変異体の各アミノ酸位置は、配列番号2のアミノ酸配列におけるアミノ酸位置に対応させることにより番号付けされる。

#### 【 0 1 4 0 】

本発明の第九態様による変異体は、配列番号2、配列番号4又は配列番号6に記載のプロテアーゼとそれぞれ比較して向上したタンパク質分解活性及び/又は向上したクリーニング活性を有し得る。本発明の第九態様による変異体は、配列番号2、配列番号4又は配列番号6に記載のプロテアーゼのものを超える、タンパク質分解活性(例えば、A A P F アッセイ)又はクリーニングアッセイ(例えば、B M I、植物又は卵の微小標本アッセイ)における性能指数を有し得る。本発明の第九態様による変異体は、B P N' スブチリシンプロテアーゼ(配列番号2)のプロテアーゼ変異体であり得る。

#### 【 0 1 4 1 】

第二十一態様では、本発明は、親プロテアーゼの変異体である単離された又は非自然発生型の冷水プロテアーゼを提供し、上記冷水プロテアーゼは、下記の群(a)及び(b)から選択される合計で3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14又は15個の変異を含み、ここで、少なくとも1つの変異は群(a)から選択される:

( a ) 1、9、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、33、43、76、102、109、137、141、158、169、204、210、218、243、248、249、256、257、260及び269、並びに、

( b ) 24、25、40、52、53、55、58、59、61、62、63、68、78、86、87、88、89、92、96、97、100、101、103、104、106、111、114、115、116、117、118、123、124、125、126、128、129、130、131、132、133、134、144、145、159、161、162、167、194、203、206、213、217、227、232、239、240、242、265、267及び275。ここで、アミノ酸位置は、配列番号2に対応させることにより番号付けされる。本発明の第二十一態様による親プロテアーゼは、配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の同一性を有するアミノ酸配列を含み得、本発明の第二十一態様による変異体は、下記

の群 ( a ) 及び ( b ) から選択される合計で 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 又は 15 個の変異を含み、ここで、少なくとも 1 つの変異は群 ( a ) から選択される：

( a ) A 1 E / T、S 9 / T、P 1 4 L、A 1 5 L、L 1 6 C、H 1 7 T、S 1 8 L / T、Q 1 9 K、G 2 0 A、Y 2 1 N / T、T 2 2 L、G 2 3 E、S 3 3 T、K 4 3 Y、N 7 6 D、G 1 0 2 A、N 1 0 9 A / S / G、A 1 3 7 V、K 1 4 1 R、T 1 5 8 S、G 1 6 9 A、S 2 0 4 E、P 2 1 0 S、N 2 1 8 S、N 2 4 3 P / V、S 2 4 8 N / A、S 2 4 9 A、K 2 5 6 R、L 2 5 7 G、S 2 6 0 P、及び N 2 6 9 D、並びに、

( b ) S 2 4 G / R / E、N 2 5 G、P 4 0 A / E、P 5 2 L、S 5 3 G、T 5 5 P、F 5 8 G、Q 5 9 S、N 6 1 E / P / G / S、N 6 2 Q / R / S、S 6 3 G / H、V 6 8 A、S 7 8 N、P 8 6 S、S 8 7 D / G、A 8 8 T / V、S 8 9 Y、A 9 2 G、L 9 6 T、G 9 7 A、G 1 0 0 N / Q / T、S 1 0 1 N、Q 1 0 3 E / H、Y 1 0 4 N、W 1 0 6 F、I 1 1 1 V、A 1 1 4 G、I 1 1 5 V、A 1 1 6 N / T、N 1 1 7 S、N 1 1 8 G、N 1 2 3 A / G / Q / V、M 1 2 4 I / V、S 1 2 5 A、L 1 2 6 A、G 1 2 8 A / S、P 1 2 9 E / Q / S / V、S 1 3 0 G、G 1 3 1 S / H、S 1 3 2 N、A 1 3 3 V、A 1 3 4 T、A 1 4 4 K、S 1 4 5 D、S 1 5 9 K、S 1 6 1 P、S 1 6 2 G / K、Y 1 6 7 A、P 1 9 4 L、V 2 0 3 Y、Q 2 0 6 D / E、K 2 1 3 L、Y 2 1 7 Q / L / D、V 2 2 7 T、A 2 3 2 T、P 2 3 9 R / V、N 2 4 0 K、T 2 4 2 R、K 2 6 5 N、L 2 6 7 V、及び Q 2 7 5 E。本発明の第二態様による変異体及び親プロテアーゼは、成熟型であり得る。

#### 【 0 1 4 2 】

本発明の第二十一態様による変異体は、B P N ' 野生型と比較して - 1、0 又は + 1 の合計正味電荷を有し得る。

#### 【 0 1 4 3 】

本発明の第一、第二、第四、第五、第六、第七、第八、第九又は第二十一態様では、この変異体は、親スブチリシンプロテアーゼと比較したときに洗剤において改善された洗浄性能又はクリーニング性能を有するスブチリシンプロテアーゼ変異体であり得、これはスブチリシンプロテアーゼであってもよい。本発明の第三態様では、ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のプロテアーゼのものと比較したとき、洗剤において改善された洗浄性能及びクリーニング性能を有し得る。このような態様の代表的な洗剤は、パート I 実施例及びパート I I 実施例に示す。

#### 【 0 1 4 4 】

本発明の第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九又は第二十一態様によるプロテアーゼ変異体は、冷水プロテアーゼであり得る。一態様では、本発明の第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九又は第二十一態様によるプロテアーゼ変異体は、( i ) 本明細書のパート I 実施例 1 に記載の「試験方法」に定義したように配列番号 4 のアミノ酸配列を有する酵素と比較したときに pH 8 及び 60 ° F ( 16 ) における B M I で、1 を超える、少なくとも 1 . 1、少なくとも 1 . 2、少なくとも 1 . 3、少なくとも 1 . 4、少なくとも 1 . 5、少なくとも 1 . 6、少なくとも 1 . 7、少なくとも 1 . 8、少なくとも 1 . 9、少なくとも 2、少なくとも 1 ~ 約 10、少なくとも 1 ~ 約 8、又は少なくとも 1 ~ 約 5 の性能指数、あるいは、( i i ) 本明細書のパート I 実施例 1 に記載の「試験方法」に定義したように配列番号 6 のアミノ酸配列を有する酵素と比較したときに pH 8 及び 60 ° F ( 16 ) における B M I で、少なくとも 1、少なくとも 1 . 1、少なくとも 1 . 2、少なくとも 1 . 3、少なくとも 1 . 4、少なくとも 1 . 5、少なくとも 1 . 6、少なくとも 1 . 7、少なくとも 1 . 8、少なくとも 1 . 9、少なくとも 2、少なくとも 1 ~ 約 10、少なくとも 1 ~ 約 8、又は少なくとも 1 ~ 約 5 の性能指数、を有する冷水プロテアーゼであり得る。

#### 【 0 1 4 5 】

上記のように、本発明のプロテアーゼ変異体ポリペプチドは、酵素活性 (例えば、タンパク質分解活性) を有し、したがって、例えば、食卓食器物品、食卓用器具物品、布地、

10

20

30

40

50

硬質表面（例えば、机、机の上、壁、家具物品、床、天井など）を有する物品をクリーニングするための方法が挙げられるがこれらに限定されないクリーニング用途に有用である。本発明の1つ以上のプロテアーゼ変異体ポリペプチドを含む代表的なクリーニング組成物は、以下に記載される。本発明のプロテアーゼ変異体の酵素活性（例えば、プロテアーゼ活性）は、当業者に周知の手順を使用して容易に判定することができる。下記に提示される実施例は、酵素活性、クリーニング性能及び/又は洗浄性能を評価するための方法を記載する。シミ（例えば、タンパク質性シミ）の除去、硬質表面のクリーニング、又は洗濯物、食卓食器若しくは食卓用器具物品のクリーニングにおけるプロテアーゼ変異体の性能は、当該技術分野において周知の手順を用いて、並びに/あるいは、パートI実施例及び/又はパートII実施例に記載の手順を用いることにより、容易に判定することができる。

10

**【0146】**

本発明のポリペプチドは、保存型又は非保存型のいずれかで、1つ以上のアミノ酸挿入、欠失及び/又は置換などの様々な変化にさらすことができ、このような変化がポリペプチドの酵素活性を実質的には変化させない場合を包含する。同様に、本発明の核酸はまた、非表現変異（例えば、ヌクレオチド配列中の変異は、例えば、コードされているアミノ酸が核酸変異により変化しない場合に、アミノ酸配列中に非表現変異を生じる）又は表現変異のいずれかを生じる、特定のコドンが同一又は異なるアミノ酸をコードするような1つ以上のコドンにおける1つ以上の核酸の1つ以上の置換、配列における1つ以上の核酸（又はコドン）の1つ以上の欠失、配列における1つ以上の核酸（又はコドン）の1つ以上の追加又は挿入、並びに/あるいは、配列における1つ以上の核酸（又はコドン）の1つ以上の分断などの、様々な変化にかけることもできる。核酸配列における多くのこのような変化は、元々の核酸配列によりコードされているプロテアーゼ変異体と比較して、得られたコードされているプロテアーゼ変異体の酵素活性を実質的に変化させなくてもよい。本発明の核酸はまた、発現系（例えば、細菌発現系）に最適な発現を提供する1つ以上のコドンを含むように改変することができ、一方で、所望される場合には上記1つ以上のコドンは依然として同じアミノ酸をコードする。

20

**【0147】**

本発明は、本明細書に記載のアミノ酸置換を有し、また、保存的及び非保存的置換などの1つ以上の追加のアミノ酸置換を含む、配列を含む所望の酵素活性（例えば、プロテアーゼ活性又はクリーニング性能活性）を有するプロテアーゼ変異体ポリペプチドを含むポリペプチド属を含み、ここで、ポリペプチドは、所望の酵素活性（例えば、プロテアーゼ変異体のクリーニング活性又は性能に反映されるような、プロテアーゼ活性又はスブチリシン活性）を呈し、維持し、又は大体維持する。本発明によるアミノ酸置換としては、1つ以上の非保存的置換及び/又は1つ以上の保存的アミノ酸置換を挙げてもよいが、これらに限定されない。保存的なアミノ酸残基置換は、典型的には、アミノ酸残基の一官能種類内の一員を同じ官能種類に属する残基（同一のアミノ酸残基は、機能的に相同であるか又は機能同姓パーセントの算出において保存されたものであると考えられる）と交換することを伴う。保存的なアミノ酸置換は、典型的には、アミノ酸配列中のアミノ酸を機能的に同様のアミノ酸と置換することを伴う。例えば、アラニン、グリシン、セリン及びトレオニンは機能的に同様であり、したがって、互いに保存的なアミノ酸置換基として機能し得る。アスパラギン酸及びグルタミン酸は、互いに保存的な置換基として機能し得る。アスパラギン及びグルタミンは、互いに保存的な置換基として機能し得る。アルギニン、リシン及びヒスチジンは、互いに保存的な置換基として機能し得る。イソロイシン、ロイシン、メチオニン及びバリンは、互いに保存的な置換基として機能し得る。フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファンは、互いに保存的な置換基として機能し得る。

30

40

**【0148】**

他の保存的なアミノ酸置換基を想定することができる。例えば、アミノ酸は、同様の機能又は化学構造又は組成により分類することができる（例えば、酸性、塩基性、脂肪族、芳香族、イオウ含有）。例えば、脂肪族グループは、グリシン（G）、アラニン（A）、

50

バリン(V)、ロイシン(L)、イソロイシン(I)を含み得る。互いに保存的な置換基であると考えられるアミノ酸を含有する他のグループとしては、以下のものが挙げられる：芳香族：フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)；イオウ含有：メチオニン(M)、システイン(C)；塩基性：アルギニン(R)、リシン(K)、ヒスチジン(H)；酸性：アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)；無極性非帯電残基：システイン(C)、メチオニン(M)及びプロリン(P)；親水性非帯電残基：セリン(S)、トレオニン(T)、アスパラギン(N)及びグルタミン(Q)。アミノ酸の追加的な分類は、当業者に周知であり、様々な標準的テキストに記載されている。本明細書におけるポリペプチド配列のリストは、上記置換基と共に、全ての保存的に置換されたポリペプチド配列の発現リストを提供する。

10

## 【0149】

より保存的な置換は、上記アミノ酸残基分類内で存在し、これはまた若しくは代替的に好適であり得る。より保存的である置換のための保存グループとしては、バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リシン-アルギニン、アラニン-バリン及びアスパラギン-グルタミンが挙げられる。したがって、例えば、本発明は、タンパク質分解活性を有する単離された又は組み換えプロテアーゼ変異体ポリペプチド(例えば、スブチリシン変異体)を含み、上記プロテアーゼ変異体ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は99.5%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。本発明のプロテアーゼ変異体において1つのアミノ酸を別のアミノ酸に保存的に置換することは、プロテアーゼ変異体の酵素活性又はクリーニング性能活性を有意に変化させることを期待するものではない。得られたプロテアーゼの酵素活性又はクリーニング性能活性は、標準的アッセイ及び本明細書に記載のアッセイを用いて容易に判定することができる。

20

## 【0150】

本発明のポリペプチド配列の保存的に置換された変異体(例えば、本発明のプロテアーゼ変異体)は、ポリペプチド配列のアミノ酸の低百分率、場合によっては約25%未満、約20%未満、約15%未満、約14%未満、約13%未満、約12%未満、約11%未満、約10%未満、約9%未満、約8%未満、約7%未満又は約6%未満、あるいは、ポリペプチド配列のアミノ酸の約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満又は約1%未満の、保存的アミノ酸での置換を含む。

30

## 【0151】

本明細書において他箇所より詳細に並びに本明細書において実施例で記載しているように、本発明のポリペプチドは、既知のスブチリシンなどの既知のプロテアーゼと比較され得るクリーニング能力を有し得る。代表的な既知のスブチリシンプロテアーゼとしては、例えば、バチルス・レントス(*B. lentus*)スブチリシンGG36、バチルス・アミロリケファシエンス(*B. amyloliquefaciens*)スブチリシンBPN'、バチルス・アミロリケファシエンス(*B. amyloliquefaciens*)スブチリシンBPN'-Y217L、及びバチルス・クラウジイ(*B. clausii*)PB92が挙げられるがこれらに限定されない。

## 【0152】

本発明の多数のポリペプチドとしては、例えば、実施例が挙げられるがこれに限定されない本明細書全体にわたって説明及び記載されている、例えば、スブチリシンプロテアーゼ変異体などのプロテアーゼ変異体が挙げられる。パートI実施例は、例えば、BPN'プロテアーゼ変異体が挙げられるがこれに限定されない本発明のプロテアーゼ変異体を説明する。パートII実施例は、例えば、GG36プロテアーゼ変異体が挙げられるがこれに限定されない本発明の追加のプロテアーゼ変異体を説明する。

40

## 【0153】

本発明は、参照セリンプロテアーゼと比較したときに1つ以上の置換を有するセリンプロテアーゼ変異体などのプロテアーゼ変異体を提供する。一態様では、本発明は冷水プロテアーゼを提供する。加えて、本発明は、例えば、セリンプロテアーゼといった1つ以上のプロテアーゼ変異体を含む組成物を提供する。組成物は、本明細書の他箇所に記載のよ

50

うに、本発明の少なくとも1つのこのようなプロテアーゼ変異体と添加剤成分とを含み得る。一態様では、本発明は、例えば、セリンプロテアーゼ変異体といった、少なくとも1つのこれらのプロテアーゼ変異体を含むクリーニング組成物を提供する。クリーニング組成物は、洗剤組成物であってもよい。クリーニングのトレンドは、エネルギーを節約するためにより低い洗浄温度を使用することである。酵素は、温度が低くなるほど活性が低くなり、クリーニング性能の低下が生じる。当該技術分野において現在周知のものよりも冷水洗浄条件で向上した性能を有する酵素が、当該技術分野において必要とされている。本発明はこのニーズに対処する。

#### 【0154】

本発明は、スブチリシンプロテアーゼ変異体などの本明細書に記載の少なくとも1つのセリンプロテアーゼ変異体を含むクリーニング組成物を提供する。このスブチリシンプロテアーゼ変異体は、BPN'プロテアーゼ変異体であってもよい。上記において更に詳細に述べられているように、本発明は、BPN'プロテアーゼ変異体及びGG36プロテアーゼ変異体を含む組成物を含む。例えば、本発明のスブチリシン変異体が挙げられるがこれらに限定されない一部のプロテアーゼ変異体は、冷水プロテアーゼである。このクリーニング組成物は、洗濯洗剤であってもよい。この洗濯洗剤は、3~11のpHを有する洗剤（例えば、pH 4、pH 5、pH 6、pH 7、pH 7.5、pH 8、pH 9、pH 10、pH 10.5などの間）、冷水洗剤、低pH洗剤（例えば、pH 3~6）、中性pH洗剤（例えば、pH 6.5~7.5）、アルカリpH洗剤（例えば、pH 9~11）又はコンパクト洗剤であり得る。洗剤は、リン酸塩を含んでもよく、又は、リン酸塩を含まなくてもよい。このクリーニング組成物は、食器洗浄洗剤であってもよい。一態様ではこの食器洗浄洗剤はリン酸塩を含まない洗剤であり、別の態様ではこの食器洗浄洗剤はリン酸塩含有洗剤である。一態様では、本発明のクリーニング組成物は、少なくとも1つの追加の酵素を更に含み、これは選択的に、中性メタロプロテアーゼ、リパーゼ、クチナーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼ、マンナーゼ、アラビナーゼ、ガラクタナーゼ、キシラナーゼ、ベルヒドロラーゼ、オキシダーゼ及びペルオキシダーゼの群から選択され得る。本発明のセリンプロテアーゼ変異体をコードする単離された核酸、本発明の1つ以上のこのような核酸を含む発現ベクター及び本発明の少なくとも1つのこのような発現ベクターを含む宿主細胞もまた提供される。

#### 【0155】

本明細書全体にわたって、参照を容易にするため、「アミノ酸置換の組」又は「置換の組」は、複数のアミノ酸置換の組（すなわち、G097A + G128A + Y217Q）又は単一のアミノ酸置換の組（すなわち、Y217Q）を指し得る。したがって、G097A - G128A - Y217Q及びY217Qからなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'配列（配列番号2）を含むBPN'変異体は、このBPN'変異体がBPN' - G097A - G128A - Y217Q又はBPN' - Y217Qを含むアミノ酸配列を含むことを示す。

#### 【0156】

配列番号4に記載されている成熟BPN' - v3スブチリシンプロテアーゼ変異体のアミノ酸配列は、BPN' - G097A - G128A - Y217Q、と表すことができ、これは3つの置換G097A、G128A、及びY217Qを有する配列番号2のBPN'アミノ酸配列を意味する。このフォーマットでは、各ダッシュ(-)は、プラスサイン(+)を用いるのと等価である。したがって、BPN' - G097A - G128A - Y217Qは、互換的にBPN' + G097A + G128A + Y217Qと書くことができる。配列番号6に記載されている成熟BPN' - v36スブチリシンプロテアーゼ変異体のアミノ酸配列は、BPN' - S24G - S53G - S78N - S101N - G128A - Y217Q又はBPN' + S24G + S53G + S78N + S101N + G128A + Y217Qと書くことができる。本発明のBPN'変異体は、これらのフォーマットを用いて書くことができる。

#### 【0157】

加えて、本発明はスブチリシン変異体を提供し、ここで、このような変異体は各々タンパク質分解活性を有する成熟型であり、S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G, N 6 1 P - S 6 3 H, S 8 7 G - A 8 8 V - S 8 9 A, P 8 6 S - S 8 7 G - A 8 8 V, Q 5 9 S - N 6 1 P, S 2 4 G - N 2 5 G, N 6 1 P - N 6 2 S, P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S, L 7 5 S - N 7 6 Y, V 2 0 3 Y, T 5 5 P, A 8 8 V - L 9 0 I, G 2 1 1 R - N 2 1 2 S - K 2 1 3 V, G 2 3 A - S 2 4 G - N 2 5 G, T 2 2 N - S 2 4 A, S 2 4 R, A 9 8 S, T 1 5 8 G - S 1 5 9 G, Q 5 9 E - N 6 1 P, 及び A 9 8 E, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN' - v3アミノ酸配列(配列番号4)を含み、ここで、アミノ酸位置は、配列番号2として記載されているパチルス・アミロリケファシエンス(*B. amyloliquefaciens*)スブチリシンBPN'のアミノ酸配列に対応させることにより番号付けされる。

10

## 【0158】

配列番号4として記載されているBPN' - v3アミノ酸配列は、G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Qと書いてもよいことに留意されたい。本発明は、タンパク質分解活性を有するプロテアーゼ変異体を含み、ここで、上記変異体は、配列番号4中にアミノ酸置換A 1 2 8 Sを有する配列番号4のアミノ酸配列を含む。したがって、本発明は、アミノ酸配列BPN' - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Qを含む。本明細書全体にわたって、本発明のポリペプチド変異体は、それぞれ参照ポリペプチド配列中の1つ以上の具体化された位置での1つ以上の特定のアミノ酸置換を含む参照ポリペプチドの変異体として記載され得る。

20

## 【0159】

本発明はスブチリシン変異体も提供し、ここで、このような変異体はそれぞれ、タンパク質分解活性を有する成熟型であり、P 8 6 S - S 8 7 G - A 8 8 V - A 1 1 6 N - N 1 1 7 S - N 1 1 8 G, S 2 4 G - N 2 5 G - N 6 1 P - S 1 0 1 N, S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - T 5 5 P - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y, N 6 1 P - S 7 8 N - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y, T 5 5 P - N 6 1 P - S 7 8 N - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y, S 5 3 G - T 5 5 P - N 6 1 P - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N, V 2 0 3 Y - L 2 6 7 V, S 2 4 G - N 2 5 G - T 5 5 P - S 1 0 1 N, A 1 3 4 T - L 2 6 7 V, S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - T 5 5 P - N 6 1 P - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G, S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - N 6 1 P - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y, N 2 5 Y - Q 5 9 S - N 6 1 P, I 1 1 1 V - S 1 6 1 P, I 1 1 5 V - L 2 6 7 V, T 5 5 P - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y, N 2 5 Y - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S - A 1 3 7 T, N 6 1 P - S 6 3 H - A 1 2 8 S - P 1 2 9 Q, S 5 3 G - N 6 1 P - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y, S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N, N 6 1 P - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N, N 2 5 Y - N 6 1 P - S 6 3 H, Q 5 9 S - N 6 1 P - V 2 0 3 Y, V 8 L - N 2 5 Y - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S, P 8 6 S - S 8 7 G - A 8 8 V - P 2 3 9 R, S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - T 5 5 P - N 6 1 P - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y, S 2 4 G - N 2 5 G - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S, N 2 4 0 K, G 2 3 A - S 2 4 G - N 2 5 G - G 2 1 1 R - N 2 1 2 S - K 2 1 3 V, N 6 1 P - S 6 3 H - S 7 8 N - I 1 1 1 V - A 1 3 4 T, S 6 3 T - P 8 6 S - S 8 7 G - A 8 8 V, G 2 3 A - S 2 4 G - N 2 5 G - A 1 1 6 N - N 1 1 7 S - N 1 1 8 G, S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N, S 2 4 G - N 2 5 G - A 1 1 6 N - N 1 1 7 S - N 1 1 8 G, T 5 5 P - N 2 4 0 K, T 5 5 P - P 1 2 9 V - P 1 9 4 S, N 2 5 Y - S 8 7 G - A 8 8 V - S 8 9 A, S 2 4 G - N 2 5 G - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N, P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S - V 2 0 3 Y, Q 5 9 S - N 6 1 P - N 2 4 0 K, S 2 4 R - P 4 0 E - P 1 2 9 E - S 1 5 9 K - K 2 6 5 R, P 5 2 S - T 5 5 P - V 2 0 3 Y, S 2 4 R - P 1 2 9 E, S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - N 6 1 P - S 7 8 N, S 2 4 G - N 2 5 G - T 5 5 P - S 7 8 N - S 1 0 1 N, P 8 6 S - S 8 7 G - A 8 8 V - A 1 1 6 S - N 1 1 7 G -

30

40

50

N 1 1 8 R , N 6 1 P - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G , S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G  
 - T 5 5 P - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G , G 2 3 A - S 2 4 G - N 2 5 G  
 - N 6 1 P - S 6 3 H , S 2 4 R - Q 5 9 S - N 6 1 P , N 6 1 P - P 1 2 9 Q - S 1 3  
 0 G - G 1 3 1 S , S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - T 5 5 P - N 6 1 P - S 7 8 N - S  
 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N , S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - T 5 5 P -  
 S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , N 6 1 P - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0  
 1 N - V 2 0 3 Y , S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - T 5 5 P - S 7 8 N - S 1 0 1 N ,  
 S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , S 2 4 G - N 2 5 G - S 7 8  
 N - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S - A 1 3 3 V - L 2  
 6 7 V , S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N , G 2 3 A - S 2 4 G - N 2 5 G - 10  
 P 2 3 9 R , S 8 7 G - A 8 8 V - S 8 9 A - A 1 1 6 N - N 1 1 7 S - N 1 1 8 G , Q  
 5 9 S - N 6 1 P - A 1 1 6 S - N 1 1 7 G - N 1 1 8 R , Q 5 9 S - N 6 1 P - S 8 7  
 T - A 8 8 L - S 8 9 G , S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9  
 G - V 2 0 3 Y , A 1 3 4 T - G 2 1 1 T , T 5 5 P - A 1 2 8 S - P 1 2 9 Q , T 5 5  
 P - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N , P 8 6 S - S 8 7 G - A 8  
 8 V - T 2 4 2 R , S 1 6 1 P - V 2 0 3 Y , S 2 4 G - N 2 5 G - T 5 5 P - N 6 1 P  
 - S 7 8 N - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 2 1 1 T - L 2 6 7 V , P 4 0 E - T 5 5 P -  
 N 2 6 9 K , S 2 4 R - A 1 2 8 S - P 1 2 9 G , S 2 4 G - N 2 5 G - N 6 1 P - N 6  
 2 S - P 1 9 4 L - A 2 3 2 T , T 5 5 P - A 1 1 6 S - N 1 1 7 G - N 1 1 8 R , S 2  
 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - S 7 8 N - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , P 1 2 9 Q - S 1 3 0 20  
 G - G 1 3 1 S - N 2 4 0 K , S 5 3 G - T 5 5 P - N 6 1 P - S 7 8 N - S 8 7 T - A  
 8 8 L - S 8 9 G , N 2 5 Y - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S , T 5 5 P - I 1 1  
 5 V , N 2 5 Y - T 5 5 P , G 2 3 A - S 2 4 G - N 2 5 G - A 1 2 8 S - P 1 2 9 D ,  
 S 5 3 G - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N - P 1 2 9 S - V 2 0  
 3 Y , T 5 5 P - A 1 3 4 T , N 6 1 P - S 6 3 H - S 7 8 N - I 1 1 1 V , N 6 1 P -  
 A 9 7 G - G 1 0 2 A - A 1 2 8 G - P 1 2 9 S , S 5 3 G - N 6 1 P - S 1 0 1 N , Q  
 5 9 S - N 6 1 P - S 8 7 G - A 8 8 V - S 8 9 A , S 5 3 G - S 8 7 T - A 8 8 L - S  
 8 9 G - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - P 1 2 9 S , S 5 3  
 G - T 5 5 P - S 7 8 N - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , T 5 5 P - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G  
 - G 1 3 1 S , Q 5 9 S - N 6 1 P - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S , A 1 3 4 T 30  
 - P 2 3 9 R , T 5 5 P - V 2 0 3 Y , T 5 5 P - S 7 8 N - S 8 9 Y , T 2 2 N - S 2  
 4 A - N 6 1 P - S 6 3 H , S 1 6 1 P - L 2 6 7 V , T 5 5 P - L 7 5 H - N 7 6 G ,  
 A 1 3 4 T - S 1 6 1 P , S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - A 1 3 4 T , T 5 5 P - A 1  
 1 6 N - N 1 1 7 S - N 1 1 8 G , A 1 2 8 S , T 5 5 P - S 7 8 N - I 1 1 5 V , Y 6  
 Q - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S , S 2 4 R - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3  
 1 S , S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - S 7 8 N - S 1 0 1 N , T 5 5 P - P 1 2 9 V ,  
 N 6 1 P - N 6 2 Q - G 1 0 0 N - A 1 2 8 G , T 5 5 P - P 1 2 9 Q , S 2 4 G - N 2  
 5 G - S 5 3 G - T 5 5 P - N 6 1 P - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1  
 0 1 N - V 2 0 3 Y , S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - N 2 4 0 K , A 1 3 4 T - N 2 4  
 0 K , S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - P 2 3 9 R , P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 40  
 S - L 2 6 7 V , P 1 2 9 Q - N 2 4 0 K , S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G -  
 V 2 0 3 Y , I 1 1 1 V - A 2 7 3 S , S 2 4 G - N 2 5 G - T 5 5 P - S 7 8 N - A 8  
 8 V - S 1 0 1 N , S 2 4 G - N 2 5 G - T 5 5 P - S 7 8 N , S 2 4 G - N 2 5 G - S  
 5 3 G - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , S 2 4 G - N 2 5 G  
 - S 5 3 G - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - V 2 0 3 Y , S 2 4 G - N 2 5  
 G - S 5 3 G - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , S  
 8 7 G - A 8 8 V - S 8 9 A - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S , N 6 1 P - S 6 3  
 H - S 7 8 N - S 1 6 1 P , T 5 5 P - N 6 1 P - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8  
 9 G - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , I 1 1 1 V - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S , T  
 2 2 N - S 2 4 A - T 5 5 P , I 1 1 5 V - N 2 4 0 K , S 8 7 G - A 8 8 V - S 8 9 A 50

- A 1 1 6 N - N 1 1 7 S - N 1 1 8 G - P 1 7 2 H , S 2 4 G - N 2 5 G - S 7 8 N -  
S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N , S 2 4 G - N 2 5 G - I 1 1 5 V - A 1 3  
4 T , T 5 5 P - A 1 2 8 S - P 1 2 9 D , I 1 1 1 V - S 1 5 9 K , N 2 4 0 K - A 2  
7 3 S , S 1 5 9 K - L 2 6 7 V , I 1 1 1 V - P 1 2 9 Q - G 2 1 1 T , I 1 1 5 V -  
A 2 7 3 S , S 8 9 Y , S 2 4 R - A 1 1 6 N - N 1 1 7 S - N 1 1 8 G , N 6 1 E - A  
1 4 4 K , P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S - P 2 3 9 R , S 8 7 T - A 8 8 L - S  
8 9 G - I 1 1 5 V , T 5 5 P - A 9 2 G , S 1 4 5 D - S 1 5 9 K - N 2 4 0 K - Q 2  
7 5 E , S 8 9 Y - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S , P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G  
1 3 1 S - S 1 6 2 K , I 1 1 1 V - A 1 3 4 T , P 4 0 E - S 5 3 Y - S 7 8 Y - P 8  
6 S - S 8 7 G - A 8 8 V , S 2 4 G - N 2 5 G - L 7 5 H - N 7 6 G , N 6 1 P - A 1  
2 8 G - P 1 2 9 S - S 1 3 0 P , S 2 4 R - S 1 4 5 D , S 2 4 R - S 1 4 5 D - P 2  
3 9 R - Q 2 7 5 E , S 2 4 R - S 7 8 N - S 1 8 2 P - L 2 6 7 V , S 5 3 G - N 6 1  
P - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , P 5 S - S 8 7 G - A 8  
8 V - S 8 9 A - A 1 1 6 G - N 1 1 7 R , S 5 3 G - N 6 1 P - S 7 8 N - S 8 7 T -  
A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , Q 5 9 S - N 6 1 P - A 1 1 6 N - N 1  
1 7 S - N 1 1 8 G , P 2 3 9 R - A 2 7 3 S , S 5 3 G - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8  
L - S 8 9 G - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , S 2 4 R - P 1 2 9 V , I 1 1 1 V - P 2 3 9  
R , S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , T 5 5 P - P 1 2 9 L ,  
S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - I 1 1 1 V , S 1 4 5 D - A 2 7 3 S , P 1 2 9 Q - S  
1 3 0 G - G 1 3 1 S - T 2 4 2 R , S 3 F - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - G 2 1 1  
T , S 8 7 G - A 8 8 V - S 8 9 A - S 1 6 2 K , S 8 9 Y - G 2 1 1 T , S 8 7 T - A  
8 8 L - S 8 9 G - A 1 4 4 K , P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S - S 1 5 9 K , A  
1 1 6 N - N 1 1 7 S - N 1 1 8 G - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S , S 2 4 G -  
N 2 5 G - P 1 2 9 V , S 2 4 G - N 2 5 G - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G  
- S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , N 1 2 3 G - A 1 2 8 G , N 6 1 P - N 6 2 Q - G 1 0 0 N  
- G 1 0 2 A - M 1 2 4 I , S 2 4 G - N 2 5 G - K 1 4 1 E - T 2 4 2 R , S 8 7 G -  
A 8 8 V - S 8 9 A - A 1 1 6 N - N 1 1 7 S - N 1 1 8 G - A 1 4 4 T , T 5 5 P - N  
6 1 P - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - G 1 1 0 C - S 1 3 0 P , L 7 5 S - N 7 6 Y  
- A 1 1 6 S - N 1 1 7 G - N 1 1 8 R , S 1 4 5 D - S 1 5 9 K - K 2 1 3 L - P 2 3  
9 R - N 2 4 0 K , S 2 4 R - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G , G 2 3 A - S 2 4 G - N  
2 5 G - P 1 2 9 V , A 1 3 4 T - K 2 1 3 L , S 8 9 Y - A 2 7 3 S , S 2 4 R - P 2  
3 9 R , N 1 2 3 G - A 1 2 8 G - P 1 2 9 S , S 8 9 Y - P 2 3 9 R , S 2 4 G - N 2  
5 G - A 9 2 G , N 6 1 P - S 6 3 H - I 1 1 5 V - A 2 2 8 V , A 9 7 G - A 1 2 8 G  
- Q 2 1 7 L , L 7 5 S - N 7 6 Y - P 1 2 9 V , S 2 4 R - P 1 2 9 L , S 8 7 G - A  
8 8 V - S 8 9 A - P 1 2 9 Q - S 1 8 2 Y - S 2 0 4 Y - P 2 3 9 Q , S 2 4 R - A 9  
2 G , S 2 4 R - A 1 1 6 S - N 1 1 7 G - N 1 1 8 R , G 2 3 A - S 2 4 G - N 2 5 G  
- A 1 1 6 G - N 1 1 7 R , S 2 4 G - N 2 5 G - P 1 2 9 L , S 8 7 T - A 8 8 L - S  
8 9 G - S 1 0 1 G , G 2 3 A - S 2 4 G - N 2 5 G - P 1 2 9 L , S 5 3 G - N 6 1 P  
- G 1 0 2 A - V 2 0 3 Y , T 5 5 P - V 1 4 7 P , Y 6 Q - L 7 5 S - N 7 6 Y , N 6  
1 P - S 6 3 H - V 1 4 7 P , S 2 4 R - V 1 4 7 P , S 2 4 G - N 2 5 G - V 6 8 C -  
A 6 9 G , S 2 4 G - N 2 5 G - N 6 1 P - L 7 5 S - N 7 6 Y - S 1 0 1 N - V 2 0 3  
Y , L 7 5 S - N 7 6 Y - S 7 8 N - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , L 7 5 S - N 7 6 Y - S  
7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N - S 1 3 0 P , S 2 4 G - N 2 5 G  
- S 5 3 G - S 1 0 1 N - S 1 3 0 P - V 2 0 3 Y , G 4 7 E - M 5 0 I - L 7 5 S - N  
7 6 Y - S 1 6 2 K , S 5 3 G - T 5 5 P - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N  
- S 1 3 0 P - V 2 0 3 Y , S 2 4 G - N 2 5 G - L 7 5 S - N 7 6 Y - A 1 2 8 T - P  
1 2 9 T - S 1 3 0 G - G 1 3 1 Q - S 1 3 2 C - A 1 3 3 G - A 1 3 4 T , P 1 2 9 Q  
- S 1 3 0 G - G 1 3 1 S - V 1 4 7 P , S 5 3 G - T 5 5 P - N 6 1 P - L 7 5 S - N  
7 6 Y - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - G 1 0 2 A - S 1 3 0 P - V 2 0 3 Y , 及び S

10

20

30

40



3 G - T 5 5 P - N 6 1 P - L 7 5 S - N 7 6 Y - S 1 0 1 N - S 1 3 0 P - V 2 0 3 Y  
 , かなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN' - v3アミノ  
 酸配列(配列番号4)を含み、ここで、アミノ酸位置は、配列番号2として記載されてい  
 るパチルス・アミロリケファシエンス(*B. amyloliquefaciens*)スブチリシンBPN'の  
 アミノ酸配列に対応させることにより番号付けされている。

【0160】

本発明はスブチリシン変異体も提供し、ここで、この変異体はタンパク質分解活性を有  
 する成熟型であり、P40E - S78N - S87D - Y217L, P40E - Y217L  
 , T22V - S78N - Q206E - K213N - Y217L, T22V - S78N - K  
 213N - Y217L, S87D - Y217L, S78N - Y217L, K213N - Y  
 217L, Q206E - Y217L, 及びT22V - Y217L, かなる群から選択さ  
 れる少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN' - v3アミノ酸配列(配列番号4)を  
 含み、ここで、アミノ酸位置は、配列番号2のパチルス・アミロリケファシエンス(*B. a*  
*myloliquefaciens*)スブチリシンBPN'のアミノ酸配列に対応させることにより番号付  
 けされている。

10

【0161】

本発明はスブチリシン変異体も提供し、ここで、このような変異体はそれぞれ、タンパ  
 ク質分解活性を有する成熟型であり、この変異体は、S87D - N76D - S78N, P  
 40E - S78N - S87D, P40E - S87D, S78N - P40E, S87D - N  
 76D, P40E, S78N - S87D, S87D, 及びS78N, かなる群から選択  
 される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN' - v3アミノ酸配列(配列番号4)  
 を含み、ここで、アミノ酸位置は、配列番号2のパチルス・アミロリケファシエンス(*B.*  
*amyloliquefaciens*)スブチリシンBPN'のアミノ酸配列に対応させることにより番号  
 付けされている。一態様では、これらの置換は、改善された酵素安定性を付与する。

20

【0162】

本発明はスブチリシン変異体も提供し、ここで、このような変異体はそれぞれ、タンパ  
 ク質分解活性を有する成熟型であり、S101N, A137V, N61P, S130P,  
 Q103N, S63T, G102A, N109D - S248R, S87R, S188D,  
 S87D - S248R, S188D - S248R, S248D, N109D - S188D  
 - S248R, N109D, S87R - S248R, N109D - S188R, N76D  
 , S87D - N109D - S188D - S248R, S87R - N109D - S188D  
 - S248R, S87R - S188R - S248R, A187D, N109D - S248  
 D, S87R - N109R - S188R - S248R, F189D, G100N, S87  
 R - N109D - S188D, S87D - N109D - S188D, S87R - S188  
 D - S248D, N62D, 及びS87D - N109D - S188D - S248D, から  
 なる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN' - v3アミノ酸配列  
 (配列番号4)を含み、ここで、アミノ酸位置は、配列番号2のパチルス・アミロリケ  
 ファシエンス(*B. amyloliquefaciens*)スブチリシンBPN'のアミノ酸配列のアミノ酸残  
 基位置に対応させることにより番号付けされている。

30

【0163】

本発明はスブチリシン変異体も提供し、ここで、このような変異体はそれぞれ、タンパ  
 ク質分解活性を有する成熟型であり、S78N - L267V, S78N - S161P, S  
 78N - I115V, S78N - A273S, S78N - G211T、S78N, S78  
 N - I111V, S78N - V147L, S78N - I108V, S78N - S89Y,  
 S78N - A138T, S78N - P172V, S78N - Q59G, P129T - V1  
 47Q - S159D - S161P - S183T - Q185T - G211A - S224A,  
 Q059V - I108V - V147Q - G211A - N252Q, S78N - Y167A  
 , S78N - A92G, S78N - P129L, N061A - S087E - M124I -  
 S161P - S224A, S78N - N62Q, S78N - V68A, S063T - S1  
 01A - L126V - S183T - T244N, S78N - M124T, P040L - S

40

50

053G - Q059V - N061A - N062Q - S063T - S087E - G100N  
 , N062Q - G100N - S125A - S159D - N240S , V68A - G102  
 A - G211A - S125A , 及びS053G - V068A - G102A - P129T -  
 Q185T , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN' -  
 v3アミノ酸配列(配列番号4)を含み、ここで、アミノ酸位置は、配列番号2として記  
 載されているバチルス・アミロリケファシエンス(*B. amyloliquefaciens*)スブチリシン  
 BPN'のアミノ酸配列のアミノ酸残基位置に対応させることにより番号付けされている  
 。

【0164】

本発明はスブチリシン変異体も提供し、ここで、このような変異体はそれぞれ、タンバ  
 ク質分解活性を有する成熟型であり、G97A - G128S - Y217Q - S24G - N  
 25G - N61P - S101N , G97A - G128S - Y217Q - S53G - N61  
 P - S101N - V203Y , G97A - G128S - Y217Q - S24G - N25G  
 - S53G - T55P - N61P - S101N - V203Y , G97A - G128A - Y  
 217Q - S24G - N25G - S53G - N61P - S101N - V203Y , P52  
 L - V68A - G97A - I111V , I111V - M124V - Y167A - Y217  
 Q , Y104N - G128A - Y217Q , M124V - Y167A - Y217Q , I1  
 11V - M124V - Y217Q , P52L - V68A - G97A , G97A - I111  
 V - M124V , V68A - A92G - G97A , G97A - I111V - M124V -  
 Y167A - Y217Q , P52L - V68A - I111V - Y217Q , P52L - V  
 68A - I111V , V68A - A92G - I111V , P52L - V68A - G97A  
 - I111V - Y217Q , V68A - G97A - I111V , G97A - I111V -  
 Y217Q , G97A - I111V - M124V - Y167A , S89Y - I111V -  
 M124V , V68A - S89Y - I111V , V68A - A92G - Y217Q , I1  
 11V - Y167A - Y217Q , G97A - I111V - Y167A - Y217Q , G  
 97A - I111V - M124V - Y217Q , V68A - I111V - Y167A - Y  
 217Q , I111V - G128A - Y217Q , G97A - M124V - Y217Q ,  
 V68A - Y167A - Y217Q , I111V - M124V - Y167A , N62Q -  
 G97A - I111V , G97A - M124V - Y167A - Y217Q , G97A - L  
 126A - Y217Q , V68A - I111V - Y217Q , S89Y - M124V - Y  
 217Q , 及びL96T - G97A - Y217Q , からなる群から選択される少なくとも  
 1組のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含み、ここで、位置は、配列番号2として記載  
 されているバチルス・アミロリケファシエンス(*B. amyloliquefaciens*)スブチリシンB  
 PN'のアミノ酸配列のアミノ酸残基位置に対応させることにより番号付けされている。  
 一部のこのような変異体は、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含む  
 BPN'アミノ酸配列(配列番号2)を含む。

【0165】

本発明はスブチリシン変異体も提供し、ここで、このような変異体はそれぞれ、タンバ  
 ク質分解活性を有する成熟型であり、S182E , N109I , N117H , K237D  
 , L257Q , P225N , S105H , S236I , L235H , S249E , N76  
 E , S145N , N243D , R247N , E195N , A98K , S182N , S16  
 1H , G83H , G131D , T71C , K136Q , P40D , A187H , L250  
 K , S9I , N76M , S132D , Q19F , E112H , S249P , S53D , V  
 68E , D41I , K43H , V4H , A13Y , N62P , L196E , 及びV44D  
 , からなる群から選択される少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、1  
 1又はそれ以上のアミノ酸置換を含むBPN' - v3アミノ酸配列を含み、ここで、位置  
 は、配列番号2として記載されているバチルス・アミロリケファシエンス(*B. amyloliqu  
 efaciens*)スブチリシンBPN'のアミノ酸配列のアミノ酸残基位置に対応させることによ  
 り番号付けされている。

【0166】

10

20

30

40

50

本発明はまた、これらのスブチリシン変異体を含む食器洗浄組成物、並びに、これらのスブチリシン変異体を含む布地クリーニング組成物を提供する。一部の好ましい態様では、食器洗浄及び布地クリーニング組成物は少なくとも1つの追加の酵素を更に含む。一部の好ましい態様では、この追加の酵素は以下から選択される：プロテアーゼ（例えば、中性メタロプロテアーゼ、野生型セリンプロテアーゼ又は第二変異体セリンプロテアーゼ）、リパーゼ、クチナーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼ、マンナーゼ、アラビナーゼ、ガラクタナーゼ、キシラナーゼ、ペルヒドラーゼ、オキシダーゼ及びペルオキシダーゼ。更に、本発明は、i) スブチリシン変異体を含む食器洗浄組成物及びii) クリーニングする必要がある食卓食器を供給する工程と、食卓食器のクリーニングをもたらすのに有効な条件下で食卓食器を食器洗浄組成物と接触させる工程とを含む、食器洗浄方法を提供する。同様に、本発明は、i) スブチリシン変異体を含む布地クリーニング組成物及びii) クリーニングする必要がある洗濯物を供給する工程と、洗濯物のクリーニングをもたらすのに有効な条件下で洗濯物を布地洗浄組成物と接触させる工程とを含む、布地クリーニング方法を提供する。更なる態様では、本発明は、この変異体をコードする単離された核酸、この単離された核酸をプロモーターと作用可能に組み合わせる含有発現ベクターを提供し、並びに/又は、この発現ベクターを含む宿主細胞を提供される。

10

#### 【0167】

本発明はまた、本明細書に提供されているスブチリシン変異体を含むクリーニング組成物を提供する。一態様では、クリーニング組成物は、液体、ゲル、タブレット、粉末及び/又は顆粒洗剤を含む。一部の更なる態様では、クリーニング組成物は洗濯洗剤及び食器洗剤から選択される。一部の好ましい態様では、クリーニング組成物は洗濯洗剤を含む。一部の特に好ましい態様では、クリーニング組成物は強力洗剤である。一部の追加的態様では、クリーニング組成物は、手による食器洗浄洗剤及び自動食器洗浄洗剤から選択される食器洗剤を含む。一部の更に好ましい態様では、本明細書に提供されているクリーニング組成物は、少なくとも1つの漂白剤を更に含む。一部の追加的態様では本明細書に提供されているクリーニング組成物はリン酸塩を含まず、一方、一部の代替的態様では本明細書に提供されているクリーニング組成物はリン酸塩含有洗剤である。一部の更なる態様では、本明細書に提供されているクリーニング組成物は、冷水洗剤である。更に一部の追加的態様では、本明細書に提供されているクリーニング組成物は、少なくとも1つの追加の酵素を更に含む。一態様では、クリーニング組成物は、ヘミセルラーゼ、セルラーゼ、ペルオキシダーゼ、プロテアーゼ、メタロプロテアーゼ、キシラナーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、エステラーゼ、ペルヒドラーゼ、クチナーゼ、ペクチナーゼ、ペクチン酸リアーゼ、マンナーゼ、ケラチナーゼ、レダクターゼ、オキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、リポキシゲナーゼ、リグニナーゼ、プルラナーゼ、タンナーゼ、ペントサナーゼ、マラナーゼ (malanase)、 $\alpha$ -グルカナーゼ、アラビノシターゼ、ヒアルロニダーゼ、コンドロイチナーゼ、ラッカーゼ及びアミラーゼからなる群から選択される少なくとも1つの追加の酵素又はこれらのいずれかの混合物を含む。

20

30

#### 【0168】

本発明はまた、クリーニングすべき物品及び本明細書に提供されている少なくとも1つのクリーニング組成物を含む組成物を供給することと、物品のクリーニングをもたらすのに有効な条件下で物品を組成物と接触させることと、を含む、クリーニング方法を提供する。一態様では、この方法は、物品をクリーニング組成物と接触させた後で物品をすぐ工程を更に含む。一部の好ましい態様では、クリーニングすべき物品は食卓食器を含む。一部の代替的態様では、クリーニングすべき物品は布地を含む。

40

#### 【0169】

一部の更なる態様では、上記変異、欠失、挿入又はこれらの組み合わせのいずれかは、変異Y217Lを含有する配列番号2の酵素又は変異G97A-G128A-Y217Qを含有する配列番号2の酵素のいずれかに適用することができる。

#### 【0170】

50

一態様では、本発明は、スブチリシン、特にスブチリシンBPN'（配列番号2）（すなわち、BPN'スブチリシン変異体）、から誘導される好適な冷水プロテアーゼを提供する。一態様では、冷水プロテアーゼは、配列番号2と比較して以下のアミノ酸置換：Q002W, P005K, P005L, P005Y, G007T, V008G, V008K, V008P, I011G, I011H, I011S, K012L, A013M, L016W, G023S, V026H, V026W, V026Y, K027P, V028Q, V028S, V028T, A029C, A029D, A029S, A029T, A029V, V030D, V030E, V030G, V030T, I031E, I031G, I031H, I031K, I031N, I031Q, I031S, I031Y, S033F, S033H, D036L, S037P, D041A, D041C, D041M, D041N, D041S, L042S, L042Y, V044H, V044Q, V044T, G046F, G046L, G046M, G046V, G047T, G047W, S049I, S049V, M050D, M050I, M050R, V051A, V051G, V051S, P052C, P052I, P052L, P052M, P052V, P052W, P052Y, E054R, N056G, N056I, N056K, N056M, N056Q, N056R, N056V, N056Y, P057I, P057K, P057L, P057R, P057T, P057V, F058T, Q059P, Q059W, N061P, N062D, N062M, N062Q, S063C, S063Q, S063T, G065Q, V068A, V068G, V068M, V068S, A069C, A069D, A069F, A069H, A069M, A069N, A069P, A069Q, A069R, A069T, T071D, T071E, T071G, T071K, T071M, V072D, V072G, V072K, V072Q, V072S, V072T, A073E, A073I, A073K, A073M, A073Q, A073S, A073V, A074E, A074F, A074H, A074I, A074L, A074M, A074Q, A074R, A074V, A074W, A074Y, L075A, N076A, N077G, N077L, N077P, N077Q, N077R, N077S, N077T, S078W, G080H, V081D, V081F, V081H, V081N, V081Q, V081R, V081W, L082G, L082N, L082W, A085I, A085T, A085V, P086A, P086G, P086M, P086Q, P086R, P086T, P086W, P086Y, S087F, S087I, S087L, S087M, S087Q, S087V, S087W, A088D, A088E, A088K, A088P, A088Q, S089D, S089Q, S089V, L090D, L090E, L090F, L090H, L090P, L090S, L090T, Y091L, Y091Q, Y091T, A092C, A092I, A092M, A092N, A092P, A092V, V093D, V093F, V093L, V093T, K094C, K094R, K094S, V095I, L096F, L096H, L096I, L096M, L096N, L096Q, L096S, L096T, L096V, L096W, L096Y, G097A, G097C, G097D, G097E, G097F, G097L, G097M, G097P, G097Q, G097S, G097V, G097W, G097Y, D099C, D099E, D099I, D099M, D099P, D099V, D099Y, G100D, G100E, G100H, G100I, G100K, G100M, G100Q, G100T, G100V, G100Y, S101A, S101E, S101G, S101N, S101P, S101Q, S101T, S101V, G102A, G102S, Q103E, Q103G, Q103H, Q103K, Q103N, Y104L, Y104M, Y104N, Y104T, Y104V, S105D, S105I, S105R, S105V, W106A, W106C, W106E, W106F, W106G, W106I, W106L, W106M, W106S, W106T, W106V, I107R, I107S, I107T, I108S, I108T, G110S, G110T, I111A, I111C, I111F, I111L, I111M, I111T, I111V, E112I, E112L, E112T, W113H, A114I, A114V, I115A, I115E, I115F, I11

10

20

30

40

50

5 H , I 1 1 5 M , I 1 1 5 N , I 1 1 5 P , I 1 1 5 Q , I 1 1 5 R , I 1 1 5 S , I  
 1 1 5 T , I 1 1 5 V , I 1 1 5 Y , N 1 1 7 K , N 1 1 7 V , N 1 1 7 W , N 1 1 8 I  
 , N 1 1 8 L , N 1 1 8 V , M 1 1 9 F , M 1 1 9 N , D 1 2 0 Y , I 1 2 2 R , I 1 2  
 2 S , I 1 2 2 T , N 1 2 3 A , N 1 2 3 C , N 1 2 3 G , N 1 2 3 S , M 1 2 4 A , M  
 1 2 4 H , M 1 2 4 N , M 1 2 4 Q , M 1 2 4 S , M 1 2 4 T , M 1 2 4 V , S 1 2 5 A  
 , L 1 2 6 A , L 1 2 6 Q , L 1 2 6 S , L 1 2 6 T , L 1 2 6 Y , G 1 2 8 E , G 1 2  
 8 N , G 1 2 8 T , P 1 2 9 V , S 1 3 0 P , S 1 3 2 I , S 1 3 2 N , S 1 3 2 P , S  
 1 3 2 Q , S 1 3 2 V , A 1 3 4 I , A 1 3 4 L , A 1 3 4 M , L 1 3 5 I , L 1 3 5 T  
 , L 1 3 5 V , L 1 3 5 W , L 1 3 5 Y , K 1 3 6 D , K 1 3 6 F , K 1 3 6 I , K 1 3  
 6 V , K 1 3 6 Y , A 1 3 7 P , A 1 3 8 D , A 1 3 8 E , A 1 3 8 F , A 1 3 8 H , A 10  
 1 3 8 Q , A 1 3 8 Y , A 1 4 2 G , A 1 4 2 I , A 1 4 2 T , A 1 4 2 V , V 1 4 3 W  
 , A 1 4 4 P , G 1 4 6 L , G 1 4 6 T , G 1 4 6 Y , V 1 4 7 D , V 1 4 7 P , V 1 4  
 7 W , V 1 4 7 Y , V 1 4 8 N , V 1 4 8 Y , V 1 4 9 E , A 1 5 1 T , A 1 5 3 T , A  
 1 5 3 V , S 1 5 9 K , T 1 6 4 W , V 1 6 5 T , Y 1 6 7 A , Y 1 6 7 D , Y 1 6 7 E  
 , Y 1 6 7 M , Y 1 6 7 P , Y 1 6 7 S , Y 1 6 7 T , P 1 6 8 L , P 1 6 8 T , G 1 6  
 9 C , K 1 7 0 E , K 1 7 0 N , K 1 7 0 P , K 1 7 0 Q , K 1 7 0 S , K 1 7 0 T , K  
 1 7 0 Y , Y 1 7 1 C , Y 1 7 1 D , Y 1 7 1 L , Y 1 7 1 N , Y 1 7 1 W , P 1 7 2 E  
 , P 1 7 2 G , P 1 7 2 I , P 1 7 2 L , P 1 7 2 V , P 1 7 2 Y , S 1 7 3 H , S 1 7  
 3 W , S 1 7 3 Y , V 1 7 4 A , V 1 7 4 I , V 1 7 4 L , V 1 7 4 S , I 1 7 5 A , I  
 1 7 5 F , I 1 7 5 R , I 1 7 5 T , I 1 7 5 V , A 1 7 6 V , V 1 7 7 W , V 1 8 0 F 20  
 , V 1 8 0 H , V 1 8 0 Q , S 1 8 2 W , N 1 8 4 A , N 1 8 4 L , N 1 8 4 V , Q 1 8  
 5 D , Q 1 8 5 E , Q 1 8 5 I , Q 1 8 5 S , Q 1 8 5 T , R 1 8 6 C , R 1 8 6 D , R  
 1 8 6 E , R 1 8 6 F , R 1 8 6 G , R 1 8 6 I , R 1 8 6 L , R 1 8 6 N , R 1 8 6 P  
 , R 1 8 6 Q , R 1 8 6 S , R 1 8 6 T , R 1 8 6 V , R 1 8 6 W , R 1 8 6 Y , A 1 8  
 7 D , A 1 8 7 E , A 1 8 7 Q , S 1 9 0 G , S 1 9 0 N , Y 1 9 2 D , Y 1 9 2 E , Y  
 1 9 2 L , Y 1 9 2 Q , G 1 9 3 H , G 1 9 3 Q , G 1 9 3 T , G 1 9 3 V , P 1 9 4 E  
 , P 1 9 4 I , P 1 9 4 L , P 1 9 4 M , P 1 9 4 N , P 1 9 4 T , P 1 9 4 V , E 1 9  
 5 C , E 1 9 5 K , E 1 9 5 W , L 1 9 6 I , L 1 9 6 M , L 1 9 6 T , L 1 9 6 V , D  
 1 9 7 I , D 1 9 7 M , M 1 9 9 F , M 1 9 9 Q , A 2 0 0 C , A 2 0 0 H , A 2 0 0 N  
 , A 2 0 0 T , A 2 0 0 V , A 2 0 0 Y , P 2 0 1 L , P 2 0 1 T , P 2 0 1 V , V 2 0 30  
 3 G , I 2 0 5 L , I 2 0 5 T , T 2 0 8 C , T 2 0 8 L , T 2 0 8 M , T 2 0 8 P , T  
 2 0 8 V , L 2 0 9 C , L 2 0 9 W , P 2 1 0 C , P 2 1 0 D , P 2 1 0 E , P 2 1 0 F  
 , P 2 1 0 G , P 2 1 0 Q , P 2 1 0 R , P 2 1 0 S , P 2 1 0 V , G 2 1 1 A , G 2 1  
 1 D , G 2 1 1 E , G 2 1 1 P , G 2 1 1 T , G 2 1 1 V , G 2 1 1 W , N 2 1 2 E , N  
 2 1 2 T , K 2 1 3 Q , K 2 1 3 T , Y 2 1 4 A , Y 2 1 4 D , Y 2 1 4 N , Y 2 1 4 P  
 , Y 2 1 4 S , G 2 1 5 D , G 2 1 5 Q , G 2 1 5 V , A 2 1 6 E , Y 2 1 7 E , Y 2 1  
 7 L , Y 2 1 7 M , N 2 1 8 P , A 2 2 3 W , S 2 2 4 D , S 2 2 4 N , S 2 2 4 Q , H  
 2 2 6 E , H 2 2 6 T , V 2 2 7 G , V 2 2 7 L , V 2 2 7 S , A 2 3 0 H , A 2 3 0 N  
 , A 2 3 1 W , A 2 3 1 Y , A 2 3 2 N , I 2 3 4 W , L 2 3 5 N , S 2 3 6 W , H 2 3  
 8 A , H 2 3 8 G , H 2 3 8 I , P 2 3 9 H , P 2 3 9 S , W 2 4 1 G , W 2 4 1 Q , R 40  
 2 4 7 H , R 2 4 7 L , R 2 4 7 W , R 2 4 7 Y , L 2 5 0 E , L 2 5 0 T , N 2 5 2 Q  
 , T 2 5 3 Y , T 2 5 4 D , T 2 5 4 Q , T 2 5 4 R , T 2 5 5 L , T 2 5 5 P , K 2 5  
 6 G , K 2 5 6 R , G 2 5 8 P , Y 2 6 3 D , Y 2 6 3 K , Y 2 6 3 R , K 2 6 5 P , I  
 2 6 8 S , I 2 6 8 T , I 2 6 8 W , V 2 7 0 F , A 2 7 3 K , A 2 7 3 P , A 2 7 3 R  
 , A 2 7 3 V , A 2 7 3 W , A 2 7 4 W , S 1 8 2 E , 及び N 1 0 9 I , のうちの 1、2  
 、 3、 4、 5、 6、 7、 8、 9、 10、 11 又はそれ以上を含み、ここで、変異体配列の  
 位置は、配列番号 2 の位置に対応させることにより番号付けされる。

【 0 1 7 1 】

別の態様では、本発明は、配列番号 2 と比較して以下の変異の組： N 1 0 9 D - Y 2 1  
 7 L - S 2 4 8 R , N 1 0 9 D - S 1 8 8 R - Y 2 1 7 L , S 8 7 D - Y 2 1 7 L - S 2 40

4 8 R , S 8 7 R - N 1 0 9 D - Y 2 1 7 L - S 2 4 8 R , S 8 7 R - N 1 0 9 D - S 1  
8 8 D - Y 2 1 7 L - S 2 4 8 R , G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , I 1 1 1 V - M 1 2 4 V ,  
M 1 2 4 V - Y 2 1 7 Q , N 6 2 Q - G 9 7 A , S 8 9 Y - M 1 2 4 V , V 6 8 A , V 6  
8 A - A 9 2 G , V 6 8 A - G 9 7 A , V 6 8 A - I 1 1 1 V , V 6 8 A - S 8 9 Y , V  
6 8 A - V 2 2 7 T , V 6 8 A - Y 2 1 7 Q , W 1 0 6 F - Y 2 1 7 Q , G 9 7 A - G 1  
2 8 A - Y 2 1 7 Q , G 9 7 A - L 1 2 6 A - Y 2 1 7 Q , G 9 7 A - M 1 2 4 V - L 1  
2 6 A - Y 2 1 7 Q , G 9 7 A - N 1 2 3 G - Y 2 1 7 Q , L 9 6 T - G 9 7 A - Y 2 1  
7 Q , M 1 2 4 V - L 1 2 6 A - Y 2 1 7 Q , N 6 2 Q - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , N 6  
2 Q - G 9 7 A - Y 2 1 7 Q , G 9 7 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 M , G 9 7 G - G 1 2 8  
S - Y 2 1 7 E , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , G 9 7 M - G 1 2 8 S - Y 2 1 7  
E , G 9 7 A - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q , G 9 7 D - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q , G 9 7 M  
- G 1 2 8 G - Y 2 1 7 M , G 9 7 G - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q , G 9 7 S - G 1 2 8 S  
- Y 2 1 7 Q , G 9 7 G - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , G 9 7 S - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 E  
, G 9 7 A - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 L , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 N , G 9 7 Q -  
G 1 2 8 S - Y 2 1 7 L , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 M , G 9 7 A - G 1 2 8 A -  
Y 2 1 7 S , G 9 7 D - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , G 9 7 M - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q ,  
G 9 7 Q - G 1 2 8 G - Y 2 1 7 D - S 8 7 Y , G 9 7 S - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 N , G  
9 7 A - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 T , G 9 7 D - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 E , G 9 7 D - G 1  
2 8 A - Y 2 1 7 L , G 9 7 G - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 E - S 7 8 P - A 2 7 2 T , G 9  
7 T - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 D , G 9 7 D - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 I , G 9 7 Q - G 1 2  
8 S - Y 2 1 7 Q , G 9 7 G - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 D , G 9 7 Q - G 1 2 8 A - Y 2 1  
7 N , G 9 7 S - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 M , G 9 7 S - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 N , G 9 7  
S - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 M , G 9 7 E - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 M , G 9 7 S - G 1 2 8  
P - Y 2 1 7 Q , G 9 7 T - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q , G 9 7 D - G 1 2 8 S - Y 2 1 7  
Q - A 7 3 T , G 9 7 E - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 N , G 9 7 G - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 I  
, G 9 7 Q - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 D , G 9 7 Q - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 M , G 9 7 R -  
G 1 2 8 T - Y 2 1 7 Q - S 1 6 2 P , G 9 7 S - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 D , G 9 7 T -  
G 1 2 8 P - Y 2 1 7 I , G 9 7 Q - G 1 2 8 G - Y 2 1 7 E , G 9 7 C - G 1 2 8 G -  
Y 2 1 7 N , G 9 7 D - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 H , G 9 7 M - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 L ,  
G 9 7 M - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 N , G 9 7 S - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 E , G 9 7 M - G  
1 2 8 S - Y 2 1 7 I , G 9 7 A - G 1 2 8 P - Y 2 1 7 A , G 9 7 R - G 1 2 8 S - Y  
2 1 7 D , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 1 4 5 D , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y  
2 1 7 Q - P 2 3 9 R , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 6 1 E - P 1 2 9 E - S  
1 6 2 K - K 2 1 3 L - N 2 4 0 K , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 6 1 E , G  
9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - P 4 0 E - A 1 4 4 K - K 2 1 3 L , G 9 7 A - G 1  
2 8 A - Y 2 1 7 Q - P 1 2 9 E , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 6 1 E - P 1  
2 9 E - S 1 5 9 K , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - K 2 1 3 L , G 9 7 A - G 1  
2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 8 7 D , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - Q 2 0 6 E , G 9  
7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 R - P 4 0 E - S 1 4 5 D - S 1 5 9 K - K 2 1  
3 L , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - K 2 6 5 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1  
7 Q - S 2 4 R , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - P 4 0 E , G 9 7 A - G 1 2 8 A  
- Y 2 1 7 Q - Q 2 7 5 E , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - P 1 2 9 E - S 1 4 5  
D - N 2 4 0 K , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - A 1 4 4 K , G 9 7 A - G 1 2 8  
A - Y 2 1 7 Q - S 1 5 9 K , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 1 6 2 K , G 9 7  
A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 2 4 0 K , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 5 3  
G , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 7 8 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q  
- S 5 3 G - S 7 8 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 5 3 G - I 1 1 1 V , G  
9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 5 3 G - N 1 1 7 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2  
1 7 Q - S 5 3 G - S 1 3 2 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - Y 1 0 4 N - S 1  
3 2 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 5 3 G - S 7 8 N - I 1 1 1 V , G 9 7

10

20

30

40

50

A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 5 3 G - S 7 8 N - N 1 1 7 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A  
 - Y 2 1 7 Q - S 5 3 G - S 7 8 N - S 1 3 2 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q -  
 S 5 3 G - Y 1 0 4 N - S 1 3 2 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 7 8 N - Y  
 1 0 4 N - S 1 3 2 N , Y 2 1 7 L - V 0 6 8 C - A 0 6 9 G , Y 2 1 7 L - I 0 7 9 F  
 - A 0 9 8 G , Y 2 1 7 L - P 0 8 6 T - S 1 0 1 D - Q 1 0 3 S - V 1 4 7 I , Y 2 1  
 7 L - A 0 8 8 T - P 1 2 9 S - G 1 4 6 D , Y 2 1 7 L - V 0 9 3 I - G 1 2 8 D - P  
 1 2 9 R , Y 2 1 7 L - Z 0 9 6 . 0 1 D - A 0 9 8 R , Y 2 1 7 L - Z 0 9 6 . 0 1 H  
 - A 0 9 8 G , Y 2 1 7 L - G 0 9 7 S - Z 0 9 7 . 0 1 S - A 0 9 8 G - A 2 7 3 T ,  
 Y 2 1 7 L - A 0 9 8 S - D 0 9 9 G - G 1 0 0 D , Y 2 1 7 L - Z 0 9 8 . 0 1 N、Y  
 2 1 7 L - D 0 9 9 G - Z 0 9 9 . 0 1 N、Y 2 1 7 L - D 0 9 9 G - Z 0 9 9 . 0 1 S  
 、Y 2 1 7 L - D 0 9 9 V - S 1 0 1 D , Y 2 1 7 L - Z 0 9 9 . 0 1 S、Y 2 1 7 L -  
 G 1 0 0 D , Y 2 1 7 L - S 1 0 1 D - Q 1 0 3 H , Y 2 1 7 L - S 1 0 1 G - A 1 5 1  
 V , Y 2 1 7 L - S 1 0 1 H - G 1 0 2 S , Y 2 1 7 L - S 1 0 1 H - Q 1 0 3 D , Y 2  
 1 7 L - G 1 0 2 R - Q 1 0 3 C - Y 1 0 4 C - V 1 9 2 I , Y 2 1 7 L - Q 1 0 3 D ,  
 Y 2 1 7 L - V 1 2 1 I - I 1 2 2 S - N 1 2 3 C , Y 2 1 7 L - V 1 2 1 L - N 1 2 3  
 C , Y 2 1 7 L - I 1 2 2 S - N 1 2 3 S , Y 2 1 7 L - M 1 2 4 I , Y 2 1 7 L - M 1  
 2 4 V , Y 2 1 7 L - L 1 2 6 F - P 1 2 9 Z - S 1 8 2 N , Y 2 1 7 L - L 1 2 6 Y ,  
 Y 2 1 7 L - G 1 2 7 S - P 1 2 9 D , Y 2 1 7 L - Z 1 2 7 . 0 1 N - G 1 2 8 S - P  
 1 2 9 S , Y 2 1 7 L - G 1 2 8 H - P 1 2 9 Y , Y 2 1 7 L - G 1 2 8 S - P 1 2 9 D  
 , Y 2 1 7 L - G 1 2 8 S - P 1 2 9 D - S 2 4 8 R , Y 2 1 7 L - G 1 2 8 S - P 1 2  
 9 G , Y 2 1 7 L - P 1 2 9 G - G 1 3 1 Z , Y 2 1 7 L - P 1 2 9 G - S 1 3 0 H - S  
 1 3 2 Z , Y 2 1 7 L - P 1 2 9 H - G 1 3 1 Z , Y 2 1 7 L - P 1 2 9 L , Y 2 1 7 L  
 - P 1 2 9 S - S 1 3 0 H - S 1 3 2 Z , Y 2 1 7 L - P 1 2 9 Z , Y 2 1 7 L - P 1 2  
 9 Z - S 1 3 0 G , Y 2 1 7 L - P 1 2 9 Z - S 1 3 0 G - G 1 3 1 H - S 1 3 2 H , Y  
 2 1 7 L - P 1 2 9 Z - S 1 3 0 H , Y 2 1 7 L - S 1 3 0 V - G 1 3 1 D - S 1 3 2 I  
 , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - A 1 3 4 T - K 2 1 3 L , G 9 7 A - G 1 2 8 A  
 - Y 2 1 7 Q - G 2 3 A - S 2 4 G - N 2 5 G - P 1 2 9 V , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y  
 2 1 7 Q - S 2 4 R - P 2 3 9 R , 及び G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 R -  
 S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G , のうちの 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、  
 11 又はそれ以上を含む、スプチリシン変異体、特に成熟 B P N ' ( 配列番号 2 ) の変異  
 体などの好適な冷水プロテアーゼを提供し、ここで、変異体配列の位置は、配列番号 2 の  
 位置に対応させることにより番号付けされる。

【 0 1 7 2 】

別の態様では、本発明は、配列番号 2 と比較して以下の変異の組：S 8 7 T - A 8 8 L  
 - S 8 9 G - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , N 6 1 P - S 6 3 H - G 9 7 A - G 1  
 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 8 7 G - A 8 8 V - S 8 9 A - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7  
 Q , P 8 6 S - S 8 7 G - A 8 8 V - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , Q 5 9 S - N  
 6 1 P - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 2 4 G - N 2 5 G - G 9 7 A - G 1 2 8  
 A - Y 2 1 7 Q , N 6 1 P - N 6 2 S - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , G 9 7 A -  
 G 1 2 8 A - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S - Y 2 1 7 Q , L 7 5 S - N 7 6 Y -  
 G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , G 9 7 A - G 1 2 8 A - V 2 0 3 Y - Y 2 1 7 Q ,  
 T 5 5 P - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , A 8 8 V - L 9 0 I - G 9 7 A - G 1 2  
 8 A - Y 2 1 7 Q , G 9 7 A - G 1 2 8 A - G 2 1 1 R - N 2 1 2 S - K 2 1 3 V - Y 2  
 1 7 Q , G 2 3 A - S 2 4 G - N 2 5 G - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , T 2 2 N  
 - S 2 4 A - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 2 4 R - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y  
 2 1 7 Q , G 9 7 A - A 9 8 S - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , G 9 7 A - G 1 2 8 A - T 1  
 5 8 G - S 1 5 9 G - Y 2 1 7 Q , Q 5 9 E - N 6 1 P - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1  
 7 Q , G 9 7 A - A 9 8 E - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7  
 Q - P 8 6 S - S 8 7 G - A 8 8 V - A 1 1 6 N - N 1 1 7 S - N 1 1 8 G , G 9 7 A -  
 G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 6 3 T - P 8 6 S - S 8 7 G - A 8 8 V , G 9 7 A - G 1 2

10

20

30

40

50

8 A - Y 2 1 7 Q - P 8 6 S - S 8 7 G - A 8 8 V - P 2 3 9 R , G 9 7 A - G 1 2 8 A  
- Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - N 6 1 P - N 6 2 S - P 1 9 4 L - A 2 3 2 T , G  
9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S - A 1 3 3 V -  
L 2 6 7 V , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - A 1 3 4 T - L 2 6 7 V , G 9 7 A -  
G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 R - P 4 0 E - P 1 2 9 E - S 1 5 9 K - K 2 6 5 R ,  
G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - A 1 3 4 T - G 2 1 1 T , G 9 7 A - G 1 2 8 A -  
Y 2 1 7 Q - S 2 4 R - P 1 2 9 E , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - I 1 1 1 V -  
S 1 6 1 P , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - P 1 2 9 Q , G 9 7 A - G  
1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - I 1 1 5 V - L 2 6 7 V , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q -  
P 8 6 S - S 8 7 G - A 8 8 V - A 1 1 6 S - N 1 1 7 G - N 1 1 8 R , G 9 7 A - G 1  
2 8 A - Y 2 1 7 Q - V 2 0 3 Y - L 2 6 7 V , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S  
2 4 G - N 2 5 G - S 7 8 N - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1  
7 Q - P 5 2 S - T 5 5 P - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - Q 5 9 S  
- N 6 1 P - A 1 1 6 S - N 1 1 7 G - N 1 1 8 R , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q  
- S 2 4 G - N 2 5 G - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A -  
Y 2 1 7 Q - P 8 6 S - S 8 7 G - A 8 8 V - T 2 4 2 R , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2  
1 7 Q - P 4 0 E - T 5 5 P - N 2 6 9 K , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - G 2 3  
A - S 2 4 G - N 2 5 G - A 1 1 6 N - N 1 1 7 S - N 1 1 8 G , G 9 7 A - G 1 2 8 A  
- Y 2 1 7 Q - V 8 L - N 2 5 Y - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S , G 9 7 A - G  
1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L  
- S 8 9 G - S 1 0 1 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - G 2 1 1 T - L 2 6 7 V  
, G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 R - A 1 1 6 N - N 1 1 7 S - N 1 1 8 G  
, G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 R - A 1 2 8 S - P 1 2 9 G , G 9 7 A -  
G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S - N 2 4 0 K , G 9 7 A  
- G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 2 5 Y - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S , G 9 7 A  
- G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - A 1 3 4 T , G 9 7 A - G  
1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S - L 2 6 7 V , G 9 7 A -  
G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 8 7 G - A 8 8 V - S 8 9 A - A 1 1 6 N - N 1 1 7 S - N  
1 1 8 G , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 6 1 P - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G  
1 3 1 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 6 1 P - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8  
L - S 8 9 G - S 1 0 1 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - P 1 2 9 V  
- P 1 9 4 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - P 1 2 9 V , G 9 7 A -  
G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - T 5 5 P - S 7 8 N - S 1 0 1 N , G 9  
7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - S 7 8 N - I 1 1 5 V , G 9 7 A - G 1 2 8  
A - Y 2 1 7 Q - N 2 5 Y - S 8 7 G - A 8 8 V - S 8 9 A , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y  
2 1 7 Q - A 1 3 4 T - N 2 4 0 K , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 R - Q  
5 9 S - N 6 1 P , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - G 2 3 A - S 2 4 G - N 2 5 G  
- P 2 3 9 R , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - A 1 1 6 S - N 1 1 7 G  
- N 1 1 8 R , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - A 1 3 4 T - S 1 6 1 P , G 9 7 A  
- G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - N 6 1 P - S 1 0 1 N - V  
2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 2 5 Y - Q 5 9 S - N 6 1 P , G 9 7  
A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 2 5 Y - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S - A 1 3  
7 T , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - G 2 3 A - S 2 4 G - N 2 5 G - N 6 1 P -  
S 6 3 H , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - N 6 1 P - S 7 8 N - S 1 0  
1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - P 1 2 9 Q - N 2 4 0 K , G 9  
7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - A 1 3 4 T , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1  
7 Q - N 2 5 Y - N 6 1 P - S 6 3 H , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 8 7 T -  
A 8 8 L - S 8 9 G - P 1 2 9 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - L 7  
5 H - N 7 6 G , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G -  
S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2

10

20

30

40

50



8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - I 1 1 5 V , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5  
P - A 1 1 6 N - N 1 1 7 S - N 1 1 8 G , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4  
G - N 2 5 G - A 1 1 6 N - N 1 1 7 S - N 1 1 8 G , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7  
Q - S 2 4 R - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7  
Q - G 2 3 A - S 2 4 G - N 2 5 G - G 2 1 1 R - N 2 1 2 S - K 2 1 3 V , G 9 7 A -  
G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - T 5 5 P - N 6 1 P - S 7 8 N - S 1 0  
1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - S 7 8 N - S 8 7 T  
- A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - I 1 1 5 V -  
A 2 7 3 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 2 5 Y - T 5 5 P , G 9 7 A - G 1  
2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - T 5 5 P - N 6 1 P - S 7 8 N -  
S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2  
1 7 Q - Q 5 9 S - N 6 1 P - N 2 4 0 K , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 1 6  
1 P - L 2 6 7 V , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G  
- T 5 5 P - N 6 1 P - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N , G 9 7  
A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N , G 9 7 A -  
G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - N 6 1 P - S 1 0 1 N , G 9 7 A - G 1  
2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - T 5 5 P - S 1 0 1 N - V 2 0 3  
Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 2 4 0 K , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7  
Q - S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - T 5 5 P - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0  
1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - T 5 5 P  
- S 1 0 1 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 6 1 P - S 6 3 H - A 1 2 8 S -  
P 1 2 9 Q , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 8 9 Y - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G -  
G 1 3 1 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S  
- V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - I 1 1 5 V - N 2 4 0 K , G 9 7 A  
- G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 5 3 G - N 6 1 P - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1  
0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 1 6 1 P - V 2 0 3 Y , G  
9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - N 2 4 0 K , G 9 7  
A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - P 2 3 9 R , G 9 7 A -  
G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - N 6 1 P - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9  
G - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G  
- I 1 1 5 V - A 1 3 4 T , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - Y 6 Q - P 1 2 9 Q -  
S 1 3 0 G - G 1 3 1 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - S 7 8 N - S  
8 9 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - T 5 5 P - S 7 8 N  
- A 8 8 V - S 1 0 1 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 6 1 P - S 6 3 H - S  
7 8 N - I 1 1 1 V - A 1 3 4 T , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2  
5 G - S 5 3 G - T 5 5 P - S 7 8 N - S 1 0 1 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q  
- S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - S 7 8 N - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1  
2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 5 3 G - N 6 1 P - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2  
8 A - Y 2 1 7 Q - S 5 3 G - T 5 5 P - S 7 8 N - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A  
- G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 5 3 G - T 5 5 P - N 6 1 P - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8  
8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 2 4 0 K - A 2 7  
3 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G -  
S 1 0 1 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - Q 5 9 S - N 6 1 P - S 8 7 T - A 8  
8 L - S 8 9 G , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 6 1 P - S 6 3 H - S 7 8 N -  
S 1 6 1 P , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 6 1 P - S 6 3 H - S 7 8 N - I 1  
1 1 V , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - A 1 2 8 S - P 1 2 9 Q , G 9  
7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 6 1 P - S 7 8 N - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7  
A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 6 1 E - A 1 4 4 K , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7  
Q - A 1 3 4 T - P 2 3 9 R , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G  
- S 5 3 G - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1

10

20

30

40

50

2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - T 5 5 P - N 6 1 P - S 1 0 1 N  
- V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 6 1 P - S 7 8 N - S 8 7 T - A  
8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5  
5 P - N 2 4 0 K , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - S 8 7 T  
- A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - P 1 2 9 Q -  
S 1 3 0 G - G 1 3 1 S - P 2 3 9 R , G 9 7 A - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q , G 9 7 A -  
G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 5 3 G - N 6 1 P - S 1 0 1 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y  
2 1 7 Q - I 1 1 1 V - P 1 2 9 Q - G 2 1 1 T , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q -  
S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2  
1 7 Q - Q 5 9 S - N 6 1 P - S 8 7 G - A 8 8 V - S 8 9 A , G 9 7 A - G 1 2 8 A -  
Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1  
N  
, G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S - S 1 6 2  
K , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1  
S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A  
- Y 2 1 7 Q - S 8 7 G - A 8 8 V - S 8 9 A - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S ,  
G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - T 5 5 P - N 6 1  
P - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - I  
1 1 1 V - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q -  
I 1 1 1 V - A 2 7 3 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 6 1 P - S 8 7 T - A  
8 8 L - S 8 9 G , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 2 2 N - S 2 4 A - N 6 1 P  
- S 6 3 H , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q -  
S 5 3 G - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N - P 1 2 9 S - V 2 0  
3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 1 5 9 K - L 2 6 7 V , G 9 7 A - G 1 2  
8 A - Y 2 1 7 Q - P 4 0 E - S 5 3 Y - S 7 8 Y - P 8 6 S - S 8 7 G - A 8 8 V , G  
9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 R - S 1 4 5 D , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2  
1 7 Q - I 1 1 1 V - S 1 5 9 K , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - P 1  
2 9 L , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - Q 5 9 S - N 6 1 P - V 2 0 3 Y , G 9 7  
A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S  
1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - S 5  
3 G - S 7 8 N - S 1 0 1 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 5 3 G - N 6 1 P  
- S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1  
2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 8 9 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 R - P 1 2  
9 V , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 8 7 G - A 8 8 V - S 8 9 A - A 1 1 6 N  
- N 1 1 7 S - N 1 1 8 G - P 1 7 2 H , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - I 1 1 1  
V - A 1 3 4 T , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - Q 5 9 S - N 6 1 P - P 1 2 9 Q  
- S 1 3 0 G - G 1 3 1 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - P 5 S - S 8 7 G - A  
8 8 V - S 8 9 A - A 1 1 6 G - N 1 1 7 R , Y 2 1 7 Q - N 6 1 P - A 9 7 G - G 1 0  
2 A - A 1 2 8 G - P 1 2 9 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5  
G - S 5 3 G - N 6 1 P - S 7 8 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 1 4 5 D -  
S 1 5 9 K - N 2 4 0 K - Q 2 7 5 E , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P -  
A 1 2 8 S - P 1 2 9 D , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - G 2 3 A - S 2 4 G - N  
2 5 G - A 1 2 8 S - P 1 2 9 D , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2  
5 G - S 5 3 G - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G  
1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - I 1 1 1 V - P 2 3 9 R , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q -  
S 8 7 G - A 8 8 V - S 8 9 A - S 1 6 2 K , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 8  
7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - I 1 1 5 V , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G  
- N 2 5 G - T 5 5 P - S 7 8 N , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5 5 P - A 9  
2 G , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - S 5 3 G - S 8 7 T -  
A 8 8 L - S 8 9 G - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 2 2 N - S 2

10

20

30

40

50

4 A - T 5 5 P , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 5 3 G - S 8 7 T - A 8 8 L -  
 S 8 9 G - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N  
 2 5 G - S 5 3 G - T 5 5 P - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G , G 9 7 A - G  
 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S - S 1 5 9 K , G 9 7 A -  
 Y 2 1 7 Q - N 6 1 P - N 6 2 Q - G 1 0 0 N - A 1 2 8 G , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y  
 2 1 7 Q - S 2 4 R - S 7 8 N - S 1 8 2 P - L 2 6 7 V , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2  
 1 7 Q - P 2 3 9 R - A 2 7 3 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 5 3 G - S 7  
 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A  
 - Y 2 1 7 Q - P 1 2 9 Q - S 1 3 0 G - G 1 3 1 S - T 2 4 2 R , G 9 7 A - G 1 2 8  
 A - Y 2 1 7 Q - S 3 F - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - G 2 1 1 T , G 9 7 A - G 1  
 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - L 7 5 H - N 7 6 G , G 9 7 A - G 1 2 8 A  
 - Y 2 1 7 Q - S 5 3 G - T 5 5 P - N 6 1 P - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9  
 G , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - A 1 4 4 K ,  
 G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - V 2 0  
 3 Y , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - Q 5 9 S - N 6 1 P - A 1 1 6 N - N 1 1 7  
 S - N 1 1 8 G , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G -  
 I 1 1 1 V , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 R - S 1 4 5 D - P 2 3 9 R -  
 Q 2 7 5 E , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 1 4 5 D - A 2 7 3 S , G 9 7 A -  
 G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - K 1 4 1 E - T 2 4 2 R , G 9 7 A - G  
 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9  
 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - A 1 1 6 N - N 1 1 7 S - N 1 1 8 G - P 1 2 9 Q - S  
 1 3 0 G - G 1 3 1 S , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 8 9 Y - G 2 1 1 T , G  
 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 8 7 G - A 8 8 V - S 8 9 A - A 1 1 6 N - N 1 1  
 7 S - N 1 1 8 G - A 1 4 4 T , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5  
 G - S 7 8 N - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - S 1 0 1 N - V 2 0 3 Y , G 9 7 A - G  
 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 G - N 2 5 G - P 1 2 9 V , G 9 7 A - Y 2 1 7 Q - N 6  
 1 P - A 1 2 8 G - P 1 2 9 S - S 1 3 0 P , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - T 5  
 5 P - N 6 1 P - S 8 7 T - A 8 8 L - S 8 9 G - G 1 1 0 C - S 1 3 0 P , G 9 7 A -  
 Y 2 1 7 Q - N 1 2 3 G - A 1 2 8 G , G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - N 6 1 P -  
 N 6 2 Q - G 1 0 0 N - G 1 0 2 A - M 1 2 4 I , S 7 8 N - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y  
 2 1 7 Q , G 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , G 9 7 A - G 1 2 8 A - A  
 1 3 7 V - Y 2 1 7 Q , N 6 1 P - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , G 9 7 A - G 1  
 2 8 A - S 1 3 0 P - Y 2 1 7 Q , G 9 7 A - Q 1 0 3 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S  
 6 3 T - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , G 9 7 A - G 1 0 2 A - G 1 2 8 A - Y 2  
 1 7 Q , G 9 7 A - N 1 0 9 D - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 8 R , S 8 7 R - G 9  
 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , G 9 7 A - G 1 2 8 A - S 1 8 8 D - Y 2 1 7 Q , S 8  
 7 D - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 8 R , G 9 7 A - G 1 2 8 A - S 1 8  
 8 D - S 2 4 8 R - Y 2 1 7 Q , G 9 7 A - G 1 2 8 A - S 2 4 8 D - Y 2 1 7 Q , S 7  
 8 N - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - L 2 6 7 V , S 7 8 N - G 9 7 A - G 1 2 8  
 A - Y 2 1 7 Q - S 1 6 1 P , S 7 8 N - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - I 1 1 5  
 V , S 7 8 N - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - A 2 7 3 S , S 7 8 N - G 9 7 A -  
 G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - G 2 1 1 T , S 7 8 N - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q ,  
 S 7 8 N - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - I 1 1 1 V , S 7 8 N - G 9 7 A - G 1  
 2 8 A - Y 2 1 7 Q - V 1 4 7 L , S 7 8 N - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - I 1  
 0 8 V , S 7 8 N - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 8 9 Y , 及び S 7 8 N - G 9  
 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - A 1 3 8 T , のうちの 1、2、3、4、5、6、7、8  
 、9、10、11 又はそれ以上を含む、スプチリシン変異体、特に成熟 B P N ' ( 配列番  
 号 2 ) の変異体などの好適な冷水プロテアーゼを提供し、ここで、変異体配列の位置は、  
 配列番号 2 の位置に対応させることにより番号付けされる。

【 0 1 7 3 】

10

20

30

40

50

別の態様では、この冷水プロテアーゼは、配列番号2を有するスブチリシンBPN'の変異体であり、ここで、この変異体は、アミノ酸位置24、25、40、52、53、55、58、59、61、62、63、68、78、86、87、88、89、92、96、97、100、101、103、104、106、111、114、115、116、117、118、123、124、125、126、128、129、130、131、132、133、134、144、145、159、161、162、167、194、203、206、213、217、227、232、239、240、242、265、267及び275から選択される3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15又はそれ以上の変異を含み、ここで、変異体配列の位置は、配列番号2のアミノ酸配列における位置に対応させることにより番号付けされる。

10

## 【0174】

別の態様では、この冷水プロテアーゼは、配列番号2を含むスブチリシンBPN'の変異体(すなわち、BPN'スブチリシン変異体)であり、ここで、この変異体は、群(a)及び(b); (a)N61E, A144K, P129E, P239R, P40E, Q103E, Q206E, Q7275E, S145D, S159K, S162K, S24R, S63H, S87D及びT242Rからなる群から選択される、帯電している変異、並びに(b)A114G, A116N, A133V, A134T, A232T, A88V, A92G, F58G, G100T, G128A, G131S, G97A, I111V, I115V, K213L, K265N, L126A, L267V, L96T, M124V, N117S, N118G, N123G, N240K, N25G, N61P, N62Q, N62R, N62S, P129Q, P129V, P194L, P239V, P52L, P86S, Q59S, S101N, S125A, S130G, S132N, S161P, S24G, S53G, S78N, S87G, S89Y, T55P, V203Y, V227T, V68A, W106F, Y104N, Y167A, 及びY217Q, からなる群から選択される、中性の変異; から選択される合計で3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15又はそれ以上の変異を含み、ここで、変異体配列の位置は、配列番号2のアミノ酸配列における位置に対応させることにより番号付けされる。

20

## 【0175】

## 本発明の核酸

本発明は、単離された、非自然発生の又は組み換え核酸(本明細書では「ポリヌクレオチド」とも呼ぶ)を提供し、これは集合的に「本発明の核酸」又は「本発明のポリヌクレオチド」とも呼ばれ得、これは本発明のポリペプチド(例えば、プロテアーゼ変異体)をコードする。下記全てを含む本発明の核酸は、本発明のポリペプチドの組み換え体生産(例えば、発現)に有用であり、典型的には、この生産には所望のポリペプチドをコードする配列又はその断片を含むプラスミド発現ベクターの発現を介する。上述のように、ポリペプチドとしては、クリーニングする必要のある物品又は表面(例えば、物品の表面)を洗浄するためのクリーニング用途及びクリーニング組成物に有用である酵素活性(例えば、タンパク質分解活性)を有するスブチリシン変異体ポリペプチドなどのプロテアーゼ変異体ポリペプチドが挙げられる。

30

## 【0176】

本発明は、「本発明のポリペプチド」と題された節に上述した、並びに、パートI実施例及びパートII実施例などの実施例が挙げられるがこれに限定されない本明細書の他箇所の、本発明の任意のタンパク質、ポリヌクレオチド又はプロテアーゼ変異体(任意の融合タンパク質などが挙げられる)をコードするポリヌクレオチド配列あるいはこれらの相補的ポリヌクレオチド配列を含む、単離された、組み換え、実質的に純粋な又は非自然発生の核酸を含む。本発明はまた、上記、並びに、パートI実施例及びパートII実施例などの実施例が挙げられるがこれに限定されない本明細書の他箇所の、本発明の任意のポリヌクレオチド、タンパク質又はプロテアーゼ変異体(任意の融合タンパク質が挙げられる)の2つ以上の組み合わせをコードするポリヌクレオチド配列を含む、単離された、組み換え、実質的に純粋な又は非自然発生の核酸を提供する。

40

50

## 【0177】

第十態様では、本発明は、本発明の第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八若しくは第九態様の変異体（又は第三態様にあるようなポリペプチド）をコードするポリヌクレオチド配列又はこれらの相補的ポリヌクレオチド配列を含む、単離された、非自然発生型の又は組み換え核酸を提供する。

## 【0178】

第十一態様では、本発明は、配列番号3又は配列番号5に記載のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列あるいはこれらの相補的ポリヌクレオチド配列を含む、単離された、非自然発生型の又は組み換え核酸を提供する。

10

## 【0179】

本発明は、配列番号2のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含むプロテアーゼ変異体をコードする核酸を更に提供し、ここで、このプロテアーゼ変異体の合計正味電荷は、バチルス・アミロリケファシエンス (*B. amyloliquefaciens*) BPN' スブチリシンプロテアーゼの合計正味電荷と比較して+1、+2、+3、+4、+5、0、-1、-2、-3、-4又は-5であり、ここで、このプロテアーゼ変異体のアミノ酸位置は、バチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) スブチリシンBPN' アミノ酸配列とこのプロテアーゼ変異体のアミノ酸配列のアラインメントを行うことにより判定される配列番号2に示されるバチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) スブチリシンBPN' のアミノ酸配列中の対応するアミノ酸位置の番号付けに従って、番号付けされる。

20

## 【0180】

本発明は、バチルス・アミロリケファシエンス (*B. amyloliquefaciens*) BPN' スブチリシンプロテアーゼのスブチリシン変異体をコードする核酸を提供し、ここで、このBPN' スブチリシンプロテアーゼは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、ここで、このプロテアーゼ変異体は、アミノ酸位置1~275から選択されるアミノ酸位置において2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25以下の変異で配列番号2のアミノ酸配列と異なるアミノ酸配列を含み、ここで、このスブチリシン変異体のアミノ酸位置は、配列番号2として記載されているバチルス・アミロリケファシエンス (*B. amyloliquefaciens*) スブチリシンBPN' のアミノ酸配列に対応させることにより番号付けされ、ここで、このプロテアーゼ変異体のアミノ酸位置は、このプロテアーゼ変異体とのアラインメントにより判定される配列番号2に示されるバチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) スブチリシンBPN' のアミノ酸配列中の対応するアミノ酸位置の番号付けに従って、番号付けされる。

30

## 【0181】

本発明は、配列番号2のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含むスブチリシン変異体をコードする核酸を提供し、ここで、このプロテアーゼ変異体の合計正味電荷は、バチルス・レントス (*Bacillus lentus*) スブチリシンBPN' プロテアーゼの合計正味電荷と比較して+1、+2、+3、+4、+5、0、-1、-2、-3、-4又は-5であり、ここで、このプロテアーゼ変異体のアミノ酸位置は、バチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) スブチリシンBPN' アミノ酸配列とこのプロテアーゼ変異体のアミノ酸配列のアラインメントを行うことにより判定される配列番号2に示されるバチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) スブチリシンBPN' のアミノ酸配列中の対応するアミノ酸位置の番号付けに従って、番号付けされる。

40

## 【0182】

上記低イオン強度プロテアーゼ変異体は、典型的には洗濯洗浄機内で、水に希釈されて洗濯洗剤洗浄液を形成する洗剤組成物の部分を形成し得、その伝導率は、約0.1 mS/cm~約3 mS/cm、約0.3 mS/cm~約2.5 mS/cm、又は更には約0.5

50

mS / cm ~ 約 2 mS / cm である。このプロテアーゼ変異体は、高イオン強度のプロテアーゼ変異体であってもよい。このような高イオン強度のプロテアーゼ変異体は、2つ以上の変異を含み、配列番号2に示される野生型 B P N ' スブチリシンプロテアーゼと比較して + 5、+ 4、+ 3、+ 2、+ 1 又は 0 の合計正味電荷を有する。

#### 【 0 1 8 3 】

上記高イオン強度のプロテアーゼ変異体は、典型的には洗濯洗浄機内で、水に希釈されて洗濯洗剤洗浄液を形成する洗剤組成物の部分を形成し得、その伝導率は、約 3 mS / cm ~ 約 30 mS / cm、約 3 . 5 mS / cm ~ 約 20 mS / cm、又は更には約 4 mS / cm ~ 約 10 mS / cm である。

#### 【 0 1 8 4 】

このプロテアーゼ変異体の電荷は、配列番号2のアミノ酸配列を有する B P N ' と比較して表される。単一負電荷を付与するアミノ酸は D 及び E であり、単一正電荷を付与するアミノ酸は R、H 及び K である。電荷を変化させる配列番号2に対するアミノ酸変化は、プロテアーゼ変異体の電荷を計算するために使用される。例えば、野生型の中性位置に負電荷変異を導入することはプロテアーゼ変異体に - 1 の正味電荷を加えることになり、一方、野生型正アミノ酸残基 ( R、H 又は K ) に負電荷変異 ( D 及び E ) を導入することは - 2 の正味電荷を加えることになる。配列番号2のアミノ酸配列を有する B P N ' に対してプロテアーゼ変異体について異なるアミノ酸残基全ての電荷変化を合計すると、プロテアーゼ変異体の電荷変化が得られる。理論に束縛されるものではないが、低伝導率の洗濯洗剤溶液中で使用されるべき冷水プロテアーゼについて好ましい電荷範囲は - 5、- 4、- 3、- 2、- 1、0、好ましくは - 2、- 1 であり、高伝導率洗濯洗剤溶液中で使用されるべき冷水プロテアーゼについて好ましい電荷範囲は + 5、+ 4、+ 3、+ 2、+ 1、0、好ましくは + 2、+ 1 である。電荷を正しく選択することにより、予想外にレベルの改善された冷水クリーニング性能を得ることができる。「低伝導率の洗濯洗剤溶液」は、約 0 . 1 mS / cm ~ 約 3 mS / cm、約 0 . 3 mS / cm ~ 約 2 . 5 mS / cm、又は更には約 0 . 5 mS / cm ~ 約 2 mS / cm の伝導率を有するものとして定義される。「高伝導率の洗濯洗剤溶液」は、約 3 mS / cm ~ 約 30 mS / cm、約 3 . 5 mS / cm ~ 約 20 mS / cm、又は更には約 4 mS / cm ~ 約 10 mS / cm の伝導率を有するものとして定義される。上記の例は非限定的であることが意図されている。冷水性能を最適化するために変異が組み合わされる場合にも、酵素電荷は更なる位置における変異により均衡が得られ得る。

#### 【 0 1 8 5 】

本発明は、冷水プロテアーゼ及び少なくとも1つの冷水プロテアーゼを含む製品を含む。一態様では、この冷水プロテアーゼは配列番号2を有するスブチリシン B P N ' の変異体であり、上記変異体は1つ以上の変異を有するアミノ酸配列を含み、野生型 B P N ' ( 配列番号2 ) と比較して - 1、0 又は + 1 の合計正味電荷を有する。負電荷を付与するアミノ酸は典型的には D 及び E であり、正電荷を付与するアミノ酸は典型的には R、H 及び K である。理論に束縛されるものではないが、この電荷範囲 ( - 1、0、+ 1 ) は、冷水性能をもたらすのに最適な電荷であると考えられる。しかしながら、これらの例は、非限定的として見るべきである。一態様では、冷水性能を最適化するために変異が組み合わされた場合、酵素電荷は、更なる位置における変異により均衡が得られる。

#### 【 0 1 8 6 】

本発明は、タンパク質分解活性を有する、単離された、組み換え型の、実質的に純粋な又は非自然発生型のプロテアーゼ変異体 ( 例えば、スブチリシン変異体 ) を提供し、上記プロテアーゼ変異体は、50、45、40、35、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9 又は 8 のアミノ酸残基により配列番号2に示されるアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含み、ここで、アミノ酸位置は、パチルス・アミロリケファシエンス ( *Bacillus amyloliquefaciens* ) スブチリシン B P N ' アミノ酸配列とプロテアーゼ変異体のアミノ酸配列のアライメントを行うことにより判定される配列番号2に示すパチルス・アミロリケファシエンス ( *Bacillus amyloliquefacie*

10

20

30

40

50

ns) スブチリシン B P N ' アミノ酸配列のアミノ酸配列中の対応するアミノ酸位置の番号付けに従って番号付けされ、スブチリシン変異体は B P N ' - v 3 (配列番号 4) 又は B P N ' - v 3 6 (配列番号 6) のアミノ酸配列を包含する。

【0187】

一態様では、本発明は、タンパク質分解活性を有する、単離された、組み換え型の、実質的に純粋な又は非自然発生型のプロテアーゼ変異体 (例えば、スブチリシン変異体) を提供し、上記プロテアーゼ変異体は、50、45、40、35、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、6、5、4、3、2 のアミノ酸残基により配列番号 2 に示されるアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含み、ここで、アミノ酸位置は、本明細書で上述されているように、バチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) スブチリシン B P N ' アミノ酸配列とプロテアーゼ変異体のアミノ酸配列のアライメントを行うことにより判定される配列番号 2 に示すバチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) スブチリシン B P N ' のアミノ酸配列中の対応するアミノ酸位置の番号付けに従って番号付けされる。

【0188】

本発明は、(a) パート I 実施例に記載のプロテアーゼ変異体が挙げられるがこれらに限定されない本明細書に記載の任意のプロテアーゼ変異体などの本発明の少なくとも 1 つのプロテアーゼ変異体、(b) 本発明の少なくとも 1 つの冷水プロテアーゼ、又は (c) パート II 実施例に記載のシリーズ I G G 3 6 変異体が挙げられるがこれらに限定されない本明細書に記載の任意のプロテアーゼ変異体などの本発明の少なくとも 1 つのプロテアーゼ変異体、をコードするポリヌクレオチド配列又はこれらのいずれかの相補的ポリヌクレオチド配列を含む、単離された、組み換え型の又は非自然発生型の核酸を含む。別の態様では、本発明は、本発明の少なくとも 1 つの核酸を含む発現ベクターを提供する。この発現ベクターは、プロモーターに作用可能に連結され得る。

【0189】

別の態様では、本発明は、配列番号 3 又は配列番号 5 に記載のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又は 100% の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列あるいはこれらの相補的ポリヌクレオチド配列を含む、核酸を提供する。

【0190】

本発明の核酸は、任意の好適な合成、操作及び/又は単離技術あるいはこれらの組み合わせを使用することにより、生じさせることができる。例えば、本発明のポリヌクレオチドは、当業者に周知である固相合成技術などの標準的核酸合成技術を用いて、製造することができる。このような技術では、最大 50 個又はそれ以上のヌクレオチド塩基の断片が典型的には合成され、その後、(例えば、酵素又は化学的連結方法、あるいは、ポリメラーゼを介した組み換え方法により) 連結され、任意の所望の連続的な核酸配列が本質的に形成される。本発明の核酸の合成はまた、古典的なホスホルアミダイト方法を用いる化学合成が挙げられるがこれに限定されない当該技術分野において既知の任意の好適な方法により、促進 (又は代替的に達成) することができる (例えば、Beaucage et al., *Tetrahedron Letters* 22: 1859~69 (1981)) ; 又は自動化合成方法において典型的に実践されているものとして Matthes et al., *EMBO J.* 3: 801~805 (1984) により記載の方法を参照されたい)。本発明の核酸はまた、自動 DNA 合成装置を用いることにより、製造することができる。注文に応じ合成される核酸は、様々な商業的供給元に発注することができる (例えば、The Midland Certified Reagent Company、the Great American Gene Company、Operon Technologies Inc. 及び DNA 2.0)。核酸を合成するための他の技術及び関連する原理は、当該技術分野で既知である (例えば、Itakura et al., *Ann. Rev. Biochem.* 53: 323 (1984)) ; 及び Itakur

10

20

30

40

50

a et al., Science 198:1056 (1984)を参照されたい。  
【0191】

上記に示しているように、核酸の修飾に有用なDNA組み換え技術は、当該技術分野において周知である。例えば、制限エンドヌクレアーゼ消化、連結、逆転写及びcDNA生産並びにポリメラーゼ連鎖反応(例えば、PCR)などの技術は、既知であり、当業者により容易に採用される。本発明のヌクレオチドはまた、本発明のプロテアーゼ変異体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに対してハイブリッド形成できる又はそのポリヌクレオチドをPCR増幅できる1つ以上のオリゴヌクレオチドプローブを使用して、cDNAライブラリ(例えば、本明細書に記載のものなどの当該技術分野で一般に使用される変異誘発技術を用いて生じさせたcDNAライブラリ)をスクリーニングすることにより得てもよい。cDNAをスクリーニング及び単離するための手順並びにPCR増幅手順は、当業者に周知であり、当業者に既知の標準的な参照文献に記載されている。本発明の一部の核酸は、例えば、既知の変異誘発手順(例えば、部位特異的変異誘発、部位飽和変位誘発及びインビトロ組み換え)によって(例えば、酵素又は親プロテアーゼをコードする)自然発生的にポリヌクレオチド主鎖を変更することにより、得ることができる。

10

【0192】

本発明は、本発明の標的核酸(例えば、配列番号3又は5)又はその相補的ポリヌクレオチド配列に対してハイブリッド形成する核酸を含み、ここで、ハイブリッド形成は実質的に標的核酸の全長にわたる。ハイブリッド形成する核酸は、少なくとも厳密な条件下で又は少なくとも厳密度の高い条件下で本発明のヌクレオチド配列に対してハイブリッド形成し得る。核酸ハイブリッド形成実験に関する、現密度が中程度の条件、厳密な条件及び厳密度の高い条件は既知である。このような厳密度のレベルを達成するために組み合わせることができる因子の例は、本明細書に簡潔に議論される。

20

【0193】

水素結合、溶媒排除、塩基スタッキング及びこれらに類するものなどの様々な明確な特徴を持つ物理化学的な力により、核酸はハイブリッド形成する。核酸のハイブリッド形成についての広範なガイドは、P. Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes, vol. 24, part I, chapter 2, 「Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays,」 (Elsevier, N.Y.) (本明細書では以降「Tijssen」)に見られる。Hames and Higgins (1995) Gene Probes 1及び2も参照されたい。2つの核酸配列が実質的に同一であることの指標としては、2つの分子が少なくとも厳密な条件下で互いにハイブリッド形成することが挙げられる。サザン及びノザンハイブリッド形成などの核酸ハイブリッド形成実験の文脈での厳密なハイブリッド形成条件は配列に依存し、異なる環境パラメーター下では異なる。厳密度の高い条件は典型的には、ハイブリッド形成が、約5で、又は、定義されたイオン強度及びpHでの特定の配列についての熱的な融解温度( $T_m$ )未満で、生じるように選択される。 $T_m$ は、(定義されたイオン強度及びpH下で)完全に適合するプローブに対して試験配列の50%がハイブリッド形成する温度である。 $T_m$ は所与の条件下で核酸二重鎖が50%変性する温度を示し、核酸ハイブリッドの安定性の直接の尺度を表す。したがって、 $T_m$ は、ヘリックスからランダムコイルへの移行における中間点に対応する温度に対応し、長さ、ヌクレオチド組成、及びヌクレオチドの長い伸張に対するイオン強度に依存する。厳密な条件下では、プローブは、典型的には、その標的配列に対してハイブリッド形成するが、他の配列に対しては全くハイブリッド形成しない。「非常に厳密な条件」が選択されると、特定のプローブについての $T_m$ と等しいものになる。

30

40

【0194】

DNA-DNA二重鎖の $T_m$ は、等式(1)を用いて概算することができる： $T_m$ (

50



) = 81.5 + 16.6 (log<sub>10</sub> M) + 0.41 (% G + C) - 0.72 (% f) - 500 / n、式中、Mは一価カチオン(通常はNa<sup>+</sup>)の容量モル濃度であり、(% G + C)はグアノシン(G)及びシトシン(C)ヌクレオチドの百分率であり、(% f)はホルムアミド(formaldehyde)の百分率であり、nはハイブリッドのヌクレオチド塩基の数(すなわち、長さ)である。RNA-DNA二重鎖のT<sub>m</sub>は、等式(2)を用いて概算することができる: T<sub>m</sub>(°C) = 79.8 + 18.5 (log<sub>10</sub> M) + 0.58 (% G + C) - 11.8 (% G + C)<sup>2</sup> - 0.56 (% f) - 820 / n、式中、Mは一価カチオン(通常はNa<sup>+</sup>)の容量モル濃度であり、(% G + C)はグアノシン(G)及びシトシン(C)ヌクレオチドの百分率であり、(% f)はホルムアミドの百分率であり、nはハイブリッドのヌクレオチド塩基の数(すなわち、長さ)である。上記等式1及び2は、典型的には、約100~200ヌクレオチドよりも長いハイブリッド二重鎖についてのみ正確である。50ヌクレオチドよりも短い核酸配列のT<sub>m</sub>は、次のように計算することができる: T<sub>m</sub>(°C) = 4(G + C) + 2(A + T)、式中、A(アデニン)、C、T(チミン)及びGは、対応するヌクレオチドの数である。

#### 【0195】

ハイブリッド形成をしない核酸物質は典型的には一連の洗浄により除去され、ハイブリッド形成分析を行う際にその厳密度は所望される結果に応じて調整することができる。(例えば、より高い塩濃度及びより低い温度を用いる)厳密度の低い洗浄条件は、感度を上昇させるが、不特定のハイブリッド形成シグナル及び高いバックグラウンドシグナルを生産し得る。(例えば、より低濃度の塩及びハイブリッド形成温度により近いより高い温度を用いる)厳密度のより高い条件は、典型的には特定のシグナルを維持したまま、バックグラウンドシグナルを低下させる。更なるガイドとしては、上記Hames and Higginsを参照されたい。

#### 【0196】

少なくとも100ヌクレオチドを含む少なくとも2つの核酸の分析のための代表的な厳密な条件としては、50%ホルマリン(すなわちホルムアミド)を42の1ミリグラム(mg)のヘパリンと共に含むサザン又はノザンプロットにおける溶液中又はフィルター上でのインキュベーションが挙げられ、この場合、ハイブリッド形成は一晩行われる。標準的な厳密度での洗浄は、0.2x SSC緩衝洗浄液を含む溶液を用いて約65にて約15分にわたって行うことができる(SSC緩衝液の説明についてはSambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press及びその第三版(2001)を参照されたい)。標準的な厳密度で洗浄する前に、厳密度の低い洗浄を行なってバックグラウンドプロンプシグナルを除去してもよい。厳密度の低い洗浄は、例えば、2x SSC緩衝液を含む溶液中で約40にて約15分にわたって行うことができる。厳密度の高い洗浄は、0.15MのNaClを含む溶液を用いて約72にて約15分にわたって行うことができる。代表的な厳密度が中程度の条件としては、20%ホルマリン(すなわちホルムアミド)、0.5x SSC、50mMのリン酸ナトリウム(pH 7.6)、5xデンハルト溶液、10%硫酸デキストラン及び20mg/mLの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中で37にて一晩インキュベーションした後に1x SSC中で約37~50にてフィルターを洗浄することが挙げられる。厳密度の高い条件は、(a)例えば、50にて0.015Mの塩化ナトリウム/0.0015Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)といった、洗浄に低イオン強度及び高温を使用する条件、(b)例えば、50%(v/v)ホルムアミドを0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)/0.1% Ficoll/0.1%ポリビニルピロリドン(PVP)/50mMのリン酸ナトリウム緩衝液と共にpH 6.5にて750mMの塩化ナトリウム、75mMのクエン酸ナトリウムを42にて、といった、ハイブリッド形成中に変性剤を採用する条件あるいは、(c)50%ホルムアミド、5x SSC(0.75MのNaCl/0.075Mのクエン酸ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH 6.8)、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5xデンハルト溶液、音波処

10

20

30

40

50

理したサケ精子DNA (50 µg/mL)、0.1% SDS及び10%硫酸デキストランを42にて、(1)0.2x SSC中で42、(2)50%ホルムアミド中で55、及び(3)0.1x SSC中で55 (好ましくはEDTAと共に)、における洗浄と共に、採用する条件である。特定のハイブリッド形成アッセイにおいて関連しないプローブについて観察される2x又は2.5x~5xのシグナル対ノイズ比は、特定のハイブリッド形成の検出を示す。本発明の文脈における、少なくとも厳密なハイブリッド形成の検出は、本発明の核酸に対して配列類似性又は相同性が高いことを指す。

#### 【0197】

ベクター、細胞及び本発明のプロテアーゼ変異体ポリペプチドの製造方法

10

例えば、部位特異的飽和変異誘発、走査変異誘発、挿入変異誘発、欠失変異誘発、無作為変異誘発、部位特異的変異誘発及び指向進化、並びに、様々な他の組み換え方法が挙げられるがこれらに限定されない、本発明のプロテアーゼ変異体をコードする本発明の改変されたポリヌクレオチドを生産するのに好適である様々な方法が当該技術分野で既知である。改変されたポリヌクレオチド及びタンパク質(例えば、プロテアーゼ変異体)の製造方法としては、DNAシャッフリング法(例えば、Stemmer WP, Proc. Natl. Acad. Sci. USA Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(22):10747~51(1994)を参照されたい)、遺伝子の非相同組み換えに基づく方法、例えば、ITCHY(Ostermeier et al., Bioorg. Med. Chem. 7:2139~44[1999])、SCRATCHY(Lutz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:11248~53[2001])、SHIPREC(Sieber et al., Nat. Biotechnol. 19:456~60[2001])、NRR(Bittker et al., Nat. Biotechnol. 20:1024~9[2001])、Bittker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:7011~6[2004])、オリゴヌクレオチドの使用に依拠してランダム及び標的変異、欠失及び/又は挿入を行なう方法(Ness et al., Nat. Biotechnol. 20:1251~5[2002]; Coco et al., Nat. Biotechnol. 20:1246~50[2002]; Zha et al., Chembiochem. 4:34~9[2003]; Glaser et al., J. Immunol. 149:3903~13[1992])が挙げられ、Arkin and Youvan, Biotechnology 10:297~300(1992); Reidhaar-Olson et al., Methods Enzymol. 208:564~86(1991)も参照されたい。

20

30

一態様では、親ポリヌクレオチドの全長を適切な発現プラスミドに連結し、以下の変異誘発方法を使用して本発明の改変プロテアーゼの構築を促進するが、他の方法を使用してもよい。この方法は、Pisarchik et al.に記載のものに基づく(Pisarchik et al., Prot. Eng. Des. Select. 20:257~265[2007])。一態様では、制限酵素がその認識配列の外側を切断する点において付加的な利点をもたらされ、これにより、任意のヌクレオチド配列の消化が実践的に可能になり、制限部位の痕の形成を防止する。

40

#### 【0198】

一手法では、プロテアーゼの全長をコードする自然に生じる遺伝子を得、配列決定し、1つ以上のアミノ酸にて変異(例えば、欠失、挿入、置換)を作製することが所望される1つ以上の点について調査する。所望の配列にぴったり一致するように配列を変化させるための遺伝子の変異は、一般に既知の方法に従うプライマー伸長により達成される。変異の所望される点の左側までの断片及び右側までの断片はPCRにより増幅され、かつEam1104I制限部位を包含することになる。この左側断片及び右側断片は、Eam11

50

04Iにより消化されて、相補的な3塩基突出部を有する複数の断片を生じ、これは次にプールされ、連結されて、1つ以上の変異を含有する改変配列のライブラリを生じる。この方法は、フレームシフト変異の発生を回避する。また、すべてのオリゴヌクレオチドは同一の制限部位を有するように合成でき、かつ一部の他の方法により必要とされるような、制限部位を作る合成リンカーを必要としないことから、この方法は変異誘発プロセスを単純化する。

【0199】

一態様では、本発明は、冷水プロテアーゼの作製方法を含み、この方法は、(a)親プロテアーゼをコードするDNA基質分子の核酸変異体のライブラリをもたらすこと、(b)核酸変異体のライブラリを宿主細胞に形質転換させること、(c)ライブラリを発現させてポリペプチド発現産物をもたらすこと、(d)ポリペプチド発現産物をスクリーニングして、(i)パートI実施例1に記載の「試験方法」に定義されるようにPURAFECT(登録商標)Prime(アミノ酸置換Y217Lを有する配列番号2)と比較してpH 8及び16にて血液/ミルク/インク(BMI)のシミに対して1.1~10の性能指数を有する、(ii)本明細書のパートI実施例1に記載の「試験方法」に定義されるようにBPN'(配列番号2)と比較してpH 8及び16にてBMIのシミに対して1.3~10の性能指数を有する、(iii)本明細書のパートI実施例1に記載の「試験方法」に定義されるようにBPN'-v3(配列番号4)と比較してpH 8及び16にてBMIのシミに対して0.9~約10の性能指数を有する、並びに(iv)本明細書のパートI実施例1に記載の「試験方法」に定義されるようにBPN'-v36(配列番号6)と比較してpH 8及び16にてBMIのシミに対して1.0~約10の性能指数を有する、からなる群から選択される少なくとも1つの特性を有する変異体プロテアーゼを同定することを含み、ここで、冷水プロテアーゼが同定される。

【0200】

別の態様では、本発明は、本発明の少なくとも1つの核酸を含む発現ベクターを提供する。このような核酸は、(a)パートI実施例に記載のプロテアーゼ変異体が挙げられるがこれらに限定されない本明細書に記載の任意のプロテアーゼ変異体などの本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体、(b)本発明の少なくとも1つの冷水プロテアーゼ、又は(c)パートII実施例に記載のシリーズI G G 3 6変異体が挙げられるがこれらに限定されない本明細書に記載の任意のプロテアーゼ変異体などの本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体、をコードするポリヌクレオチド配列又はこれらのいずれかの相補的ポリヌクレオチド配列を含み得る。このような発現ベクターは、プロモーターに作用可能に連結され得る。

【0201】

別の態様では、本発明は、(a)本発明の核酸、(b)本発明の核酸を含む発現ベクター、(c)例えば、本発明の冷水プロテアーゼが挙げられるがこれに限定されない本発明のプロテアーゼ変異体、を含む組み換え宿主細胞を提供する。この組み換え宿主細胞は、例えば、バチルス細胞が挙げられるがこれに限定されない細菌細胞であり得る。代表的なバチルス細胞は、枯草菌(Bacillus subtilis)細胞である。

【0202】

別の態様では、本発明は、(a)本発明の核酸、(b)本発明の核酸を含む発現ベクター、(c)例えば、本発明の変異体の冷水プロテアーゼが挙げられるがこれに限定されない本発明のプロテアーゼ変異体、を含む細胞培養物を提供する。

【0203】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載の本発明の少なくとも1つのポリヌクレオチド(例えば、本明細書に記載の本発明のプロテアーゼ変異体をコードするポリヌクレオチド)を含む単離されたベクター又は組み換えベクター、本発明の少なくとも1つの核酸又はポリヌクレオチドを含む単離された又は組み換え発現ベクター又は発現カセット、本発明の少なくとも1つの核酸又はポリヌクレオチドを含む単離された、実質的に純粋な又は組み換えDNAコンストラクト、本発明の少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む単離

10

20

30

40

50

された又は組み換え細胞、本発明の少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む細胞を含む細胞培養物、本発明の少なくとも1つの核酸又はポリヌクレオチドを含む細胞培養物、並びに、このようなベクター、核酸、発現ベクター、発現カセット、DNAコンストラクト、細胞、細胞培養物又はこれらの任意の組み合わせ若しくは混合物を含む組成物を提供する。

【0204】

別の態様では、本発明は、本発明の少なくとも1つの核酸又はポリヌクレオチドを含む本発明の少なくとも1つのベクター（例えば、発現ベクター又はDNAコンストラクト）を含む組み換え細胞を提供する。一部のこのような組み換え細胞は、このような少なくとも1つのベクターにより形質転換又はトランスフェクションが行われる。このような細胞は、典型的には、宿主細胞と呼ばれる。一部のこのような細胞は、例えば、枯草菌（*Bacillus subtilis*）細胞などのバチルス種細胞が挙げられるがこれらに限定されない細菌細胞を含む。本発明はまた、本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体を含む組み換え細胞（例えば、組み換え宿主細胞）を提供する。

10

【0205】

別の態様では、本発明は、本発明の核酸又はポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。このベクターは、本発明のプロテアーゼ変異体をコードする本発明のポリヌクレオチド配列が、効率的な遺伝子発現に必要とされる1つ若しくは追加の核酸断片に作用可能に連結される発現ベクター又は発現カセットである（例えば、本発明のプロテアーゼ変異体をコードする本発明のポリヌクレオチドに作用可能に連結されるプロモーター）。ベクターは、抗菌剤含有培地での増殖により、プラスミドが感染した宿主細胞の連続培養の維持を可能にする、転写ターミネーター及び/又は抗生物質耐性遺伝子などの選択遺伝子を含み得る。

20

【0206】

発現ベクターはプラスミド又はウイルスDNAに由来してもよく、代替的態様では両方の要素を含有する。代表的なベクターとしては、pXX、pC194、pJH101、pE194、pHP13が挙げられるがこれらに限定されない（Harwood and Cutting eds., *Molecular Biological Methods for Bacillus*, John Wiley & Sons (1990)の例えば第3章を参照されたい；枯草菌（*B. subtilis*）に好適な複製プラスミドとしては、p92に列挙されているものが挙げられる（Perego, M. (1993) *Integrational Vectors for Genetic Manipulations in Bacillus subtilis* pp. 615~624; A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick (ed.), *Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics*, American Society for Microbiology, Washington, D. C.)。

30

【0207】

細胞内での所望のタンパク質（例えば、プロテアーゼ変異体）の発現及び生産のために、改変プロテアーゼをコードするポリヌクレオチドの少なくとも1つのコピーを含む、好ましくは複数のコピーを含む、少なくとも1つの発現ベクターは、プロテアーゼの発現に好適な条件下で細胞に形質転換される。一態様ではプロテアーゼ変異体をコードするポリヌクレオチド配列（並びにベクター内に含まれる他の配列）は宿主細胞のゲノムの中に組み込まれる一方、別の態様ではプロテアーゼ変異体をコードするポリヌクレオチド配列を含むプラスミドベクターは、細胞内に自律的な染色体要素としてとどまる。本発明は、染色体外の核酸配列、並びに、宿主細胞ゲノムの中に組み込まれる組み込みヌクレオチド配列の両方を提供する。本明細書に記載のベクターは、本発明のプロテアーゼ変異体の製造に有用である。一態様では、このプロテアーゼ変異体をコードするポリヌクレオチドコンストラクトは、このプロテアーゼ変異体をコードするポリヌクレオチドの、細菌染色体へ

40

50

の組み込み、及び場合によっては増幅を可能にする、組み込みベクター上に存在する。組み込みのための部位の例は、当業者に周知である。一態様では、本発明のプロテアーゼ変異体をコードするポリヌクレオチドの転写は、選択された前駆体プロテアーゼのための野生型プロモーターであるプロモーターによりもたらされる。一部の他の態様では、このプロモーターは、前駆体プロテアーゼとは非相同的なものであるが、宿主細胞において機能性である。具体的には、細菌宿主細胞での使用に好適なプロモーターの例としては、例えば、amy E、amy Q、amy L、pst S、sac B、pSPAC、pAprE、pveg、pHpaiIプロモーター、バチルス・ステアロサーモフィラス (*B. stearothermophilus*) マルトース生成アミラーゼ遺伝子、バチルス・アミロリケファシエンス (*B. amyloliquefaciens*) (BAN) アミラーゼ遺伝子、枯草菌 (*B. subtilis*) アルカリプロテアーゼ遺伝子、バチルス・クラウジイ (*B. clausii*) アルカリプロテアーゼ遺伝子、バチルス・プミリス (*B. pumilis*) キシロダーゼ遺伝子、バチルス・チューリングエンシス (*B. thuringiensis*) cry IIIA 及びバチルス・リケニホルミス (*B. licheniformis*) - アミラーゼ遺伝子のプロモーターが挙げられるがこれらに限定されない。追加のプロモーターとしては、A4プロモーター、並びに、ファージラムダP<sub>R</sub>又はP<sub>L</sub>プロモーター、及び、大腸菌lac、trp又はtacプロモーターが挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0208】

本発明のプロテアーゼ変異体は、細菌及び真菌を含む任意の好適なグラム陽性微生物の宿主細胞で製造することができる。例えば、一態様では、このプロテアーゼ変異体は、真菌及び/又は細菌由来の宿主細胞で製造することができる。一態様では、宿主細胞は、バチルス種、ストレプトマイセス種、エシェリヒア種又はアスペルギルス種である。一態様では、このプロテアーゼ変異体は、バチルス種 (*Bacillus* sp.) 宿主細胞により生産される。本発明のプロテアーゼ変異体の生産に使用が見出されるバチルス種 (*Bacillus* sp.) 宿主細胞の例としては、バチルス・リケニホルミス (*B. licheniformis*)、バチルス・レントス (*B. lentus*)、枯草菌 (*B. subtilis*)、バチルス・アミロリケファシエンス (*B. amyloliquefaciens*)、バチルス・レントス (*B. lentus*)、バチルス・ブレビス (*B. brevis*)、バチルス・ステアロサーモフィラス (*B. stearothermophilus*)、バチルス・アルカロフィラス (*B. alkalophilus*)、バチルス・コアグランス (*B. coagulans*)、バチルス・サーキュランス (*B. circulans*)、バチルス・プミリス (*B. pumilis*)、バチルス・チューリングエンシス (*B. thuringiensis*)、バチルス・クラウジイ (*B. clausii*) 及びバチルス・メガテリウム (*B. megaterium*) 並びにバチルス属内の他の生物が挙げられるがこれらに限定されない。一態様では、枯草菌 (*B. subtilis*) 宿主細胞内は、プロテアーゼ変異体の生産のために使用される。米国特許第 5, 264, 366号及び同第 4, 760, 025号 (再発行特許第 34, 606号) は、本発明のプロテアーゼ変異体を生産するために使用できる様々なバチルス宿主株を記載しているが、他の好適な株を使用することもできる。

#### 【0209】

本発明のプロテアーゼ変異体を生産するために使用できるいくつかの工業用細菌株としては、非組み換え (即ち、野生型) バチルス種株、並びに、自然に生じる株の変異体及び/又は組み換え株が挙げられる。一態様では、宿主株は組み換え株であり、ここで、所望のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは宿主に導入される。一態様では、宿主株は、枯草菌 (*B. subtilis*) 宿主株であり、特に組み換え枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 宿主株である。例えば、1A6 (ATCC 39085)、168 (1A01)、SB19、W23、Ts85、B637、PB1753~PB1758、PB3360、JH642、1A243 (ATCC 39,087)、ATCC 21332、ATCC 6051、MI113、DE100 (ATCC 39,094)、GX4931、PBT 110 及びPEP 211株が挙げられるがこれらに限定されない数多くの枯草菌 (*B. subtilis*) 株が既知である (例えば、Hoch et al., *Genetics* 73: 215~228 (1973) を参照されたい) (米国特許第 4, 450, 235号及び同第

10

20

30

40

50

4, 302, 544号、並びに欧州特許第0134048号(これらはそれぞれその全体が参照により組み込まれる)も参照されたい)。発現宿主細胞としての枯草菌(*B. subtilis*)の使用は当該技術分野において周知である(例えば、Palva et al., Gene 19: 81~87(1982); Fahnestock and Fischer, J. Bacteriol. 165: 796~804(1986); 及びWang et al., Gene 69: 39~47(1988)を参照されたい)。

#### 【0210】

一態様では、バチルス宿主細胞は、次の遺伝子degU、degS、degR及びdegQのうち少なくとも1つにおいて変異又は欠失を含むバチルス種である。この変異はdegU遺伝子の中にあってもよく、場合によってはこの変異はdegU(Hy)32であつてもよい。例えば、Msadek et al., J. Bacteriol. 172: 824~834(1990)及びOlmos et al., Mol. Gen. Genet. 253: 562~567(1997)を参照されたい。典型的な宿主株は、degU32(Hy)変異を保有する枯草菌(*Bacillus subtilis*)である。このバチルス宿主は、scoC4(例えば、Caldwell et al., J. Bacteriol. 183: 7329~7340(2001)を参照されたい); spoIIE(例えば、Arigoni et al., Mol. Microbiol. 31: 1407~1415(1999)を参照されたい); 及び/又はoppAあるいはoppオペロンの他の遺伝子(例えば、Perego et al., Mol. Microbiol. 5: 173~185(1991)を参照されたい)におけるアミノ酸変異(例えば、置換)又は欠失を含み得る。実際、oppA遺伝子における変異と同じ表現型を生じるoppオペロンにおける任意の変異は、本発明の改変されたバチルス株の一態様において使用を見出される。このような変異は単独で生じてもよく、又は、変異の組み合わせが存在してもよい。一態様では、本発明のプロテアーゼ変異体を生産するために使用できる改変されたバチルス宿主細胞株は、上記遺伝子の1つ以上における変異を既に含むバチルス宿主株である。加えて、内因性プロテアーゼ遺伝子の変異及び/又は欠失を含むバチルス種宿主細胞は使用を見出される。バチルス宿主細胞は、aprE及びnprE遺伝子の欠失を含み得る。バチルス種宿主細胞は5プロテアーゼ遺伝子の欠失を含んでもよく、バチルス種宿主細胞は9プロテアーゼ遺伝子の欠失を含んでもよい(例えば、米国特許出願公開第2005/0202535号を参照されたい)。

#### 【0211】

宿主細胞は、当該技術分野において既知の任意の好適な方法を使用して、本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体をコードする少なくとも1つの核酸で形質転換される。核酸がベクターの中に組み込まれるか又はプラスミドDNAを存在させずに使用されるかのいずれにする、核酸は典型的には微生物の中に、一態様では好ましくは大腸菌細胞又はコンピテントなバチルス細胞の中に、導入される。プラスミドDNAコンストラクト又はベクターを利用してバチルス細胞又は大腸菌細胞の中に核酸(例えば、DNA)を導入し、このような細胞をこのようなプラスミドDNAコンストラクト又はベクターにより形質転換させるための方法は、周知である。一態様では、これらのプラスミドは、その後、大腸菌細胞から単離され、バチルス細胞に形質転換される。しかしながら、大腸菌などの介在微生物を使用することは本質的ではなく、一態様では、DNAコンストラクト又はベクターはバチルス宿主の中に直接導入される。

#### 【0212】

当業者は、バチルス細胞の中に本発明の核酸又はポリヌクレオチド配列を導入するのに好適な方法を十分に承知している(例えば、Ferrari et al., 「Genetics,」 in Harwood et al. (ed.), *Bacillus*, Plenum Publishing Corp. (1989), pp. 57~72; Saunders et al., J. Bacteriol. 157: 718~726(1984); Hoch et al., J. Bacteriol. 93: 1925~1937(1967); Mann et al., *Current Microbiol.* 13: 1

10

20

30

40

50

31~135(1986);及びHolubova, Folia Microbiol. 30:97(1985);Chang et al., Mol. Gen. Genet. 168:11~115(1979);Vorobjeva et al., FEMS Microbiol. Lett. 7:261~263(1980);Smith et al., Appl. Env. Microbiol. 51:634(1986);Fisher et al., Arch. Microbiol. 139:213~217(1981);及びMcDonald, J. Gen. Microbiol. 130:203(1984)を参照されたい)。実際、プロトプラスト形質転換などの形質転換、会合、形質導入及びプロトプラスト融合のような方法は、周知であり、本発明での使用に適している。形質転換の方法は、本発明のプロテアーゼ変異体をコードする核酸を含むDNAコンストラクト又はベクターを宿主細胞の中に導入するために使用される。バチルス細胞を形質転換するための当該技術分野において既知の方法としては、部分的に相同性の常在性プラスミドを保有するコンピテント細胞によりドナープラスミドを取り込むことを伴うプラスミドマーカースキュー形質転換のような方法が挙げられる(Contente et al., Plasmid 2:555~571(1979);Haima et al., Mol. Gen. Genet. 223:185~191(1990);Weinrauch et al., J. Bacteriol. 154:1077~1087(1983);及びWeinrauch et al., J. Bacteriol. 169:1205~1211(1987))。この方法では、組み込みドナープラスミドは、染色体性形質転換を模倣するプロセスにおいて常在「ヘルパー」プラスミドの相同領域と組み換えを行う。

10

## 【0213】

一般に使用される方法に加えて、一態様では、宿主細胞は、本発明のプロテアーゼ変異体をコードする核酸を含むDNAコンストラクト又はベクターで直接形質転換される(すなわち、中間体細胞は、宿主細胞の中への導入に先立ってDNAコンストラクト又はベクターを増幅するために又は他のプロセスのために使用されない)。本発明のDNAコンストラクト又はベクターを宿主細胞に導入することは、プラスミド又はベクターに挿入せずに核酸配列(例えば、DNA配列)を宿主細胞の中に導入するための当該技術分野で既知の物理的及び化学的方法を含む。このような方法としては、塩化カルシウム沈殿、電気穿孔法、ネイキッドDNA、リボソーム及びこれらに類するものが挙げられるがこれらに限定されない。追加の態様では、DNAコンストラクト又はベクターは、プラスミドに挿入されず、プラスミドと同時形質転換される。更なる態様では、選択マーカは、当該技術分野において既知の方法により改変されたバチルス株から除去される(Stahl et al., J. Bacteriol. 158:411~418(1984);及びPalmeros et al., Gene 247:255~264(2000)を参照されたい)。

20

30

## 【0214】

一態様では、本発明の形質転換された細胞は、従来の栄養培地で培養される。温度、pH及びこれらに類するものなどの好適な特定の培養条件は、当業者に既知である。加えて、一部の培養条件は、Hopwood(2000) Practical Streptomyces Genetics, John Innes Foundation, Norwich UK;Hardwood et al., (1990) Molecular Biological Methods for Bacillus, John Wileyなどの科学文献及びAmerican Type Culture Collection(ATCC)からの科学文献に見出され得る。一態様では、本発明は、本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体又は本発明の少なくとも1つの核酸を含む培養物(例えば、細胞培養物)を提供する。本発明の少なくとも1つの核酸、ベクター又はDNAコンストラクトを含む組成物も提供される。

40

## 【0215】

本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチド配列で形質転換された宿主細胞は、親プロテアーゼの発現を許容する条件下で好

50

適な栄養培地内で培養され得、その後、得られたプロテアーゼは培養物から回収される。これらの細胞を培養するために使用される培地は、適切なサプリメントを含有する最少培地又は複合培地などの宿主細胞の増殖に好適な任意の従来の培地を含む。好適な培地は、商業的供給業者から入手可能であり、あるいは、公表されている処方（例えば、American Type Culture Collectionのカatalog）に従って調製してもよい。細胞により生産されたプロテアーゼは、例えば、遠心分離又は濾過による培地からの宿主細胞の分離、塩析（例えば、硫酸アンモニウム）手法による上清又は濾液のタンパク質性成分の沈殿、クロマトグラフィー精製（例えば、イオン交換、ゲル濾過、親和性など）が挙げられるがこれらに限定されない従来手順により培養培地から回収され得る。本発明のプロテアーゼ変異体を回収又は精製するのに好適な任意の方法を使用すること

10

## 【0216】

一態様では、組み換え宿主細胞により生産されるプロテアーゼ変異体は、培養培地中に分泌される。精製を容易にするドメインをコードする核酸配列は、可溶性タンパク質の精製を容易にするために使用され得る。プロテアーゼ変異体をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクター又はDNAコンストラクトは、プロテアーゼ変異体の生産を容易にするために精製を容易にするドメインをコードする核酸配列を更に含んでもよい（例えば、Kroll, D. J. et al., DNA Cell Biol. 12: 441~53 (1993)を参照されたい）。このような精製を容易にするドメインとしては、例えば、固定化金属上での精製を可能にするヒスチジン-トリプトファンモジュールなどの金属キレート化ペプチド（Porath J., Protein Expr. Purif. 3: 263~281 (1992)）、固定化免疫グロブリン上での精製を可能にするプロテインAドメイン、及びFLAGS伸長/親和性精製システムにおいて利用されるドメイン（ImmuneX Corp. (Seattle, WA)）が挙げられるがこれらに限定されない。精製ドメイン非相同タンパク質との間にFactor XA又はエンテロキナーゼ（Invitrogen (San Diego, CA)）などの切断可能なリンカー配列を含ませることも、精製を容易にするために使用を見出される。

20

## 【0217】

本発明のプロテアーゼ変異体などの酵素の酵素活性を検出及び測定するためのアッセイは、周知である。例えば、本発明のプロテアーゼ変異体などのプロテアーゼの活性を検出及び測定するための様々なアッセイも、当業者に既知である。特に、280nmでの吸光度として又はフォーリン法を用いて比色的に測定される、カゼイン又はヘモグロビンからの酸に可溶性ペプチドの放出に基づくアッセイは、プロテアーゼ活性を測定するために利用可能である（例えば、Bergmeyer et al., 「Methods of Enzymatic Analysis」 Vol. 5, Peptidases, Proteinases and their Inhibitors, Verlag Chemie, Weinheim (1984)を参照されたい）。他の代表的アッセイは、発色基質の可溶化を伴う（例えば、Ward, 「Proteinases」, in Fogarty (ed.) Microbial Enzymes and Biotechnology, Applied Science, London, (1983), pp. 251~317を参照されたい）。他の代表的アッセイとしては、スクシニル-Ala-Ala-Pro-Phe-パラニトロアニリドアッセイ(SAAPfNA)及び2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム塩アッセイ(TNBSアッセイ)が挙げられるがこれらに限定されない。当業者に既知の数多くの追加の参照文献は、好適な方法を提供する（例えば、Wells et al., Nucleic Acids Res. 11: 7911~7925 (1983); Christianson et al., Anal. Biochem. 223: 119~129 (1994); 及びHsia et al., Anal. Biochem. 242: 221~227 (1999)を参照されたい）。

30

40

## 【0218】

50



様々な方法が、宿主細胞内の成熟型プロテアーゼ（例えば、本発明の成熟型プロテアーゼ変異体）の生産レベルを測定するために使用することができる。このような方法としては、例えば、プロテアーゼに特異的なポリクローナル又はモノクローナル抗体を利用する方法が挙げられるがこれに限定されない。代表的な方法としては、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、放射免疫アッセイ（RIA）、蛍光免疫アッセイ（FIA）及び蛍光活性化細胞選別法（FACS）が挙げられるがこれらに限定されない。これら及び他のアッセイは、当該技術分野において周知である（例えば、Maddox et al., J. Exp. Med. 158:1211 (1983)を参照されたい）。

#### 【0219】

別の態様では、本発明は、本発明の成熟型プロテアーゼ変異体を製造又は生産するための方法を提供する。成熟型プロテアーゼ変異体は、シグナルペプチドもプロペプチド配列も含まない。一部のこのような方法は、例えば、枯草菌（*Bacillus subtilis*）細胞などの例えば、バチルス種細胞のような組み換え細菌宿主細胞において本発明のプロテアーゼ変異体を作製又は製造することを含む。一態様では、本発明は、本発明のプロテアーゼ変異体の製造方法を提供し、この方法は、プロテアーゼ変異体の生産を促進する条件下で本発明のプロテアーゼ変異体をコードする核酸を含む組み換え発現ベクターを含む組み換え宿主細胞を培養することを含む。一部のこのような方法は、培養物からプロテアーゼ変異体を回収することを更に含む。

#### 【0220】

一態様では、本発明は、本発明のプロテアーゼ変異体の生産方法を提供し、この方法は、（a）本発明のプロテアーゼ変異体をコードする核酸を含む組み換え発現ベクターを細胞（例えば、枯草菌（*Bacillus subtilis*）などの細菌細胞）集団に導入すること、及び（b）発現ベクターによりコードされるプロテアーゼ変異体の生産を促進する条件下で培養培地において細胞を培養すること、を含む。一部のこのような方法は、（c）細胞から又は培養培地からプロテアーゼ変異体を単離すること、を更に含む。

#### 【0221】

組み換え体の生産に加え、本発明のプロテアーゼ変異体ポリペプチドは、固相技術を用いる直接ペプチド合成により製造してもよい（例えば、Stewart et al. (1969) *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W. H. Freeman Co, San Francisco; Merrifield (1963) *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149~2154を参照されたい）。ペプチド合成は、手動又は自動技術を用いて行われ得る。自動合成は、例えば、製造者により提供される指示に従ってApplied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer (Foster City, Calif.))を使用して達成され得る。例えば、サブ配列は、別個に化学合成され、化学的方法を用いて連結されて、プロテアーゼ変異体又はその機能性断片をもたらしてもよい。別の方法としては、このような変異体ポリペプチド配列は、ポリペプチドの製造に特化している任意の数の企業に発注してもよい。最も一般的には、本発明のポリペプチドは、例えば、上記及び実施例に記載のように、コードしている核酸を発現させ、ポリペプチドを回収することにより製造される。

#### 【0222】

別の態様では、本発明は、プロテアーゼ変異体の生産方法を提供し、この方法は、変異体の生産を促進する条件下で本発明の組み換え宿主細胞を培養することを含み、上記宿主細胞は、本発明の少なくとも1つの核酸を含む発現ベクターを含む。この方法は、培養物から変異体を回収することを更に含んでもよい。

#### 【0223】

別の態様では、本発明は、プロテアーゼ変異体の製造方法を含み、この方法は、（a）本発明の組み換え発現ベクターを細胞集団に導入すること、及び（b）発現ベクターによりコードされるスプチリシン変異体の生産を促進する条件下で培養培地において細胞を培養すること、を含む。この方法は、（c）細胞から又は培養培地から変異体を単離するこ

10

20

30

40

50

と、を更に含む。

【0224】

別の態様では、本発明は、セリンプロテアーゼ変異体をコードする核酸を含む発現ベクターで宿主細胞を形質転換すること、及び、セリンプロテアーゼ変異体の生産に好適な条件下で形質転換した宿主細胞を培養すること、を含む、バチルスセリンプロテアーゼのセリンプロテアーゼ変異体の製造方法を提供する。一態様では、この方法は、生産されたセリンプロテアーゼ変異体を回収する工程を更に含む。一態様では宿主細胞はバチルス細胞であり、これらの態様の部分集合ではバチルス細胞は枯草菌 (*B. subtilis*) 細胞である。更に、本発明は、布地を含む表面及び/又は物品をセリンプロテアーゼ変異体を含むクリーニング組成物と接触させる工程を含む、クリーニング方法を提供する。一部の代替的方法では、本発明は、食卓食器を含む表面及び/又は物品をセリンプロテアーゼ変異体を含むクリーニング組成物と接触させる工程を含む、クリーニング方法を提供する。

10

【0225】

別の態様では、本発明は、野生型スブチリシンプロテアーゼを同定するための方法を提供し、上記スブチリシンプロテアーゼは、次のアミノ酸：アミノ酸位置24におけるグリシン若しくはアルギニン、アミノ酸位置53におけるグリシン、アミノ酸位置78におけるアスパラギン、アミノ酸位置97におけるアラニン、アミノ酸位置101におけるアスパラギン、アミノ酸位置128におけるアラニン若しくはセリン、及び/又はアミノ酸位置217におけるロイシン若しくはグルタミン、を含むアミノ酸配列を含み、ここで、上記アミノ酸位置は、配列番号2に記載BPN'のアミノ酸配列におけるアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされ、上記方法は、a) 少なくとも1つの野生型スブチリシンプロテアーゼ若しくは野生型スブチリシンプロテアーゼのライブラリを含むサンプルを供給すること又は野生型スブチリシンプロテアーゼをコードする1つ以上のDNA配列を含むDNAサンプルを提供すること、及びb) 野生型プロテアーゼをコードする野生型スブチリシンプロテアーゼ又はDNA配列を同定すること、を含む。

20

【0226】

第十二態様では、本発明は、本発明の第十又は第十一態様の核酸を少なくとも1つ含む発現ベクターを提供する。本発明の第十二態様による発現ベクターは、プロモーターに作用可能に連結され得る。このような発現ベクターは、単離又は精製された形態である。

【0227】

第十三態様では、本発明は、(a) 本発明の第十若しくは第十一態様の核酸、又は、本発明の第十二態様の発現ベクター、を含む、組み換え宿主細胞を提供する。本発明の第十三態様の組み換え宿主細胞は細菌細胞であってもよく、選択的にバチルス細胞であってもよい。本発明の第十三態様の組み換え宿主細胞は、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 細胞であってもよい。

30

【0228】

第十四態様では、本発明は、(a) 本発明の第十若しくは第十一態様の核酸、又は、本発明の第十二態様の発現ベクター、を含む、細胞培養物を提供する。

【0229】

第十五態様では、本発明は、プロテアーゼ変異体の製造方法を提供し、この方法は、変異体の生産を促進する条件下で本発明の第十三態様の組み換え宿主細胞を培養することを含む。本発明の第十五態様による方法は、培養物から変異体を単離又は回収することを更に含んでもよい。

40

【0230】

第十六態様では、本発明は、プロテアーゼ変異体の製造方法を提供し、この方法は、(a) 本発明の第十二態様の組み換え発現ベクターを細胞集団に導入すること、及び(b) 発現ベクターによりコードされるプロテアーゼ変異体の生産を促進する条件下で培養培地において細胞を培養すること、を含む。本発明の第十六態様による方法は、(c) 細胞から又は培養培地から変異体を単離又は回収すること、を更に含んでもよい。

【0231】

50

### 本発明の組成物

本発明は、本発明の少なくとも1つのポリペプチド（例えば、少なくとも1つのプロテアーゼ変異体）を含む組成物を含む。本発明のポリペプチドは、パートI実施例及びパートII実施例を含む下記及び上記に説明されている。このような組成物は、少なくとも1つの賦形剤、担体、添加剤成分、又は他の置換基、構成成分又は物質を含んでもよい。

#### 【0232】

例えば、一態様では、本発明は、少なくとも1つのプロテアーゼ変異体と少なくとも1つの賦形剤、担体、添加剤成分又は他の置換基、構成成分又は物質とを含む組成物を含む。このような少なくとも1つのプロテアーゼ変異体は、パートI実施例において挙げられるがこれらに限定されない本明細書に記載のもののうちのいずれか1つであってもよい。このような少なくとも1つのプロテアーゼ変異体は、BPN'プロテアーゼ変異体であってもよい。例えば、本発明の組成物は、BPN' - v36（配列番号6）若しくはBPN' - v3（配列番号4）などのBPN'プロテアーゼ変異体、又は、本明細書若しくはパートI実施例2～23に記載の任意のプロテアーゼ変異体であってもよい。このような組成物は布地ケア製品及びホームケア製品であってもよく、又は、布地ケア組成物及びホームケア組成物であってもよい。別の方法としては、このような組成物は布地ケア製品及びホームケア製品であってもよく、又は、布地ケア組成物及びホームケア組成物であってもよい。

10

#### 【0233】

このような組成物は、（BPN'プロテアーゼ変異体に加えて）少なくとも1つのパートII実施例に記載のシリーズI GG36プロテアーゼ変異体などの少なくとも1つのGG36プロテアーゼ変異体を更に含んでもよい。このような組成物は、本明細書の他箇所に記載のような様々な用途に有用である。

20

#### 【0234】

第十七態様では、本発明は、本発明の第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八又は第九態様の変異体（又は第三態様にあるようなポリペプチド）を含む組成物を提供する。本発明の第十七態様による組成物は、本明細書の他箇所により詳細に記載されているように添加剤成分又は担体を含んでもよい。本発明の第十七態様による組成物は、少なくとも1つのビルダ - 及び / 又は少なくとも1つの界面活性剤を含んでもよい。本発明の第十七態様による組成物は、リン酸塩を含んでもよく、又は、リン酸塩を含まなくてもよい。

30

#### 【0235】

本発明の第十七態様による組成物は、クリーニング組成物又は洗剤組成物であり得る。本発明の第十七態様による組成物は、布地ケア製品又はホームケア製品であり得る。本発明の第十七態様による組成物は、布地ケア製品又はホームケア製品でなくてもよい。本発明の第十七態様による組成物は、布地ケア製品又はホームケア製品である、クリーニング組成物又は洗剤組成物であり得る。本発明の第十七態様による組成物は、布地ケア製品又はホームケア製品ではない、クリーニング組成物又は洗剤組成物であり得る。

#### 【0236】

本発明の第十七態様による組成物は、1、2、3、4、5又はそれ以上の追加の酵素を更に含んでもよい。このような追加の酵素は、ヘミセルラーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、ペルオキシダーゼ、プロテアーゼ、キシラナーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、エステラーゼ、クチナーゼ、ペクチナーゼ、ペクチン酸リアーゼ、マンナーゼ、ケラチナーゼ、レダクターゼ、オキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、リポキシゲナーゼ、リグニナーゼ、プルラナーゼ、タンナーゼ、ペントサナーゼ、マラナーゼ、 - グルカナーゼ、アラビノシターゼ、ヒアルロニダーゼ、コンドロイチナーゼ及びラッカーゼからなる群から選択される追加の酵素からなる群から選択され得る。

40

#### 【0237】

本発明の第十七態様による追加の酵素は、例えば、シリーズI GG36プロテアーゼ変異体などの、タンパク質分解活性を有するGG36プロテアーゼ変異体であってもよく

50

、このシリーズI GG36プロテアーゼ変異体は、配列番号755のサブチリシンバチルス・レントス (*Bacillus lentus*) GG36に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の配列同一性を有するアミノ酸配列と、A1R, Q2S, V4R, V4S, S9A, R10S, P14K, A16S, H17R, N18R, G20R, T22A, T22R, S24R, S24W, G25R, G25V, V26F, L42I, N43R, N43A, G46R, P52F, P52E, P52N, T57R, Q59A, N62E, N62Q, V68A, V68C, T71G, I72C, A74C, L75A, L75F, L75R, N76D, S78R, L82R, P86W, E89P, E89T, E89G, E89H, E89I, E89V, E89W, Y91N, K94N, G100S, S101A, S101N, S101G, S101D, S103G, S103N, V104L, V104I, S106V, S106G, A108I, L111V, E112V, G115K, G115R, N117F, G118I, V121F, S128D, S128F, S128L, S128N, P129E, S144R, L148I, A158E, G159E, S160D, S166D, N185E, N185I, R186H, S188E, S188D, D197F, V203E, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, P210R, S212I, S212F, Y214F, A215N, A215D, A215E, L217E, L217N, T224A, A230E, A231I, Q236F, N238R, N238K, P239K, P239G, P239R, P239S, W241R, S242R, S242L, N243R, V244R, N248I, N248V, H249R, L250I, N252R, T253R, L262D, Y263F, S265F, L267V, L267N, N269I, N269R, E271F, E271I, E271H, E271P, E271T, E271V, E271L, 及びA272F, からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換と、を含み得、ここで、変異体の各アミノ酸位置は、配列番号2に記載のバチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) スブチリシンBPN'プロテアーゼのアミノ酸配列におけるアミノ酸位置に対応させることにより番号付けされる。追加の酵素(例えば、本明細書に記載されるようなシリーズI G36プロテアーゼ変異体のようなプロテアーゼなど)を含む本発明の第十七態様による組成物は、布地ケア製品及びホームケア製品であってもよい。別の方法としては、このような組成物は、布地ケア製品及びホームケア製品でなくてもよい。

#### 【0238】

本発明の第十七態様による組成物は、配列番号755のサブチリシンバチルス・レントス (*Bacillus lentus*) GG36に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有するアミノ酸配列と、T022R - S024R, S009A - E271L, N018R - W241R, N018R - G115R, N043R - H249R, G020R - H249R, V004R - H249R, G020R - S024R, N018R - H249R, S009A - G020R, G020R - W241R, S009A - S078R, G020R - G115R, N018R - S024R, S024R - S242R, T022R - G115R, N018R - N043R, G020R - N043R, N018R - S242R, S242R - N269R, N018R - V244R, S024R - N269R, G020R - E271L, S024R - E271L, V004R - S009A, G020R - N269R, A001R - S024R, V244R - E271L, S009A - N018R, W241R - E271L, V004R - S024R, S009A - H249R, S009A - T022R, N062E - P129E, N062E - G159E, A016S - L148I, A158E - H249R, A016S - N062E, L111V - S188D, T022A - N062E, N062E - L148I, T022A - P129E, N062E - E271F, N062E - A158E, A016S - G159E, N062E - R186H, S128N - G159E, N062E - S188D, N062E -

S 1 2 8 N , L 1 4 8 I - G 1 5 9 E , S 1 0 3 G - A 1 5 8 E , L 1 1 1 V - G 1 5 9  
E , A 1 5 8 E - E 2 7 1 F , A 0 1 6 S - S 1 8 8 D , T 0 2 2 A - L 1 1 1 V , S 1  
2 8 N - A 1 5 8 E , A 0 1 6 S - A 1 5 8 E , V 1 0 4 L - A 1 5 8 E , S 1 2 8 N -  
R 1 8 6 H , G 1 5 9 E - Y 2 0 9 E , N 0 6 2 E - S 1 0 1 A , L 1 1 1 V - Y 2 0 9  
E , L 1 4 8 I - S 1 8 8 D , S 1 0 1 A - Y 2 0 9 E , T 0 2 2 A - S 1 8 8 D , A 0  
1 6 S - T 0 2 2 A , S 1 2 8 N - P 1 2 9 E , A 0 1 6 S - Y 2 0 9 E , A 0 1 6 S -  
S 1 2 8 N , T 0 2 2 A - E 0 8 9 P , S 1 2 8 N - Y 2 0 9 E , E 0 8 9 P - A 1 5 8  
E , N 0 6 2 E - S 1 0 3 G , R 1 8 6 H - E 2 7 1 F , A 0 1 6 S - P 1 2 9 E , E 0  
8 9 P - G 1 5 9 E , L 1 1 1 V - H 2 4 9 R , S 1 0 1 A - P 1 2 9 E , L 1 4 8 I -  
Y 2 0 9 E , T 0 2 2 A - G 1 5 9 E , P 1 2 9 E - H 2 4 9 R , P 1 2 9 E - Y 2 0 9  
E , V 1 0 4 L - P 1 2 9 E , S 1 2 8 N - S 1 8 8 D , L 1 1 1 V - A 1 5 8 E , T 0  
2 2 A - A 1 5 8 E , N 0 6 2 E - Y 2 0 9 E , N 0 6 2 E - H 2 4 9 R , S 1 0 1 A -  
R 1 8 6 H , E 0 8 9 P - P 1 2 9 E , P 1 2 9 E - E 2 7 1 F , T 2 2 A - L 1 1 1 V -  
G 1 5 9 E , S 1 0 1 A - S 1 0 3 G - V 1 0 4 L - Y 2 0 9 E , S 1 0 1 A - S 1 0 3  
G - V 1 0 4 L - G 1 5 9 E , S 1 0 1 A - S 1 0 3 G - V 1 0 4 L - S 1 8 8 D , S 1  
0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I - G 1 5 9 D , T 2 2 A - S 1 0 3 G - G 1 5 9 E , T  
2 2 A - S 1 2 8 N - E 2 7 1 F - Y 2 0 9 E , T 2 2 A - Y 2 0 9 E - E 2 7 1 F , T  
2 2 A - S 1 0 1 A - Y 2 0 9 E , S 1 0 1 A - Y 2 0 9 E - E 2 7 1 F , T 2 2 A - L  
1 1 1 V - S 1 2 8 N , T 2 2 A - S 1 0 1 A - G 1 5 9 E , S 1 0 1 A - S 1 0 3 G -  
V 1 0 4 L , T 2 2 A - S 1 0 1 A - S 1 0 3 G - V 1 0 4 L , S 1 0 1 A - S 1 0 3 G  
- V 1 0 4 L , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I , S 1 0 1 A - S 1 0 3 G - V 1 0  
4 L - S 1 2 8 N , S 1 0 3 A - V 1 0 4 I - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 3 6 H - Q  
2 4 5 R - N 2 4 8 D - N 2 5 2 K , S 1 0 1 G - V 1 0 4 I - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V  
- Q 2 3 6 H - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - N 2 5 2 K , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - G 1 5  
9 D - A 2 3 2 V - Q 2 3 6 H - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - N 2 5 2 K , S 1 0 1 G - S  
1 0 3 A - V 1 0 4 L - A 2 3 2 V - Q 2 3 6 H - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - N 2 5 2 K  
 , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 L - G 1 5 9 D - Q 2 3 6 H - Q 2 4 5 R - N 2 4  
8 D - N 2 5 2 K , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 L - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q  
2 4 5 R - N 2 4 8 D - N 2 5 2 K , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 L - G 1 5 9 D  
- A 2 3 2 V - Q 2 3 6 H - N 2 4 8 D - N 2 5 2 K , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0  
4 L - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 3 6 H - Q 2 4 5 R - N 2 5 2 K , S 1 0 1 G - S  
1 0 3 A - V 1 0 4 L - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 3 6 H - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D  
 , N 6 2 E - S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 4 5  
R - N 2 4 8 D - E 2 7 1 F , N 6 2 E - S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I - G 1 5  
9 D - A 2 3 2 V - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - H 2 4 9 R , T 2 2 A - S 1 0 1 G - S 1  
0 3 A - V 1 0 4 I - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - H 2 4 9 R ,  
S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 4 5 R - N 2 4 8  
D - S 2 4 R , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 4  
5 R - N 2 4 8 D - T 2 5 3 R , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I - A 1 5 8 E - A  
2 3 2 V - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - H 2 4 9 R , T 2 2 A - S 1 0 1 G - S 1 0 3 A -  
V 1 0 4 I - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - E 2 7 1 F , S 1 0 1  
G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I - G 1 5 9 E - A 2 3 2 V - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - H 2  
4 9 R , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 4 5 R -  
N 2 4 8 D - N 2 3 8 R , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I - A 1 5 8 E - A 2 3 2  
V - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - E 2 7 1 F , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I - G 1  
5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I -  
G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - E 2 7 1 F , S 1 0 1 G - S 1 0 3  
A - V 1 0 4 I - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - N 7 6 D , 及び S  
1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I - G 1 5 9 E - A 2 3 2 V - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D  
- E 2 7 1 F , からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換と、を含むシリ

10

20

30

40

50

ーズI GG36プロテアーゼ変異体を含み得、ここで、変異体の各アミノ酸位置は、配列番号2に記載のパチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) スブチリシンBPN'プロテアーゼのアミノ酸配列におけるアミノ酸位置に対応させることにより番号付けされる。このような組成物は布地ケア製品及びホームケア製品であってもよく、又は、布地ケア組成物及びホームケア組成物であってもよい。別の態様では、このような組成物は、布地ケア製品及びホームケア製品又は布地ケア組成物及びホームケア組成物でなくてもよい。

【0239】

本発明の第十七態様による組成物は、配列番号755のスブチリシンパチルス・レントス (*Bacillus lentus*) GG36に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、A1R, Q2S, V4R, V4S, S9A, R10S, P14K, A16S, H17R, N18R, G20R, T22A, T22R, S24R, S24W, G25R, G25V, V26F, L42I, N43R, N43A, G46R, P52F, P52E, P52N, T57R, Q59A, N62E, N62Q, V68A, V68C, T71G, I72C, A74C、L75A, L75F, L75R, N76D, S78R, L82R, P86W, E89P, E89T, E89G, E89H, E89I, E89V, E89W, Y91N, K94N, G100S, S101A, S101N, S101G, S101D, S103G, S103N, V104L, V104I, S106V, S106G, A108I, L111V, E112V, G115K, G115R, N117F, G118I, V121F, S128D, S128F, S128L, S128N, P129E, S144R, L148I, A158E、G159E, S160D, S166D, N185E, N185I, R186H, S188E, S188D, D197F, V203E, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, P210R, S212I, S212F, Y214F, A215N, A215D, A215E, L217E, L217N, T224A, A230E, A231I, Q236F, N238R, N238K, P239K, P239G, P239R, P239S, W241R, S242R, S242L, N243R, V244R, N248I, N248V, H249R, L250I, N252R, T253R, L262D, Y263F, S265F, L267V, L267N, N269I, N269R, E271F, E271I, E271H, E271P, E271T, E271V, E271L, 及びA272Fからなる群から選択される3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は更には25個のアミノ酸置換、選択的にS103A, G159D, Q236H, Q245R, N248D, 及びN252K, からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換、を含む、シリーズI

GG36プロテアーゼ変異体を含み得、ここで、変異体の各アミノ酸位置は、配列番号2に記載のパチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) スブチリシンBPN'プロテアーゼのアミノ酸配列におけるアミノ酸位置に対応させることにより番号付けされる。このような組成物は布地ケア製品及びホームケア製品であってもよく、又は、布地ケア組成物及びホームケア組成物であってもよい。別の態様では、このような組成物は、布地ケア製品及びホームケア製品又は布地ケア組成物及びホームケア組成物でなくてもよい。

【0240】

本発明の第十七態様による組成物は、配列番号755のスブチリシンパチルス・レントス (*Bacillus lentus*) GG36に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の配列同一性を有するアミノ酸、並びに(a) A1R, Q2S, V4R, V4S, S9A, R10S, P14K, A16S, T22A, T22R, S24R, G25V, V26F, L42I, P52F, P52E, P52N, N62E, N62Q, V68A, V68C, T71G, I72C, A74C、L75A, L75F, S78R, E89P, E89T, E89

10

20

30

40

50

G, E 8 9 H, E 8 9 W, Y 9 1 N, K 9 4 N, G 1 0 0 S, S 1 0 1 A, S 1 0 1 N,  
 S 1 0 1 G, S 1 0 1 D, S 1 0 3 G, S 1 0 3 N, V 1 0 4 L, V 1 0 4 I, A 1 0 8  
 I, L 1 1 1 V, E 1 1 2 V, G 1 1 5 K, N 1 1 7 F, V 1 2 1 F, S 1 2 8 D, S 1  
 2 8 F, S 1 2 8 L, S 1 2 8 N, P 1 2 9 E, L 1 4 8 I, A 1 5 8 E、G 1 5 9 E,  
 S 1 6 0 D, S 1 6 6 D, N 1 8 5 E, R 1 8 6 H, S 1 8 8 E, S 1 8 8 D, V 2 0 3  
 E, Y 2 0 9 S, Y 2 0 9 N, Y 2 0 9 F, Y 2 0 9 T, Y 2 0 9 E, Y 2 0 9 H, Y 2  
 0 9 G, P 2 1 0 R, S 2 1 2 I, S 2 1 2 F, Y 2 1 4 F, A 2 1 5 N, A 2 1 5 D,  
 A 2 1 5 E, L 2 1 7 E, L 2 1 7 N, T 2 2 4 A, A 2 3 0 E, A 2 3 1 I, Q 2 3 6  
 F, N 2 3 8 R, N 2 3 8 K, P 2 3 9 K, P 2 3 9 G, P 2 3 9 R, N 2 4 8 V, H 2  
 4 9 R, L 2 5 0 I, L 2 6 2 D, Y 2 6 3 F, S 2 6 5 F, L 2 6 7 V, L 2 6 7 N、 10  
 N 2 6 9 I, N 2 6 9 R, E 2 7 1 F, E 2 7 1 I, E 2 7 1 H及びA 2 7 2 F, からな  
 る群から選択される2つ以上の置換、並びに/又は(b) N 0 6 2 E - P 1 2 9 E, N 0  
 6 2 E - G 1 5 9 E, A 0 1 6 S - L 1 4 8 I, A 1 5 8 E - H 2 4 9 R, A 0 1 6 S -  
 N 0 6 2 E, L 1 1 1 V - S 1 8 8 D, T 0 2 2 A - N 0 6 2 E, N 0 6 2 E - L 1 4 8  
 I, T 0 2 2 A - P 1 2 9 E, N 0 6 2 E - E 2 7 1 F, N 0 6 2 E - A 1 5 8 E, A 0  
 1 6 S - G 1 5 9 E, N 0 6 2 E - R 1 8 6 H, S 1 2 8 N - G 1 5 9 E, N 0 6 2 E -  
 S 1 8 8 D, N 0 6 2 E - S 1 2 8 N, L 1 4 8 I - G 1 5 9 E, S 1 0 3 G - A 1 5 8  
 E, L 1 1 1 V - G 1 5 9 E, A 1 5 8 E - E 2 7 1 F, A 0 1 6 S - S 1 8 8 D, T 0  
 2 2 A - L 1 1 1 V, S 1 2 8 N - A 1 5 8 E, A 0 1 6 S - A 1 5 8 E, V 1 0 4 L - 20  
 A 1 5 8 E, S 1 2 8 N - R 1 8 6 H, G 1 5 9 E - Y 2 0 9 E, N 0 6 2 E - S 1 0 1  
 A, L 1 1 1 V - Y 2 0 9 E, L 1 4 8 I - S 1 8 8 D, S 1 0 1 A - Y 2 0 9 E, T 0  
 2 2 A - S 1 8 8 D, A 0 1 6 S - T 0 2 2 A, S 1 2 8 N - P 1 2 9 E, A 0 1 6 S -  
 Y 2 0 9 E, A 0 1 6 S - S 1 2 8 N, T 0 2 2 A - E 0 8 9 P, S 1 2 8 N - Y 2 0 9  
 E, E 0 8 9 P - A 1 5 8 E, N 0 6 2 E - S 1 0 3 G, R 1 8 6 H - E 2 7 1 F, A 0  
 1 6 S - P 1 2 9 E, E 0 8 9 P - G 1 5 9 E, L 1 1 1 V - H 2 4 9 R, S 1 0 1 A -  
 P 1 2 9 E, L 1 4 8 I - Y 2 0 9 E, T 0 2 2 A - G 1 5 9 E, P 1 2 9 E - H 2 4 9  
 R, P 1 2 9 E - Y 2 0 9 E, V 1 0 4 L - P 1 2 9 E, S 1 2 8 N - S 1 8 8 D, L 1  
 1 1 V - A 1 5 8 E, T 0 2 2 A - A 1 5 8 E, N 0 6 2 E - Y 2 0 9 E, N 0 6 2 E -  
 H 2 4 9 R, S 1 0 1 A - R 1 8 6 H, E 0 8 9 P - P 1 2 9 E, P 1 2 9 E - E 2 7 1  
 F, T 2 2 A - L 1 1 1 V - G 1 5 9 E, S 1 0 1 A - S 1 0 3 G - V 1 0 4 L - Y 2 0 30  
 9 E, S 1 0 1 A - S 1 0 3 G - V 1 0 4 L - G 1 5 9 E, S 1 0 1 A - S 1 0 3 G - V  
 1 0 4 L - S 1 8 8 D, S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I - G 1 5 9 D, T 2 2 A -  
 S 1 0 3 G - G 1 5 9 E, T 2 2 A - S 1 2 8 N - E 2 7 1 F - Y 2 0 9 E, T 2 2 A -  
 Y 2 0 9 E - E 2 7 1 F, T 2 2 A - S 1 0 1 A - Y 2 0 9 E, S 1 0 1 A - Y 2 0 9 E  
 - E 2 7 1 F, T 2 2 A - L 1 1 1 V - S 1 2 8 N, T 2 2 A - S 1 0 1 A - G 1 5 9 E  
 , S 1 0 1 A - S 1 0 3 G - V 1 0 4 L, T 2 2 A - S 1 0 1 A - S 1 0 3 G - V 1 0 4  
 L, S 1 0 1 A - S 1 0 3 G - V 1 0 4 L, S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I, S 1  
 0 1 A - S 1 0 3 G - V 1 0 4 L - S 1 2 8 N, S 1 0 3 A - V 1 0 4 I - G 1 5 9 D -  
 A 2 3 2 V - Q 2 3 6 H - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - N 2 5 2 K, S 1 0 1 G - V 1 0 4  
 I - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 3 6 H - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - N 2 5 2 K, S 1 40  
 0 1 G - S 1 0 3 A - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 3 6 H - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D -  
 N 2 5 2 K, S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 L - A 2 3 2 V - Q 2 3 6 H - Q 2 4 5  
 R - N 2 4 8 D - N 2 5 2 K, S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 L - G 1 5 9 D - Q 2  
 3 6 H - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - N 2 5 2 K, S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 L -  
 G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - N 2 5 2 K, S 1 0 1 G - S 1 0 3  
 A - V 1 0 4 L - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 3 6 H - N 2 4 8 D - N 2 5 2 K, S 1  
 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 L - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 3 6 H - Q 2 4 5 R -  
 N 2 5 2 K, S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 L - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 3 6  
 H - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D, N 6 2 E - S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I - G 1 5  
 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - E 2 7 1 F, N 6 2 E - S 1 0 1 G - S 1 50

03A - V104I - G159D - A232V - Q245R - N248D - H249R ,  
 T22A - S101G - S103A - V104I - G159D - A232V - Q245R  
 - N248D - H249R , S101G - S103A - V104I - G159D - A23  
 2V - Q245R - N248D - S24R , S101G - S103A - V104I - G1  
 59D - A232V - Q245R - N248D - T253R , S101G - S103A -  
 V104I - A158E - A232V - Q245R - N248D - H249R , T22A  
 - S101G - S103A - V104I - G159D - A232V - Q245R - N24  
 8D - E271F , S101G - S103A - V104I - G159E - A232V - Q  
 245R - N248D - H249R , S101G - S103A - V104I - G159D  
 - A232V - Q245R - N248D - N238R , S101G - S103A - V10  
 4I - A158E - A232V - Q245R - N248D - E271F , S101G - S  
 103A - V104I - G159D - A232V - Q245R - N248D , S101G  
 - S103A - V104I - G159D - A232V - Q245R - N248D - E27  
 1F , S101G - S103A - V104I - G159D - A232V - Q245R - N  
 248D - N76D , 及びS101G - S103A - V104I - G159E - A232  
 V - Q245R - N248D - E271F , かなる群から選択される1組以上の置換、  
 を含むシリーズI GG36プロテアーゼ変異体を含み得、ここで、変異体の各アミノ酸  
 位置は、配列番号2に記載のバチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquef*  
*aciens*) スブチリシンBPN'プロテアーゼのアミノ酸配列におけるアミノ酸位置に対応  
 させることにより番号付けされる。このような組成物は布地ケア製品及びホームケア製品  
 であってもよく、又は、布地ケア組成物及びホームケア組成物であってもよい。別の態様  
 では、このような組成物は、布地ケア製品及びホームケア製品又は布地ケア組成物及びホ  
 ームケア組成物でなくてもよい。

10

20

## 【0241】

本発明の第十七態様による組成物は、配列番号755のスブチリシンバチルス・レント  
 ス (*Bacillus lentus*) GG36に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、  
 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の配列同  
 一性を有するアミノ酸、並びに(a) V4R, H17R, N18R, G20R, T22R  
 , S24R, S24W, G25R, N43R, N43A, G46R, P52F, P52N  
 , T57R, Q59A, N62Q, T71G, L75R, N76D, S78R, L82R  
 , P86W, E89P, E89W, E89T, E89I, E89H, E89V, V104  
 L, S106V, S106G, G115R, G118I, V121F, S144R, N1  
 85I, D197F, Y209N, Y209S, L217E, A231I, P239R,  
 P239S, W241R, S242R, S242L, N243R, V244R, N248  
 I, H249R, N252R, T253R, E271T, E271V, E271L, E2  
 71H, E271F, E271P, A1R, S9A, S212F, 及びN269Rからな  
 る群から選択される2つ以上の置換、並びに/又は(b) T022R - S024R, S0  
 09A - E271L, N018R - W241R, N018R - G115R, N043R -  
 H249R, G020R - H249R, V004R - H249R, G020R - S024  
 R, N018R - H249R, S009A - G020R, G020R - W241R, S0  
 09A - S078R, G020R - G115R, N018R - S024R, S024R -  
 S242R, T022R - G115R, N018R - N043R, G020R - N043  
 R, N018R - S242R, S242R - N269R, N018R - V244R, S0  
 24R - N269R, G020R - E271L, S024R - E271L, V004R -  
 S009A, G020R - N269R, A001R - S024R, V244R - E271  
 L, S009A - N018R, W241R - E271L, V004R - S024R, S0  
 09A - H249R, S009A - T022R, S101G - S103A - V104I -  
 G159D - A232V - Q245R - N248D - E271F, S101G - S103  
 A - V104I - A158E - A232V - Q245R - N248D - E271F, S1  
 01G - S103A - V104I - A158E - A232V - Q245R - N248D -

30

40

50



H 2 4 9 R , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - S 2 4 R , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 L - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 3 6 H - Q 2 4 5 R - N 2 5 2 K , 及び S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 L - A 2 3 2 V - Q 2 3 6 H - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - N 2 5 2 K , からなる群から選択される 1 組以上の置換を含むシリーズ I G G 3 6 プロテアーゼ変異体を含み得、ここで、変異体の各アミノ酸位置は、配列番号 2 に記載のバチルス・アミロリケファシエンス ( *Bacillus amyloliquefaciens* ) スブチリシン B P N ' プロテアーゼのアミノ酸配列におけるアミノ酸位置に対応させることにより番号付けされる。このような組成物は布地ケア製品及びホームケア製品であってもよく、又は、布地ケア組成物及びホームケア組成物であってもよい。別の態様では、このような組成物は、布地ケア製品及びホームケア製品又は布地ケア組成物及びホームケア組成物でなくてもよい。

10

## 【 0 2 4 2 】

本発明の第十七態様による組成物は、ヘミセルラーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、ペルオキシダーゼ、プロテアーゼ、キシラナーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、エステラーゼ、クチナーゼ、ペクチナーゼ、ペクチン酸リアーゼ、マンナナーゼ、ケラチナーゼ、レダクターゼ、オキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、リポキシゲナーゼ、リグニナーゼ、プルラナーゼ、タンナーゼ、ペントサナーゼ、マラナーゼ、 $\alpha$ -グルカナーゼ、アラビノシターゼ、ヒアルロニダーゼ、コンドロイチナーゼ及びラッカーゼからなる群から選択される少なくとも 1 つの追加の酵素を含んでもよい。本発明の第十七態様による組成物は、ヘミセルラーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、ペルオキシダーゼ、プロテアーゼ、キシラナーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、エステラーゼ、クチナーゼ、ペクチナーゼ、ペクチン酸リアーゼ、マンナナーゼ、ケラチナーゼ、レダクターゼ、オキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、リポキシゲナーゼ、リグニナーゼ、プルラナーゼ、タンナーゼ、ペントサナーゼ、マラナーゼ、 $\alpha$ -グルカナーゼ、アラビノシターゼ、ヒアルロニダーゼ、コンドロイチナーゼ及びラッカーゼからなる群から選択される 2 つ以上の追加の酵素を含んでもよい。

20

## 【 0 2 4 3 】

本発明の第十七態様による組成物は、リン酸塩を含んでもよく、又は、リン酸塩を含有しなくてもよい。本発明の第十七態様による組成物は、少なくとも 1 つのビルダ - 及び / 又は少なくとも 1 つの界面活性剤を含んでもよい。

30

## 【 0 2 4 4 】

本明細書の更に他箇所にあるように、本発明のプロテアーゼ変異体などの本発明のポリペプチドは、洗濯クリーニング洗浄用途、自動食器洗浄用途、手による食器洗浄用途、硬質表面クリーニング用途、パーソナルケア用途及び本明細書に記載の他の用途などの様々なクリーニング用途において、有用である。したがって、例えば、一態様では、本発明は、本発明の少なくとも 1 つのポリペプチド ( 例えば、プロテアーゼ変異体 ) を含むクリーニング組成物を提供する。上記のように、このようなクリーニング組成物としては、例えば、自動及び手による食器洗浄洗剤組成物、洗濯洗剤組成物 ( 例えば、液体及び粉末洗濯洗剤組成物など )、布地クリーニング組成物、硬質表面クリーニング組成物 ( 例えば、食卓食器ではない物品、食卓用器具ではない物品、机、机の上、家具物品、壁、床、天井などが挙げられるがこれらに限定されない ) が挙げられるがこれらに限定されない。このようなクリーニング組成物は、クリーニングする必要のある物品又は表面のクリーニング方法において有用であり、例えば、少なくとも 1 つの賦形剤、担体及び / 又は他の置換基、構成成分若しくは物質が挙げられるがこれに限定されないものを含んでもよい。

40

## 【 0 2 4 5 】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載の任意の本発明のポリペプチド ( 例えば、任意の本発明のプロテアーゼ変異体又はスブチリシン変異体 ) を含む組成物を提供し、ここで、上記組成物は、布地ケア組成物及びホームケア組成物、又は、布地ケア製品及びホームケア製品である。

## 【 0 2 4 6 】

50

別の態様では、本発明は、本明細書に記載の任意の本発明のポリペプチド（例えば、任意の本発明のプロテアーゼ変異体又はスブチリシン変異体）を含む組成物を提供し、ここで、上記組成物は、布地ケア組成物及びホームケア組成物ではなく、又は、布地ケア製品及びホームケア製品ではない。本発明のプロテアーゼ変異体を含む本発明の組成物は、香料封入体；布地色調剤；冷水に可溶性増白剤；イミニウムカチオン、イミニウムポリイオン、イミニウム双極性イオン、修飾されたアミン、修飾されたアミノキシド、N - スルホニルイミン、N - ホスホニルイミン、N - アシルイミン、チアジアゾール二酸化物、ペルフルオロイミン、環式糖ケトンから選択される物質を含み得る漂白触媒；一回目洗浄リパーゼ（first wash lipase）；細菌クリーニングセルラーゼ；G u e r b e t非イオン性界面活性剤；及びこれらの任意のものの組み合わせから選択される少なくとも1つの添加剤物質を更に含んでもよい。本発明の組成物は、スブチリシン（E C 3 . 4 . 2 1 . 6 2）、トリプシン様又はキモトリプシン様プロテアーゼ、メタロプロテアーゼ及びこれらの混合物から選択される少なくとも1つの追加の免疫等価ではない（non-immunoequivalent）プロテアーゼを更に含んでもよい。

#### 【0247】

枯草菌（*B. subtilis*）、パチルス・アミロリケファシエンス（*B. amyloliquefaciens*）、パチルス・プミルス（*B. pumilus*）及びパチルス・ギブソニ（*B. gibsonii*）由来のスブチリシン（E C 3 . 4 . 2 1 . 6 2）；セルロモナス（*Cellulomonas*）由来のトリプシンプロテアーゼ及び/又はキモトリプシンプロテアーゼ；パチルス・アミロリケファシエンス（*B. amyloliquefaciens*）由来のメタロプロテアーゼ；並びにこれらの混合物から選択される少なくとも1つの追加の免疫等価ではないプロテアーゼを更に含んでもよい。

#### 【0248】

本発明の組成物は、一回目洗浄リパーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼ、細菌クリーニングセルラーゼ及びこれらの混合物から選択される少なくとも1つの追加の酵素を更に含む。

#### 【0249】

本発明の組成物は、以下のうちの少なくとも1つを更に含んでもよい：香料マイクロカプセルを含む香料を含む封入体；塩基、酸、疎水性、直接及び高分子染料、550 nm ~ 650 nmのピーク吸収波長を有する染料結合体及びこれらの混合物から選択される物質を含む色調剤；アニオン性洗浄性界面活性剤、非イオン性洗浄性界面活性剤、カチオン性洗浄性界面活性剤、双極性イオン性洗浄性界面活性剤及び両性洗浄性界面活性剤及びこれらの混合物から選択される物質を含む洗浄性界面活性剤；ゼオライト、リン酸塩及びこれらの混合物から選択される物質を含むビルダー；ケイ酸ナトリウム、ケイ酸カリウム及びこれらの混合物から選択される物質を含むシリケート塩；冷水に可溶性増白剤及びこれらの混合物から選択される増白剤；マレエート/アクリレートランダムコポリマー又はポリアクリレートホモポリマー及びこれらの混合物から選択される物質を含むカルボン酸塩ポリマー；テレフタレートコポリマー及びその混合物から選択される物質を含む汚れ放出ポリマー；アルキルセルロース、アルキルアルコキシアルキルセルロース、カルボキシアルキルセルロース、アルキルカルボキシアルキルセルロース及びこれらの混合物から選択される物質を含むセルロースポリマー；イミニウムカチオン、イミニウムポリイオン、イミニウム双極性イオン、修飾されたアミン、修飾されたアミノキシド、N - スルホニルイミン、N - ホスホニルイミン、N - アシルイミン、チアジアゾール二酸化物、ペルフルオロイミン、環式糖ケトン及びこれらの任意の混合物から選択される物質を含む漂白触媒；ドデカノイルオキシベンゼンスルホネート、デカノイルオキシベンゼンスルホネート、デカノイルオキシ安息香酸又はその塩、3,5,5 - トリメチルヘキサノイルオキシベンゼンスルホネート、テトラアセチルエチレンジアミン（T A E D）、ノナノイルオキシベンゼンスルホネート（N O B S）及びこれらの混合物から選択される物質を含む漂白活性化剤；過ホウ酸塩（通常一水和物又は四水和物）、過炭酸塩、過硫酸塩、過リン酸塩、ペルシリケート塩のナトリウム塩などのアルカリ金属塩が挙げられる無機過水和物塩及びその任意の混合物から選択される物質を含む過酸化水素供給源；D T P A（ジエチレントリア

ミン五酢酸)、HEDP(ヒドロキシエタンジホスホン酸)、DTPMP(ジエチレントリアミンペンタ(メチレンホスホン酸))、エチレンジアミンニコハク酸(EDDS)、1,2-ジヒドロキシベンゼン-3,5-ジスルホン酸二ナトリウム塩水和物から選択される物質を含むキレート、上記キレートの誘導体;並びにこれらの任意の混合物。

【0250】

本発明の組成物は、染料;少なくとも1つのカチオン性-塩基性染料及びスメクタイト粘土を含む染料-粘土複合体;並びにこれらの任意の組み合わせ、からなる群から選択される布地色調剤を含んでもよい。

【0251】

本発明の組成物は、小分子染料、高分子染料及びこれらの任意の組み合わせ;少なくとも1つのカチオン性-塩基性染料及びスメクタイト粘土を含む染料-粘土複合体;並びにこれらの任意の組み合わせ、からなる群から選択される布地色調剤を少なくとも含んでもよい。

10

【0252】

本発明のプロテアーゼを含む組成物は、単一又は複数区画単位用量で提供されてもよい。この組成物は、多区画単位用量であってもよく、ここで、プロテアーゼ変異体は、過酸化水素及び/又はキレート及び/又は追加の酵素の任意の供給源とは異なる区画にある。本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体又はポリペプチドを含む組成物は、洗浄液を含んでもよい。

【0253】

本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体を含む組成物は、(組成物合計重量に基づいて)以下の成分のうちの1つ以上を含んでもよい:約0.0005重量%~約0.1重量%、約0.001重量%~約0.05重量%、又は更には約0.002wt%重量%~約0.03重量%の上記プロテアーゼ変異体;並びに、以下のうちの1つ以上を含んでもよい:約0.00003重量%~約0.1重量%の布地色調剤;約0.001重量%~約5重量%の香料カプセル;約0.001重量%~約1重量%の冷水に可溶性増白剤;約0.00003重量%~約0.1重量%の漂白触媒;約0.00003重量%~約0.1重量%の一回目洗浄リパーゼ;約0.00003重量%~約0.1重量%の細菌クリーニングセルラーゼ;及び/又は約0.05重量%~約20重量%のGuerbet非イオン性界面活性剤。

20

30

【0254】

組成物は、冷水プロテアーゼを含む又は冷水プロテアーゼではないプロテアーゼを含む、顆粒又は洗濯洗剤であってもよい。

【0255】

本発明の組成物は、流体又は固体などの任意の好適な形態で提供され得る。この組成物は特に液体の形態である場合に単位用量パウチの形態であってもよく、この組成物は水溶性パウチにより少なくとも部分的に又は更には完全に封入されてもよい。加えて、本組成物は、上記に詳細を説明したパラメーター及び/又は特徴の任意の組み合わせを有してもよい。

【0256】

特に記載しない限り、本明細書に提供されるすべての構成成分又は組成物濃度は、その構成成分又は組成物の活性濃度を参照して作製され、不純物、例えば、残留溶媒又は副生成物といった不純物は除かれるが、不純物は市販の供給物中に存在する場合がある。酵素構成成分重量は、総活性タンパク質に基づく。すべての百分率及び比率は、特に示さない限り、重量に基づき計算される。すべての百分率及び比率は、特に示さない限り、総組成物に基づいて計算される。例示された洗剤組成物では、酵素濃度は、総組成物の重量に基づき純粋な酵素により表され、特に指定しない限り、洗剤成分は総組成物の重量に基づき表される。

40

【0257】

本明細書に示すように、一態様では、本発明のクリーニング組成物は、例えば、1つ以

50

上の界面活性剤、ビルダー、漂白剤、漂白活性化剤、漂白触媒、他の酵素、酵素安定化系、キレート、蛍光増白剤、汚れ除去ポリマー、転色剤、分散剤、発泡抑制剤、染料、香料、香料カプセル、着色剤、充填剤塩、ヒドロトロップ、光活性化剤、蛍光剤、布地コンディショナー、布地柔軟剤、加水分解性界面活性剤、防腐剤、酸化防止剤、収縮低減剤、しわ低減剤、殺菌剤、抗かび剤、カラー粒子、シルバークリア剤、耐変色剤及び/又は防腐剤、アルカリ供給源、可溶化剤、担体、賦形剤、加工助剤、顔料、すすぎ補助剤（例えば、液滴を形成するよりもむしろ薄いシートにおいてクリーニングされる物品の表面から排水を行うことにより液滴形成を防止するために少なくとも1つの表面活性剤を含有するすすぎ補助剤）、溶媒、及び/又はpH調整剤が挙げられるがこれらに限定されない1つ以上の添加剤物質を更に含んでもよい（例えば、米国特許第6,610,642号、同第6,605,458号、同第5,705,464号、同第5,710,115号、同第5,698,504号、同第5,695,679号、同第5,686,014号及び同第5,646,101号を参照されたい。これらのすべては参照により本明細書に組み込まれる）。具体的なクリーニング組成物材料の態様は、下記に詳細に例示される。クリーニング添加剤物質が所望のクリーニング組成物中で本発明のプロテアーゼ変異体と混合可能でない場合、2つの構成成分を組み合わせることが適切になるまで、クリーニング添加剤物質とプロテアーゼ変異体を分離したまま維持する（すなわち、互いに接触させない）好適な方法が使用される。このような分離方法としては、当該技術分野において既知の好適な方法が挙げられる（例えば、ゲルキャップ、封入、タブレット、物理的分離など）。

10

**【0258】**

20

本発明のクリーニング組成物は、例えば、洗濯用途、硬質表面クリーニング用途、手による若しくは手動食器洗浄用途、自動食器洗浄用途、眼鏡クリーニング用途、並びに、義歯、歯、毛髪及び皮膚のクリーニングなどの美容用途において、有利に採用される。低温溶液中での有効性が增大しているという独特な利点に起因して、本発明のプロテアーゼ変異体酵素は、洗濯用途、並びに、手による及び自動食器洗浄用途などの食器洗浄用途に適している。更に、本発明のプロテアーゼ変異体酵素は、固体、ゲル及び/又は液体の、洗剤組成物及び/又は配合物などの、固体、ゲル、顆粒及び/又は液体組成物において使用を見出される。

**【0259】**

本発明のプロテアーゼ変異体はまた、クリーニング添加剤製品組成物において使用を見出される。一態様では、本発明のプロテアーゼ変異体は、低温溶液クリーニングの用途及び方法において有用である。一態様では、本発明は、本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体酵素を含み、追加の漂白有効性が所望される場合の洗浄プロセスに含むことに理想的に適している、クリーニング添加剤製品組成物を提供する。このような例としては、例えば、低温溶液クリーニング用途が挙げられるが、これに限定されない。一態様では、添加剤製品組成物は、その最も単純な形態である - すなわち、1つ以上の本発明のプロテアーゼである。一態様では、添加剤製品組成物は、クリーニングプロセスへ添加するための投与形態でパッケージ化される。一態様では、添加剤製品組成物は、過酸素の供給源が採用され、増大した漂白有効性が所望されるクリーニングプロセスへ添加するための投与形態でパッケージ化される。例えば、予め測定された粉末又は液体などの、ピル、タブレット、ゲルキャップ又は他の一回用量単位が挙げられるがこれらに限定されない任意の好適な一回用量単位形態が使用され得る。したがって、一態様では、本発明は、本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体を含むクリーニング製品組成物を提供し、ここで、この製品は、一回用量のプロテアーゼ変異体が提供されるように好適な一回用量単位で好適な形態（例えば、液体、粉末固体、ピル、タブレット、ゲルキャップ又は他の好適な形態）において配合される。このようなクリーニング製品は、例えば、機械又は手による洗濯方法及び用途、自動食器洗浄又は手による食器洗浄方法及び用途などが挙げられるがこれらに限定されない様々なクリーニング方法及び用途において有用である。このようなクリーニング方法及び用途は、低温又は低pH条件にて行われ得る。一態様では、このような組成物の体積を増加するために、少なくとも1つの充填剤及び/又は少なくとも1つの

30

40

50

担体物質が含まれる。好適な充填剤又は担体物質としては、例えば、硫酸塩、炭酸塩、ケイ酸塩の様々な塩、並びに、タルク、粘土及びこれらに類するものが挙げられるが、これらに限定されない。液体組成物に好適な充填剤又は担体物質としては、例えば、水、又は、ポリオール及びジオールなどの低分子量第一級及び第二級アルコールが挙げられるがこれらに限定されない。このようなアルコールの例としては、例えば、メタノール、エタノール、プロパノール及びイソプロパノールが挙げられるがこれらに限定されない。一態様では、この組成物は、約5%～約90%のこのような充填剤又は担体物質を含有する。酸性充填剤は、クリーニング方法又は用途において得られる溶液のpHを低下させるために、このような組成物中に含まれ得る。別の方法としては、一態様では、このクリーニング添加物は、下記により十分に説明するように、1つ以上の添加剤成分を含む。

10

#### 【0260】

本クリーニング組成物及びクリーニング添加物は、有効量の本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体を単独で必要とし、又は有効量の本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体と他のプロテアーゼ及び/若しくは追加の酵素の組み合わせを必要とする。必要とされる酵素濃度は、本発明の1つ以上のプロテアーゼ変異体の添加により達成される。典型的には、クリーニング組成物は、本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体を少なくとも約0.0001重量パーセント～約20重量パーセント、約0.0001～約10重量パーセント、約0.0001～約1重量パーセント、約0.001～約1重量パーセント、又は約0.01～約0.1重量パーセント含む。一態様では、本発明の組成物（例えば、本発明のクリーニング組成物）は、組成物1グラム当たり本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体を約0.01ミリグラム（mg）～約10mg、約0.01～約5mg、約0.01mg～約2mg、約0.01～約1mg、約0.5mg～約10mg、約0.5～約5mg、約0.5～約4mg、約0.5～約4mg、約0.5～約3mg、約0.5～約2mg、約0.5～約1mg、約0.1～約10mg、約0.1～約5mg、約0.1～約4mg、約0.1～約3mg、約0.1～約2mg、約0.1～約2mg、約0.1～約1mg、約0.1～約0.5mg含む。

20

#### 【0261】

本発明は、クリーニング組成物が洗浄水に添加される場合に得られる洗浄液中のプロテアーゼ濃度が例えば、0.1ppm～1ppm、0.1～5ppm、1～5ppm、1ppm～10ppm、5ppm～10ppm、5ppm～7ppmといった0.01ppm～10ppmであるように、一定量の本発明のプロテアーゼ変異体を含むクリーニング組成物を含む（上記組成物は選択的に1つ以上の添加剤成分を含む）。

30

#### 【0262】

本発明のクリーニング組成物は、典型的には、水性クリーニング操作での使用中、洗浄水が約5.0～約11.5、又は更には約7.5～約10.5のpHを有するように配合される。液体製品組成物又は配合物は、典型的には、約3.0～約9.0、又は約3.0～約5.0の正味pHを有するように配合される。顆粒洗濯製品組成物は、典型的には、約9～11のpHを有するように配合される。手による食器洗浄及び自動食器洗浄洗剤組成物は、典型的には、例えば、方法及び具体的な用途に依存して約8～約10、約9～約11.5、及び約9.5～約11.5のpH範囲が挙げられるがこれらに限定されない約8～約11.5のpHを有するように、配合される。推奨される使用レベルにpHを制御するための技術としては、緩衝剤、アルカリ、酸などの使用が挙げられ、これらは当業者には周知である。

40

#### 【0263】

好適な低pHクリーニング組成物は、典型的には約3～約5の正味pHを有し、典型的にはこのようなpH環境において加水分解される界面活性剤を有さない。このような界面活性剤としては、少なくとも1つのエチレンオキシド部分又は更には約1～約16モルのエチレンオキシドを含むアルキル硫酸ナトリウムが挙げられる。このようなクリーニング組成物は、典型的には、約3～約5の正味pHを有するこのようなクリーニング組成物を提供するために、水酸化ナトリウム、モノエタノールアミン又は塩化水素酸などのpH緩

50

衝剤を十分な量含む。このような組成物は、典型的には、少なくとも1つの酸安定性酵素を含む。一態様ではこの組成物は液体であり、他の態様ではこれらは固体である。このような液体組成物のpHは、典型的には、正味pHとして測定される。このような固体組成物のpHは、上記組成物の10%固形分溶液として測定され、ここで、溶媒は蒸留水である。これらの態様では、すべてのpH測定は、特に示されない限り、20にて行われる。

#### 【0264】

一態様では、本発明のプロテアーゼ変異体が顆粒組成物又は液体で採用される場合、プロテアーゼ変異体は、保存中に顆粒組成物の他の構成成分からプロテアーゼ変異体を保護するために、封入された粒子の形態であることが望ましい。加えて、封入はまた、クリーニングプロセス中のプロテアーゼ変異体の有効性を制御する方法でもある。一態様では、封入は、プロテアーゼ変異体及び/又は追加の酵素の性能を増強する。この点で、本発明のプロテアーゼ変異体は、当該技術分野において既知の任意の好適な封入材で封入される。一態様では、封入材は、典型的には、本発明のプロテアーゼ変異体のために少なくとも一部の触媒を封入する。典型的には、封入材は、水溶性及び/又は水分散性である。一態様では、封入材は、0以上のガラス転移温度(T<sub>g</sub>)を有する。ガラス転移温度は、国際公開第97/11151号により詳細に説明されている。封入材は、典型的には、炭水化物、天然若しくは合成ゴム、キチン、キトサン、セルロース及びセルロース誘導体、ケイ酸塩、リン酸塩、ホウ酸塩、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、パラフィンワックス並びにこれらの組み合わせからなるものから選択される。封入材が炭水化物である場合、これは、典型的には、単糖、オリゴ糖、多糖及びこれらの組み合わせから選択される。一部の典型的態様では、封入材はデンプンである(例えば、欧州特許第0922499号、米国特許第4,977,252号、同第5,354,559号及び同第5,935,826号を参照されたい)。一態様では、封入材は、熱可塑性樹脂、アクリロニトリル、メタクリロニトリル、ポリアクリロニトリル、ポリメタクリロニトリル及びこれらの混合物などのプラスチックから製造される微小球; EXPANCEL(登録商標)(Stockviksverken, Sweden)、並びに、PM 6545、PM 6550、PM 7220、PM 7228、EXTENDOSPHERES(登録商標)、LUXSIL(登録商標)、Q-CEL(登録商標)及びSPHERICEL(登録商標)(PQ Corp.(Valley Forge, PA))により供給されるものが挙げられるがこれらに限定されない使用が見出される市販の微小球である。

#### 【0265】

本明細書に記載のように、本発明のプロテアーゼ変異体は、例えば、クリーニング、洗濯、手による食器洗浄及び自動食器洗浄洗剤組成物が挙げられるがこれらに限定されないクリーニング方法及び用途において特定の使用が見出される。これらの用途は、様々な環境圧力下に酵素を置く。本発明のプロテアーゼ変異体は、様々な条件下でのこれらのタンパク質分解活性及び安定性に起因して、このようなクリーニング用途において、現在使用されている多くの酵素を上回る利点をもたらす。

#### 【0266】

様々な洗剤配合、洗浄水体积、洗浄水温度及び洗浄時間の長さなどの様々な洗浄条件が存在し、洗浄に参与するプロテアーゼはこれらの条件に曝露される。加えて、異なる地域で使用される洗剤配合は、洗浄水中に存在するこれらの関連構成成分の異なる濃度を有する。例えば、欧州の洗剤は典型的には洗浄水中に約4500~5000百万分率(ppm)の洗剤構成成分を有し、一方、日本の洗剤は典型的には洗浄水中に約667ppmの洗剤構成成分を有する。北米では、特に米合衆国では、洗剤は典型的には洗浄水中に存在する約975ppmの洗剤構成成分を有する。

#### 【0267】

低濃度洗剤系は、洗浄水中に約800ppm未満の洗剤構成成分が存在するように洗剤を含む。洗浄水中に約667ppmの洗剤構成成分が存在することから、日本の洗剤は典型的には低濃度洗剤系と見なされる。

10

20

30

40

50

## 【0268】

中濃度洗剤は、洗浄水中に約800ppm～約2000ppmの洗剤構成成分が存在するように洗剤を含む。洗浄水中に約975ppmの洗剤構成成分が存在することから、北米の洗剤は一般に中濃度洗剤系と見なされる。ブラジルは、典型的には、洗浄水中に約1500ppmの洗剤構成成分が存在する。

## 【0269】

高濃度洗剤系は、洗浄水中に約2000ppmを超える洗剤構成成分が存在するように洗剤を含む。洗浄水中に約4500～5000ppmの洗剤構成成分が存在することから、欧州の洗剤は一般に高度濃度洗剤系と考えられる。

## 【0270】

南米の洗剤は一般に高発泡リン酸ビルダー洗剤であり、南米で使用される洗剤の範囲は、洗浄水中の洗剤構成成分が1500ppm～6000ppmの範囲であることから、中濃度及び高濃度洗剤の両方に当てはまり得る。上記のように、ブラジルは、典型的には、洗浄水中に約1500ppmの洗剤構成成分が存在する。しかしながら、他の南米諸国に限定するものではないが、他の地域の高発泡リン酸ビルダー洗剤は、洗浄水中に最大約6000ppmの洗剤構成成分が存在する高濃度洗剤系を有し得る。

## 【0271】

以上の見地から、世界中の典型的な洗浄溶液中の洗剤組成物の濃度は、例えば、日本における約667ppmのような約800ppm未満の洗剤組成物（「低濃度洗剤地域」）から、例えば、米国における約975ppm及びブラジルにおける約1500ppmのような約800ppm～約2000ppm（「中濃度洗剤地域」）に、例えば、欧州における約4500ppm～約5000ppm及び高発泡リン酸ビルダー地域における約6000ppmのような約2000ppm超まで（「高濃度洗剤地域」）、様々であることが明らかである。

## 【0272】

典型的な洗浄溶液の濃度は、経験的に測定される。例えば、米国では、典型的な洗濯機は、約64.4Lの洗浄溶液の容量を持つ。したがって、洗浄溶液中に約975ppmの濃度を得るためには、約62.79gの洗剤組成物が64.4Lの洗浄溶液に添加されなければならない。この量は、洗剤と共に提供される計量カップを用いて消費者により洗浄水に入れるべく計量される典型的な量である。

## 【0273】

更なる例として、異なる地域は、異なる洗浄温度を使用する。日本における洗浄水の温度は、典型的には、欧州において使用される温度よりも低い。例えば、北米及び日本における洗浄水の温度は典型的には約10～約30（例えば20）であり、一方、欧州における洗浄水の温度は典型的には約30～約60（例えば、約40）である。しかしながら、エネルギー節約に対する関心から、多くの消費者は、冷水洗浄の使用に切り換えている。加えて、一部の更なる領域では、冷水は典型的には洗濯並びに食器洗浄用途に使用される。一態様では、本発明の「冷水洗浄」は、約4～約10、約10～約40、又は約20～約30、約15～約25、約10～約20、約14～約18、並びに、約15～約35の範囲内のすべての他の組み合わせ及び10～40内の全範囲及び約16の温度で洗浄を行う。

## 【0274】

更なる例として、異なる地域条件は、典型的には、異なる水硬度を有する。水硬度は通常、 $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ を組み合わせるガロン当たりのグレインで説明される。硬度は、水中のカルシウム（ $Ca^{2+}$ ）とマグネシウム（ $Mg^{2+}$ ）の量の尺度である。米国のほとんどの水は硬質であるが、硬度の程度は様々である。中硬水（60～120ppm）～硬水（121～181ppm）は、60～181百万分率（百万分率をUSガロン当たりのグレインに換算するには、ppm数を17.1で除算するとガロン当たりのグレインの値になる）の硬度のミネラルを有する。

10

20

30

40

【表 1】

水	ガロン当たりのグレイン	百万分率
軟水	1.0未満	17未満
低硬度水	1.0~3.5	17~60
中硬度水	3.5~7.0	60~120
硬水	7.0~10.5	120~180
超硬水	10.5を超える	180を超える

10

## 【0275】

欧州の水硬度は、典型的には、 $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  を組み合わせて、ガロン当たり約 10.5 (例えば、約 10.5 ~ 約 20.0) グレインを超える (例えば、 $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  を組み合わせてガロン当たり約 15 グレイン)。北米の水硬度は、典型的には、日本の水硬度を超えるが、欧州の水硬度未満である。例えば、北米の水硬度は、約 3 ~ 約 10 グレイン、約 3 ~ 約 8 グレイン、又は約 6 グレインであり得る。日本の水硬度は、典型的には、北米の水硬度よりも低く、通常約 4 未満であり、例えば、 $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  を組み合わせてガロン当たり 3 グレインである。

## 【0276】

したがって、一態様では、本発明は、少なくとも 1 組の洗浄条件 (例えば、洗浄温度、水硬度及び / 又は洗剤濃度) において驚くべき洗浄性能を示すプロテアーゼ変異体を提供する。一態様では、本発明のプロテアーゼ変異体は、他のスブチリシンプロテアーゼに対して洗浄性能に匹敵する。一態様では、本発明のプロテアーゼ変異体は、現在市販されているスブチリシンプロテアーゼと比較したときに向上した洗浄性能を呈する。したがって、本発明の一態様では、本明細書に提供されるプロテアーゼ変異体は、様々な条件下で、向上した酸化安定性、向上した熱安定性、向上したクリーニング能力、及び / 又は向上したキレート化剤安定性を呈する。加えて、本発明のプロテアーゼ変異体は、先と同様に単独で又はビルダー及び安定剤と組み合わせてのいずれかで洗剤を含まないクリーニング組成物における使用を見出される。

20

30

## 【0277】

一態様では、本発明は、組成物の約 0.00001 重量% ~ 約 10 重量% の濃度で存在する本発明の少なくとも 1 つのプロテアーゼ変異体を含み、残部 (例えば、組成物の約 99.999 重量% ~ 約 90.0 重量%) が 1 つ以上のクリーニング添加剤物質を含む、クリーニング組成物を提供する。別の態様では、本発明は、組成物の約 0.0001 重量% ~ 約 10 重量%、約 0.001 重量% ~ 約 5 重量%、約 0.001 重量% ~ 2 重量%、又は約 0.005 重量% ~ 約 0.5 重量% の濃度で存在する本発明の少なくとも 1 つのプロテアーゼを含み、クリーニング組成物の残部 (例えば、約 99.9999 重量% ~ 約 90.0 重量%、約 99.999 重量% ~ 約 98 重量%、約 99.995 重量% ~ 約 99.5 重量%) が 1 つ以上のクリーニング添加剤物質を含む、クリーニング組成物を提供する。

40

## 【0278】

一態様では、本発明のクリーニング組成物は、本発明の少なくとも 1 つのプロテアーゼ変異体に加えて 1 つ以上の追加の酵素を含み、この追加の酵素は、クリーニング性能及び / 又は布地ケア及び / 又は手若しくは手動での食器洗浄及び / 又は自動食器洗浄の利益をもたらす。好適な酵素の例としては、例えば、ヘミセルラーゼ、セルラーゼ、ペルオキシダーゼ、プロテアーゼ、キシラナーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、エステラーゼ、ペルヒドロラーゼ、クチナーゼ、ペクチナーゼ、ペクチン酸リアーゼ、マンナーゼ、ケラチナーゼ、レダクターゼ、オキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、リボキシゲナーゼ、リグニナーゼ、プルナーゼ、タンナーゼ、ペントサナーゼ、マラーゼ、グルカナーゼ、アラビノシターゼ、ヒアルロニダーゼ、コンドロイチナーゼ、ラッカーゼ及び / 又は

50



アミラーゼ、中性メタロプロテアーゼ酵素（「nprE」と略される）、あるいはこれらの任意の混合物が挙げられるが、これらに限定されない。一態様では、クリーニング組成物は、本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体に加えて、例えば、少なくとも1つの追加のプロテアーゼ、リパーゼ、クチナーゼ、セルロース及び/又はアミラーゼなどの従来の適用可能な酵素を含む追加の酵素の組み合わせ（すなわち、「カクテル」）を含む。

【0279】

本明細書に提供されるプロテアーゼ変異体に加えて、任意の他の好適なプロテアーゼは、本発明の組成物に使用を見出され得、含まれ得る。一態様では、本発明は、本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体と少なくとも1つの追加のプロテアーゼとを含む組成物（例えば、クリーニング組成物）を提供する。好適なプロテアーゼとしては、動物、植物又は微生物由来のものが挙げられる。一態様では、微生物プロテアーゼが含まれてもよい。プロテアーゼの化学的又は遺伝学的に改変された変異体が含まれてもよい。一態様では、少なくとも1つの追加のプロテアーゼは、セリンプロテアーゼ、好ましくは好アルカリ菌プロテアーゼ又はトリプシン様プロテアーゼである。アルカリプロテアーゼの例としては、スブチリシン、特にパチルス由来のもの（例えば、スブチリシン、パチルス・レントラス（*B. lentus*）スブチリシン（すなわち、GG36）、パチルス・アミロリケファシエンス（*B. amyloliquefaciens*）スブチリシン（すなわち、BPN'）、スブチリシン Carl s berg、スブチリシン309、スブチリシン147、PB92及びスブチリシン168）が挙げられる。追加の例としては、米国再発行特許第34,606号、米国特許第5,955,340号、同第5,700,676号、同第6,312,936号及び同第6,482,628号（これらはすべて参照により本明細書に組み込まれる）に記載の変異体プロテアーゼ（すなわち、プロテアーゼ変異体）が挙げられる。追加のプロテアーゼとしては、（例えば、ブタ又はウシ由来の）トリプシン及び国際公開第89/06270号に記載のフザリウムプロテアーゼが挙げられるがこれらに限定されない。本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体を含む本発明の組成物はまた、少なくとも1つの市販のプロテアーゼ酵素を含んでもよい。本発明の組成物における使用を見出される市販のプロテアーゼ酵素としては、例えば、MAXATASE（登録商標）、MAXACAL（商標）、MAXAPEM（商標）、OPTICLEAN（登録商標）、OPTIMASE（登録商標）、PROPERASE（登録商標）、PURAFECT（登録商標）、PURAFECT（登録商標）OX P、PURAMAX（商標）、EXCELLASE（商標）及びPURAFAST（商標）（Genencor）；ALCALASE（登録商標）、SAVINASE（登録商標）、PRIMASE（登録商標）、DURAZYM（商標）、POLARZYME（登録商標）、OVOZYME（登録商標）、KANNASE（登録商標）、LIQUANASE（登録商標）、NEUTRASE（登録商標）、RELEASE（登録商標）及びESPERASE（登録商標）（NovoZymes）；A230V+S256G+S259Nを有するKAPパチルス・アルカロフィラス（*Bacillus alkalophilus*）スブチリシン（花王）；並びにBLAP（商標）パチルス・レントラス（*B. lentus*）プロテアーゼ、BLAP X及びBLAP S（Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien（Duesseldorf, Germany））が挙げられるがこれらに限定されない。本発明の組成物に含まれ得る追加のプロテアーゼとしては、国際公開第95/23221号、同第92/21760号、米国特許出願公開第2008/0090747号、並びに、米国特許第5,801,039号、同第5,340,735号、同第5,500,364号、同第5,855,625号、米国再発行特許第RE 34,606号、米国特許第5,955,340号、同第5,700,676号、同第6,312,936号及び同第6,482,628号、並びに様々な他の特許に記載のものが挙げられる。メタロプロテアーゼは、本発明の組成物中に含まれ得る。このようなメタロプロテアーゼとしては、例えば、国際公開第07/044993号に記載の中性メタロプロテアーゼ酵素（nprE）が挙げられるがこれに限定されない。

10

20

30

40

50

## 【0280】

一態様では、本発明は、本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体と少なくとも1つのリパーゼとを含む組成物（例えば、クリーニング組成物）を提供する。好適なリパーゼとしては、例えば、細菌又は真菌由来のものが挙げられるがこれらに限定されない。リパーゼの化学的又は遺伝学的に改変された変異体が、組成物中に含まれてもよい。有用なリパーゼの例としては、フミコラ・ラヌギノサ (*Humicola lanuginosa*) リパーゼ（例えば、欧州特許第258 068号及び同第305 216号を参照されたい）、リゾムコール・ミエヘイ (*Rhizomucor miehei*) リパーゼ（例えば、欧州特許第238 023号を参照されたい）、カンジダ・アンタルクチカ (*C. antarctica*) リパーゼなどのカンジダリパーゼ（例えば、カンジダ・アンタルクチカ (*C. antarctica*) リパーゼA又はB、例えば、欧州特許第214 761号を参照されたい）、シュードモナス・アルカリゲネス (*P. alcaligenes*) リパーゼ及びシュードモナス・シュードアルカリゲネス (*P. pseudocalcaligenes*) リパーゼ（例えば、欧州特許第218 272号を参照されたい）、シュードモナス・セパシア (*P. cepacia*) リパーゼ（例えば、欧州特許第331 376号を参照されたい）、シュードモナス・スツツェリ (*P. stutzeri*) リパーゼ（例えば、英国特許第1,372,034号を参照されたい）、シュードモナス・フルオレセンス (*P. fluorescens*) リパーゼなどのシュードモナスリパーゼ、バチルスリパーゼ（例えば、枯草菌 (*B. subtilis*) リパーゼ (*Dartois et al., Biochem. Biophys. Acta* 1131:253~260 (1993))、バチルス・ステアロサーモフィラス (*B. stearothermophilus*) リパーゼ（例えば、日本特許第64/744 992号を参照されたい）、並びに *B. pumilus* リパーゼ（例えば、国際公開第91/16422号を参照されたい））が挙げられる。

10

20

## 【0281】

更に、例えば、ペニシリウム・カメンベルティ (*Penicillium camembertii*) リパーゼ (*Yamaguchi et al., Gene* 103:61~67 (1991))、ゲオトリクム・カンジドゥム (*Geotricum candidum*) リパーゼ (*Schimada et al., J. Biochem.* 106:383~388 (1989))、並びに、リゾープス・デレマ (*R. delemar*) リパーゼ (*Hass et al., Gene* 109:117~113 (1991))、リゾープス・ニベウス (*R. niveus*) リパーゼ (*Kugimiyama et al., Biosci. Biotech. Biochem.* 56:716~719 (1992)) 及びリゾープス・オリザエ (*R. oryzae*) リパーゼなどの様々なリゾープスリパーゼが挙げられるがこれらに限定されない数多くのクローン化されたリパーゼが本発明の組成物（例えば、クリーニング組成物）において使用を見出される。

30

## 【0282】

例えば、シュードモナス・メンドシナ (*Pseudomonas mendocina*) 由来のクチナーゼ（国際公開第88/09367号を参照されたい）及びフザリウム・ソラニ・ピシ (*Fusarium solani pisi*) 由来のクチナーゼ（国際公開第90/09446号を参照されたい）が挙げられるがこれらに限定されないクチナーゼなどの他のタイプの脂肪分解酵素も本発明の一態様において使用を見出される。

40

## 【0283】

追加の好適なリパーゼとしては、M1 LIPASE（商標）、LUMA FAST（商標）及びLIPOMAX（商標）（*Genencor*）；LIPOLASE（登録商標）及びLIPOLASE（登録商標）ULTRA（*Novozymes*）；並びにリパーゼP（商標）「アマノ」（天野製薬株式会社（日本））などの市販のリパーゼが挙げられる。

## 【0284】

一態様では、本発明は、本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体と、組成物の約0.00001重量%~約10重量%の追加のリパーゼの濃度で存在する少なくとも1つのリパーゼと、組成物の重量残部の1つ以上のクリーニング添加剤物質と、を含む、組成

50

物（例えば、クリーニング組成物）を提供する。一態様では、本発明のクリーニング組成物は、本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体に加えて、組成物の約0.0001重量%～約10重量%、約0.001重量%～約5重量%、約0.001重量%～約2重量%、又は約0.005重量%～約0.5重量%のリパーゼ濃度で少なくとも1つのリパーゼを含む。

#### 【0285】

本発明の少なくとも1つの変異体と少なくとも1つのアミラーゼとを含む組成物（例えば、クリーニング組成物）も含まれる。アルカリ溶液中での使用に好適な任意のアミラーゼ（例えば、及び/又は ）は、このような組成物中に含有させるのに有用であり得る。好適なアミラーゼとしては、例えば、細菌又は真菌由来のものが挙げられるがこれらに限定されない。アミラーゼの化学的又は遺伝学的に改変された変異体が含まれてもよい。本発明の組成物において使用が見出されるアミラーゼとしては、例えば、バチルス・リケニホルミス (*B. licheniformis*) から得られる -アミラーゼが挙げられるがこれに限定されない（例えば、英国特許第1,296,839号を参照されたい）。本発明の組成物において使用が見出される市販のアミラーゼとしては、例えば、DURAMYL（登録商標）、TERMAMYL（登録商標）、FUNGAMYL（登録商標）、STAINZYME（登録商標）、STAINZYME PLUS（登録商標）、STAINZYME ULTRA（登録商標）及びBAN（商標）（Novozymes）、並びに、POWERASE（商標）、RAPIDASE（登録商標）及びMAXAMYL（登録商標）P（Genencor）が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0286】

一態様では、本発明は、少なくとも1つのプロテアーゼ変異体又は少なくとも1つのアミラーゼを含むクリーニング組成物を提供し、ここで、アミラーゼは、組成物の約0.00001重量%～約10重量%の追加のアミラーゼの濃度で存在し、組成物の重量残部は1つ以上のクリーニング添加剤物質である。別の態様では、本発明は、少なくとも1つのプロテアーゼ変異体と、組成物の約0.0001重量%～約10重量%、約0.001重量%～約5重量%、約0.001重量%～約2重量%、約0.005重量%～約0.5重量%のアミラーゼ濃度で存在する少なくとも1つのアミラーゼと、を含むクリーニング組成物を提供する。

#### 【0287】

任意の好適なセルラーゼが、本発明のクリーニング組成物において使用を見出され得る。一態様では、本発明は、本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体と1つ又は少なくとも1つのセルラーゼとを含むクリーニング組成物を提供する。好適なセルラーゼとしては、例えば、細菌又は真菌由来のものが挙げられるがこれらに限定されない。セルラーゼの化学的又は遺伝学的に改変された変異体は、本発明の組成物中に含まれ得る。好適なセルラーゼとしては、例えば、フミコラ・インソレンス (*Humicola insolens*) セルラーゼ（例えば、米国特許第4,435,307号を参照されたい）及び色ケア効果を有するセルラーゼ（例えば、欧州特許第0,495,257号を参照されたい）が挙げられるがこれらに限定されない。追加の好適なセルラーゼが当該技術分野において既知である。本明細書の組成物において使用を見出され、含まれ得る市販のセルラーゼとしては、例えば、CELLUZYME（登録商標）、CAREZYME（登録商標）（Novozymes）及びKAC-500（B）（商標）（花王株式会社）、Puradax 7000L、Puradax HA 4000G（Genencor）が挙げられるがこれらに限定されない。一態様では、セルラーゼは、成熟野生型又は変異型セルラーゼの、部分又は断片として組み込まれ、N末端の部分は除去される（例えば、米国特許第5,874,276号を参照されたい）。一態様では、本発明のクリーニング組成物は、本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体と、組成物の約0.00001重量%～約10重量%の追加のセルラーゼ濃度で存在する少なくとも1つのセルラーゼと、組成物の重量残部の1つ以上のクリーニング添加剤物質と、を含む。別の態様では、本発明は、本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体と、組成物の約0.0001重量%～約10重量%、約0.0

0.1重量%～約5重量%、約0.001重量%～約2重量%、約0.005重量%～約0.5重量%のセルラーゼの濃度で存在する少なくとも1つのアミラーゼと、を含むクリーニング組成物を提供する。

【0288】

洗剤組成物での使用に好適なマンナーゼもまた使用を見出され、したがって、本発明のクリーニング組成物中に含まれ得る。一態様では、本発明は、本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体と少なくとも1つのマンナーゼとを含むクリーニング組成物を提供する。好適なマンナーゼとしては、例えば、細菌又は真菌由来のものが挙げられるがこれらに限定されない。マンナーゼの化学的又は遺伝学的に改変された変異体は、本発明の組成物中に含まれ得る。有用であり、本発明の組成物中に含まれ得る様々なマンナーゼが既知である（例えば、米国特許第6,566,114号、同第6,602,842号及び同第6,440,991号（これらは全て参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい）。一態様では、本発明は、本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体と、組成物の約0.00001重量%～約10重量%の追加のマンナーゼ濃度の少なくとも1つのマンナーゼと、組成物の重量残部の1つ以上のクリーニング添加剤物質と、を含むクリーニング組成物を提供する。一部のこのようなクリーニング組成物では、各マンナーゼは、組成物の約0.0001重量%～約10重量%、約0.001重量%～約5重量%、約0.001重量%～約2重量%、又は約0.005重量%～約0.5重量%のマンナーゼの濃度で存在する。

10

【0289】

ペルオキシダーゼは、本発明の組成物中で過酸化水素又その供給源（例えば、過炭酸塩、過ホウ酸塩又は過硫酸塩）と組み合わせて使用され得る。オキシダーゼは、本発明の組成物中で酸素と組み合わせて使用され得る。このようなタイプの酵素はどちらも、「溶液漂白」のために（すなわち、複数の布地を洗浄液中で一緒に洗浄する場合に染色された布地から別の布地に布地染料が移るのを防止するために）使用され、好ましくは、増強剤（例えば、国際公開第94/12621号及び同第95/01426号を参照されたい）と共に使用される。本発明の組成物中に含まれ得る好適なペルオキシダーゼ/オキシダーゼとしては、例えば、植物、細菌又は真菌由来のものが挙げられるが、これらに限定されない。ペルオキシダーゼ又はオキシダーゼの、化学的又は遺伝学的に改変された変異体は、本発明の組成物中に含まれ得る。一態様では、本発明は、本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体と少なくとも1つのペルオキシダーゼ又は少なくとも1つのオキシダーゼ酵素とを含む、クリーニング組成物を提供する。このようなペルオキシダーゼ又はオキシダーゼはそれぞれ、組成物中に、組成物の約0.00001重量%～約10重量%のペルオキシダーゼ又はオキシダーゼの濃度で存在し、組成物の重量残部は1つ以上のクリーニング添加剤物質である。別の態様では、本発明は、本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体と、少なくとも1つのペルオキシダーゼ及び/又は少なくとも1つのオキシダーゼと、を含むクリーニング組成物を提供し、ここで、このようなペルオキシダーゼ又はオキシダーゼはそれぞれ、組成物中の約0.0001重量%～約10重量%、約0.001重量%～約5重量%、約0.001重量%～約2重量%、又は約0.005重量%～約0.5重量%のペルオキシダーゼ又はオキシダーゼ酵素の濃度で各々存在する。

20

30

40

【0290】

一態様では、本発明は、本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体と、例えば、1つ以上のペルヒドロラーゼ（例えば、国際公開第05/056782号を参照されたい）が挙げられるがこれに限定されない、使用が見出される1つ以上の追加の酵素と、を含む組成物（例えば、クリーニング組成物）を提供する。

【0291】

別の態様では、本発明は、本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体を含む組成物（例えば、クリーニング組成物）を提供し、例えば、1つ以上の追加のプロテアーゼ、アミラーゼ、リパーゼ、マンナーゼ及び/又はセルラーゼのような上記酵素の1つ以上の混合物が包含される。実際、これらの酵素の様々な混合物は本発明の組成物において使用

50

が見出されることが想到される。様々な濃度のプロテアーゼ変異体及び1つ以上の追加の酵素は、どちらも独立して約10%までの範囲であってもよく、クリーニング組成物の残部は1つ以上のクリーニング添加剤物質である。クリーニング添加剤物質の具体的選択は、クリーニングすべき表面又は物品（例えば、食卓食器物品、食卓用器具物品又は布地物品）又は布地、並びに、使用時のクリーニング条件（例えば、手による又は自動食器洗浄洗剤用途時の条件）に関する組成物の所望される形態を考慮することにより、容易に行われる。

#### 【0292】

一態様では、本発明は、本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体と（選択的に所望される場合には少なくとも1つの追加の酵素と）1つ以上のクリーニング添加剤物質を含む組成物（例えば、クリーニング組成物）を提供する。好適なクリーニング添加剤物質の例としては、例えば、界面活性剤、ビルダー、漂白剤、漂白剤、漂白活性化剤、漂白触媒、他の酵素、酵素安定化剤、キレート剤、蛍光増白剤、汚れ除去ポリマー、転色剤、転染防止剤、触媒物質、過酸化水素、過酸化水素供給源、高分子分散剤、粘土汚れ除去剤、構造弾性化剤、分散剤、発泡抑制剤、染料、香料、着色剤、充填剤塩、ヒドロトロープ、香料、香料カプセル、光活性化剤、蛍光剤、布地コンディショナー、布地柔軟剤、担体、ヒドロトロープ、加工助剤、溶媒、色素、加水分解性界面活性剤、防腐剤、酸化防止剤、収縮低減剤、しわ低減剤、殺菌剤、抗かび剤、カラー粒子、シルバークレア、耐変色剤及び/又は防腐剤、アルカリ性供給源、可溶化剤、担体、加工助剤、色素及びpH調整剤が挙げられるが、これらに限定されない（例えば、米国特許第6,610,642号、同第6,605,458号、同第5,705,464号、同第5,710,115号、同第5,698,504号、同第5,695,679号、同第5,686,014号及び同第5,646,101号（これらの全ては参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい）。具体的なクリーニング組成物物質の態様は、下記に詳細に例示される。上記のように、クリーニング添加剤物質が、所望のクリーニング組成物中に含まれる本発明のプロテアーゼ変異体と混合可能でない場合、構成成分を組み合わせることが適切になるまで、クリーニング添加剤物質とプロテアーゼを分離したまま維持する（すなわち、互いに接触させない）好適な方法が使用される。このような分離方法としては、当該技術分野において既知の好適な方法が挙げられる（例えば、ゲルキャップ、封入、タブレット、物理的分離など）。

#### 【0293】

一態様では、本発明の組成物（例えば、クリーニング組成物）は、タンパク質性のシミを除去する必要がある表面をクリーニングするのに有用又は有効である本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体を有効量含む。このようなクリーニング組成物としては、硬質表面、洗濯物、布地、食器、食卓用器具又は食卓食器をクリーニング（例えば、手による若しくは手動の食器洗浄又は自動食器洗浄）するような用途のためのクリーニング組成物が挙げられる。実際、一態様では本発明は布地クリーニング組成物を提供し、一方、別の態様では本発明は非布地クリーニング組成物を提供する。注目すべきことに、本発明はまた、本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体を含むクリーニング組成物を提供し、ここで、このようなクリーニング組成物は、口腔ケア（歯磨き、練り歯磨き、マウスウォッシュなど並びに義歯クリーニング組成物が挙げられる）などの、パーソナルケアに好適であり、皮膚及び毛髪のクリーニングに好適であり、並びに眼鏡のクリーニングに好適である。本発明は、任意の形態（すなわち、液体、顆粒、バー、固形、半固形、ゲル、エマルジョン、タブレット、カプセルなど）の洗剤組成物を包含することが意図される。

#### 【0294】

例示目的で、本発明のプロテアーゼ変異体が見出される複数のクリーニング組成物は下記により詳細に説明される。本発明のクリーニング組成物が洗濯機洗浄方法における使用に好適な組成物として配合される一態様では、本発明の組成物は、好ましくは、少なくとも1つの界面活性剤及び少なくとも1つのビルダー化合物、並びに、有機高分子化合物、漂白剤、追加の酵素、発泡抑制剤、分散剤、石灰石鹼分散剤、汚れ懸濁剤及び再付

10

20

30

40

50

着防止剤及び腐食防止剤からなる群から選択される1つ以上のクリーニング添加剤物質と  
いった1つ以上のクリーニング添加剤物質を含有する。一態様では、洗濯組成物はまた、1  
つ以上の柔軟剤も(すなわち、追加のクリーニング添加剤物質として)含有する。本発明  
の1つ以上のプロテアーゼ変異体を添加できる追加の代表的洗濯又は布地クリーニング組  
成物及び配合物は、下記実施例において示される。

【0295】

本発明の組成物はまた、固体又は液体形態での洗剤添加剤製品として使用を見出される。  
このような添加剤製品は、従来の洗剤組成物の性能を補助及び/又は増強することが意  
図されており、クリーニングプロセスの任意の段階で添加され得る。一態様では洗濯洗  
剤組成物の密度は約400~約1200g/リットルの範囲であり、別の態様では20に  
て測定したときに約500~約950g/リットルの組成物の範囲である。

10

【0296】

一態様では、本発明は、少なくとも本発明のプロテアーゼ変異体を含む米国特許第6,  
605,458号に記載されているものなどのクリーニング組成物を提供する。一態様では  
本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体を含む組成物はコンパクト顆粒布地ク  
リーニング組成物であり、一方、他の態様ではこの組成物は着色布地の選択において有用な  
顆粒布地クリーニング組成物であり、別の態様ではこの組成物は洗浄能力を通して柔軟化  
をもたらす顆粒布地クリーニング組成物である。別の態様では、この組成物は、強力液体  
布地クリーニング組成物である。別の態様では、本発明は、本発明の少なくとも1つの  
プロテアーゼ変異体を含む組成物を提供し、ここで、この組成物は、米国特許第6,  
610,  
642号及び同第6,  
376,  
450号に記載のもののような布地クリーニング組成物  
である。本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体を含む欧州又は日本の洗浄条件下  
での特別な有用性(例えば、米国特許第6,  
610,  
642号)を有する顆粒洗濯洗剤組  
成物も提供される。

20

【0297】

一態様では、本発明は、本明細書に提供される少なくとも1つのプロテアーゼ変異体  
を含む硬質表面クリーニング組成物を提供する。一部のこのような組成物は、少なく  
とも1つのこのようなプロテアーゼ変異体を含む米国特許第6,  
610,  
642号、同第6,  
376,  
450号及び同第6,  
376,  
450号に記載のものなどの硬質表面ク  
リーニング組成物を含む。

30

【0298】

本発明は、本明細書に提供される少なくとも1つのプロテアーゼ変異体を含む手による  
食器洗浄又は自動での食器洗浄用の洗剤組成物を含む。一部のこのような組成物は、米  
国特許第6,  
610,  
642号及び同第6,  
376,  
450号に記載のものなどの硬質表面  
クリーニング組成物を含む。

【0299】

一態様では、本発明は、本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体並びに/又は少  
なくとも1つの界面活性剤並びに/又は、有機高分子化合物、発泡促進剤、II族金属イ  
オン、溶媒、ヒドロトロップ及び追加の酵素からなる群から選択される少なくとも1つの  
追加のクリーニング添加剤物質を含む、手動若しくは手による食器洗浄又は自動食器  
洗浄方法においてクリーニング組成物を提供する。

40

【0300】

本発明のクリーニング組成物が自動食器洗浄機方法における使用に好適な組成物として  
配合される一態様では、本発明の組成物は、典型的には、少なくとも1つの界面活性剤及  
び/又は少なくとも1つのビルダー化合物を含有し、有機高分子化合物、漂白剤、追加の  
酵素、発泡抑制剤、分散剤、石灰石鹼分散剤、汚れ懸濁剤及び再付着防止剤及び腐食防  
止剤から好ましくは選択される1つ以上のクリーニング添加剤物質を含有し得る。本発  
明の1つ以上のプロテアーゼ変異体を添加できる追加の代表的食器洗浄組成物及び配  
合物は、下記実施例において示される。

【0301】

50

別の態様では、本発明は、口腔ケア（例えば、歯及び義歯のクリーニング）に有用である本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体を含む口腔ケア組成物を提供し、このような組成物中で有用でありかつ含まれ得る口腔ケア組成物の構成成分としては、米国特許第6,376,450号に記載のものが挙げられる。本発明の組成物は、米国特許第6,376,450号、同第6,605,458号及び同第6,610,642号（これらのすべては参照により本明細書に組み込まれる）に記載のクリーニング添加物質及び化合物を更に含み得る。

#### 【0302】

本発明のクリーニング組成物は、任意の好適な形態に配合され、配合者により任意のプロセスにより調製され、その非限定例は、米国特許第5,879,584号、同第5,691,297号、同第5,574,005号、同第5,569,645号、同第5,565,422号、同第5,516,448号、同第5,489,392号及び同第5,486,303号に記載され、これらのすべては参照により本明細書に組み込まれる。低pHのクリーニング組成物が所望される場合、このような組成物のpHは、モノエタノールアミンなどの物質又は塩酸（HCl）などの酸性物質の添加を介して調整される。

#### 【0303】

本発明の目的にとって本質的なものではないが、以降に示される添加剤の非限定リストは、本クリーニング組成物における使用に好適である。一態様では、これらの添加剤は、例えば、クリーニングすべき基材の処理に関しクリーニング性能を補助又は増強するために、あるいは、香料、着色剤、染料又はこれらに類するものと同様にクリーニング組成物の美観を改質するために、組み込まれる。このような添加剤は本発明のプロテアーゼ変異体に加えられることが理解される。これらの添加剤成分の正確な性質及びその組み込み濃度は、組成物の物理的形態、並びに、それが使用されるクリーニング操作の性質に依存する。好適な添加剤物質としては、例えば、界面活性剤、ビルダー、キレート剤、移染防止剤、付着助剤、分散剤、追加の酵素及び酵素安定剤、触媒物質、漂白活性化剤、漂白増進剤、過酸化水素、過酸化水素供給源、予備成形過酸、高分子分散剤、粘土汚れ除去剤/再付着防止剤、増白剤、発泡抑制剤、染料、香料、構造弾性化剤、布地柔軟剤、担体、ヒドロトロップ、加工助剤及び/又は色素が挙げられるがこれらに限定されない。下記の開示に加えて、このような他の添加剤の好適な例及び使用濃度は、米国特許第5,576,282号、同第6,306,812号及び同第6,326,348号に見られ、これらは参照により組み込まれる。上記添加剤成分は、本発明のクリーニング組成物の残部を構成し得る。

#### 【0304】

一態様では、本発明のクリーニング組成物は、少なくとも1つの界面活性剤及び/又は界面活性剤系を含み、ここで、この界面活性剤は、非イオン性界面活性剤、アニオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤、両性界面活性剤、双極性イオン性界面活性剤、半極非イオン性界面活性剤及びこれらの混合物から選択される。一部の低pHのクリーニング組成物（例えば、約3～約5の正味pHを有する組成物）の態様では、アルキルエトキシル化硫酸塩は組成物の酸性含有物により加水分解され得ると考えられることから、組成物は典型的にはこのような界面活性剤を含有しない。一態様では、この界面活性剤は、クリーニング組成物の約0.1重量%～約60重量%の濃度で存在し、一方代替的態様では濃度は洗浄組成物の約1重量%～約50重量%であり、一方代替的態様では約5重量%～約40重量%である。

#### 【0305】

一態様では、本発明のクリーニング組成物は、1つ以上の洗剤ビルダー又はビルダー系を含む。少なくとも1つのビルダーを含む一部のこのような組成物では、クリーニング組成物は、クリーニング組成物の少なくとも約1重量%、約3重量%～約60重量%、又は更には約5重量%～約40重量%のビルダーを含む。ビルダーとしては、例えば、ポリリン酸塩のアルカリ金属、アンモニウム及びアルカノールアンモニウム塩、アルカリ金属ケイ酸塩、アルカリ土類及びアルカリ金属炭酸塩、アルミノケイ酸塩、ポリカルボキシレー

10

20

30

40

50

ト化合物、エーテルヒドロキシポリカルボキシレート、無水マレイン酸とエチレン又はビニルメチルエーテルのコポリマー、1, 3, 5 - トリヒドロキシベンゼン - 2, 4, 6 - トリスルホン酸及びカルボキメチルオキシコハク酸、エチレンジアミン四酢酸及びニトリロ三酢酸などのポリ酢酸並びにメリト酸、コハク酸、クエン酸、オキシジコハク酸、ポリマレイン酸、ベンゼン1, 3, 5 - トリカルボン酸、カルボキシメチルオキシコハク酸などのポリカルボキシレートの様々なアルカリ金属、アンモニウム及び置換アンモニウム塩、並びにこれらの可溶性塩が挙げられるがこれらに限定されない。任意の好適なビルダーが本発明の様々な組成物において使用を見出されることが想到される。

**【0306】**

一部のこのような組成物では、ビルダーは、クエン酸塩及びポリリン酸塩（例えば、トリポリリン酸ナトリウム及びトリポリリン酸ナトリウム六水和物、トリポリリン酸カリウム、並びに、トリポリリン酸ナトリウム及びトリポリリン酸カリウムの混合物など）などの水溶性の硬度イオン錯体（例えば、捕捉ビルダー）を形成する。本発明での使用が見出され得る、当該技術分野において既知のもの（例えば、欧州特許第2 100 949号を参照されたい）を含む任意の好適なビルダーが想到される。

10

**【0307】**

本発明の一部のクリーニング組成物は、少なくとも1つのプロテアーゼ変異体に加えて少なくとも1つのキレート化剤を含む。好適なキレート化剤としては、例えば、銅、鉄及び/又はマンガンキレート化剤及びこれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。少なくとも1つのキレート化剤が使用される態様では、本発明のクリーニング組成物は、主題のクリーニング組成物の約0.1重量%～約15重量%、又は更には約3重量%～約10重量%のキレート化剤を含む。

20

**【0308】**

本明細書に提供される一部のクリーニング組成物は、少なくとも1つのプロテアーゼ変異体に加えて少なくとも1つの付着助剤を含む。好適な付着助剤としては、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリカルボキシレート、ポリテレフタル酸などの汚れ除去ポリマー、カオリナイト、モンモリロナイト、アタパルジャイト、イライト、ベントナイト、ハロイサイトなどの粘土、及びこれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。

**【0309】**

本明細書に示すように、一態様では、再付着防止剤は、本発明の一態様における使用を見出される。一態様では、非イオン性界面活性剤が使用を見出される。これらの非イオン性界面活性剤もまた、汚れの再付着防止において使用を見出される。一態様では、再付着防止剤は、当該技術分野において既知であるような非イオン性界面活性剤である（例えば、欧州特許第2 100 949号を参照されたい）。

30

**【0310】**

一態様では、本発明のクリーニング組成物は、1つ以上の移染防止剤を含む。好適な高分子移染防止剤としては、ポリビニルピロリドンポリマー、ポリアミンN - 酸化物ポリマー、N - ビニルピロリドン及びN - ビニルイミダゾールのコポリマー、ポリビニルオキサゾリドン、並びにポリビニルイミダゾール又はこれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。少なくとも1つの移染防止剤が使用される態様では、本発明のクリーニング組成物は、クリーニング組成物の約0.0001重量%～約10重量%、約0.01重量%～約5重量%、又は更には約0.1重量%～約3重量%を含む。

40

**【0311】**

一態様では、ケイ酸塩は、本発明の組成物中に含まれる。一部のこのような態様では、ケイ酸ナトリウム（例えば、二ケイ酸ナトリウム、メタケイ酸ナトリウム及び結晶質フィロケイ酸塩）は、使用を見出される。一態様では、ケイ酸塩は、約1%～約20%の濃度で存在する。一態様では、ケイ酸塩は、組成物の約5重量%～約15重量%の濃度で存在する。

**【0312】**

50



一態様では、本発明のクリーニング組成物はまた、分散剤を含む。好適な水溶性有機物質としては、例えば、ポリカルボン酸が2個以下の炭素原子により互いに分離された少なくとも2個のカルボキシルラジカルを含むホモポリマー又はコポリマー酸若しくはこれらの塩が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0313】

一態様では、クリーニング組成物において使用される酵素（例えば、本発明のプロテアーゼ変異体又は他の追加の酵素）は、任意の好適な技術により安定化される。一態様では、本明細書で採用される酵素は、最終組成物中に、カルシウム及び/又はマグネシウムイオンを酵素に供給する、このようなイオンの水溶性供給源が存在することにより、安定化される。一態様では、酵素安定剤としては、オリゴ糖、多糖、並びに、カルシウム塩のよ  
10  
うなアルカリ土類金属などの無機二価金属塩が挙げられる。酵素安定化に関する様々な技術が本発明において使用を見出されることが想到される。例えば、一態様では、本明細書で採用される酵素は、最終組成物中に、亜鉛（II）、カルシウム（II）及びマグネシウム（II）イオン並びに他の金属イオン（例えば、バリウム（III）、スカンジウム（II）、鉄（II）、マンガン（II）、アルミニウム（III）、スズ（II）、コバルト（II）、銅（II）、ニッケル（II）及びオキソバナジウム（IV））を酵素に供給する、このようなイオンの水溶性供給源が存在することにより安定化される。塩化物及び硫酸塩もまた本発明の一態様において使用を見出される。好適なオリゴ糖及び多糖（例えば、デキストリン）は当該技術分野において既知である（例えば、国際公開第07/145964号を参照されたい）。一態様では、可逆性プロテアーゼ阻害剤もまた使用  
20  
を見出され、例えば、ホウ素含有化合物（例えば、ホウ酸塩、フェニルボロン酸、4-ホルミルフェニルボロン酸、他のフェニルボロン酸誘導体、ペプチド阻害剤及びこれらに類するもの）及び/又はトリペプチドアルデヒドは、所望されるように安定性を更に改善するために本発明の組成物において使用を見出される。

#### 【0314】

一態様では、1つ以上の漂白剤、漂白活性化剤及び/又は漂白触媒が本発明の組成物に含まれる。一態様では、本発明のクリーニング組成物は、無機及び/又は有機漂白化合物を含む。無機漂白剤としては、過水和物塩（例えば、過ホウ酸塩、過炭酸塩、過リン酸塩、過硫酸塩、過ケイ酸塩）が挙げられるが、これらに限定されない。一態様では、無機過水和物塩は、アルカリ金属塩である。一態様では、無機過水和物塩は追加で保護せずに結  
30  
晶質固体として含まれるが、一部の他の態様では塩はコーティングされる。当該技術分野において既知である任意の好適な塩は、本発明の組成物における使用を見出される（例えば、欧州特許第2 100 949号を参照されたい）。

#### 【0315】

一態様では、漂白活性化剤は、本発明の組成物において使用される。漂白活性化剤は、典型的には、60 以下の温度でのクリーニング過程での漂白作用を向上させる有機過酸前駆体である。本明細書での使用に好適な漂白活性化剤としては、過加水分解条件下で、好ましくは約1～約10個の炭素原子、特に約2～約4個の炭素原子を有する脂肪族ペル  
40  
オキシカルボン酸及び/又は選択的に置換された過安息香酸を生じる化合物が挙げられる。追加の漂白活性化剤は、当該技術分野において既知であり、本発明の組成物において使用を見出される（例えば、欧州特許第2 100 949号を参照されたい）。

#### 【0316】

一態様では及び本明細書に更に記載するように、本発明のクリーニング組成物は、少なくとも1つの漂白触媒を更に含む。一態様では、マンガントリアザシクロノナン及び関連する錯体並びにコバルト、銅、マンガン及び鉄錯体が見出される。追加の漂白触媒は、本発明において使用が見出される（例えば、米国特許第4,246,612号、同第5,227,084号及び同第4,810,410号、国際公開第99/06521号並びに欧州特許第2 100 949号を参照されたい）。

#### 【0317】

一態様では、本発明のクリーニング組成物は、1つ以上の金属錯体触媒を含む。一態様

10

20

30

40

50

では、金属含有漂白触媒が使用を見出される。一部の態様では、金属漂白触媒は、漂白触媒活性が規定された遷移金属カチオン（例えば、銅、鉄、チタン、ルテニウム、タングステン、モリブデン又はマンガンカチオン）、ほとんど又は全く触媒活性を有さない補助金属カチオン（例えば、亜鉛又はアルミニウムカチオン）、並びに、触媒及び補助金属カチオンについて規定された安定度定数を有する分画（sequestrate）を含む触媒系を含み、特にエチレンジアミン四酢酸、エチレンジアミン四（メチレンホスホン酸）及びこれらの水溶性塩が使用される（例えば、米国特許第4,430,243号を参照されたい）。一態様では、本発明のクリーニング組成物は、マンガン化合物により触媒される。このような化合物及び使用濃度は、当該技術分野において周知である（例えば、米国特許第5,576,282号を参照されたい）。追加の態様では、コバルト漂白触媒が使用を見出され、本発明のクリーニング組成物中に含まれる。様々なコバルト漂白触媒が当該技術分野において既知であり（例えば、米国特許第5,597,936号及び同第5,595,967号を参照されたい）、既知の手順により容易に調製される。

10

**【0318】**

一態様では、本発明のクリーニング組成物は、巨大多環固定配位子（macropolycyclic rigid ligand）（MRL）の遷移金属錯体を含む。実際には、制限目的ではないが、一態様では、本発明により提供される組成物及びクリーニングプロセスは、水性洗浄溶媒中の少なくとも約1億分率の活性MRL種を供給するように、一態様では洗浄液中の約0.005ppm～約25ppm、約0.05ppm～約10ppm、及び約0.1ppm～約5ppmのMRLを提供するように、調整される。

20

**【0319】**

一態様では、この遷移金属漂白触媒中の遷移金属としては、例えば、マンガン、鉄及びクロムが挙げられるが、これらに限定されない。好ましいMRLとしては、例えば、交差架橋している超硬配位子（special ultra-rigid ligands）（例えば、5,12-ジエチル-1,5,8,12-テトラアザピシクロ（6.6.2）ヘキサデカン）も挙げられるがこれに限定されない。好適な遷移金属MRLは、既知の手順により容易に調製される（例えば、国際公開第2000/32601号及び米国特許第6,225,464号を参照されたい）。

**【0320】**

一態様では、本発明は、洗剤タブレットとして配合された自動食器洗浄洗剤組成物を提供する。このようなタブレットは、本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体と、例えば、ビルダー塩などのビルダーを含む。一部のこのようなタブレットは、タブレット組成物100グラム当たり3グラム（g）の水酸化ナトリウムに少なくとも等価であるアルカリ度と、少なくとも1.4グラム/立方センチメートルの密度と、を有する。ビルダー塩は、シリケート塩とホスフェート塩の混合物を含むことができ、好ましくはケイ酸塩（例えば、メタケイ酸ナトリウム）がリン酸塩（例えば、トリポリリン酸ナトリウム）よりも多い。一部のこのようなタブレットは、界面活性剤物質を含まず、自動食器洗浄機での使用に特に適合している。

30

**【0321】**

一態様では、本発明のクリーニング組成物は、金属ケア剤を含む。金属ケア剤は、アルミニウム、ステンレス鋼及び非第一鉄金属（例えば、銀及び銅）などの金属の変色、腐食及び/又は酸化を、防止及び/又は低減するのに有用である。好適な金属ケア剤としては、欧州特許第2,100,949号、国際公開第9426860号及び同第94/26859号に記載のものが挙げられる。一部のこのようなクリーニング組成物では、金属ケア剤は、亜鉛塩である。一部のこのようなクリーニング組成物は、約0.1重量%～約5重量%の1つ以上の金属ケア剤を含む。

40

**【0322】**

上記に示しているように、本発明のクリーニング組成物は、任意の好適な形態に配合され、配合者により任意のプロセスにより調製され、その非限定例は、米国特許第5,879,584号、同第5,691,297号、同第5,574,005号、同第5,569

50

、645号、同第5,516,448号、同第5,489,392号及び同第5,486,303号に記載され、これらのすべては参照により本明細書に組み込まれる。低pHのクリーニング組成物が所望される一態様では、このような組成物のpHは、塩酸(HCl)などの酸性物質の添加を介して調整される。

#### 【0323】

本明細書に開示されているクリーニング組成物は、部位(例えば、表面、食卓食器、食卓用器具又は布地)のクリーニングにおいて使用を見出される。典型的には、部位の少なくとも一部分は、未希釈形態の又は洗浄液に希釈された本発明のクリーニング組成物に接触し、次に、この部位は選択的に洗浄され及び/又はすすがれる。本発明の目的のために、「洗浄」としては、例えば、擦ること及び機械的攪拌が挙げられるがこれらに限定されない。一態様では、クリーニング組成物は、溶液中に約500ppm~約15,000ppmの濃度で採用される。洗浄溶媒が水である場合、水温は典型的には約5~約90の範囲であり、部位が布地を含む場合、水と布地の質量比は典型的には約1:1~約30:1である。

10

#### 【0324】

組成物の作製及び使用プロセス

例えば、クリーニング組成物などの本明細書に及び全体にわたって記載の本発明の組成物は、任意の好適な形態に配合することができ、配合者により選択される任意の好適なプロセスにより調製することができる(例えば、米国特許第5,879,584号、同第5,691,297号、同第5,574,005号、同第5,569,645号、同第5,565,422号、同第5,516,448号、同第5,489,392号、同第5,486,303号、同第4,515,705号、同第4,537,706号、同第4,515,707号、同第4,550,862号、同第4,561,998号、同第4,597,898号、同第4,968,451号、同第5,565,145号、同第5,929,022号、同第6,294,514号及び同第6,376,445号を参照されたい)。

20

#### 【0325】

一態様では、本発明のクリーニング組成物は、タブレット、カプセル、サッシェ、パウチ及び多区画パウチなどの単位用量形態で提供される。一態様では、単位用量フォーマットは、多区画パウチ(又は他の単位用量フォーマット)内の成分の制御放出をもたらすために設計される。好適な単位用量及び制御放出フォーマットは当該技術分野において既知である(例えば、単位用量及び制御放出フォーマットでの使用に好適な物質について、欧州特許第2,100,949号、国際公開第02/102,955号、米国特許第4,765,916号及び同第4,972,017号、並びに国際公開第04/111,178号を参照されたい)。一態様では、単位用量形態は、水溶性フィルム又は水溶性パウチで包まれたタブレットにより提供される。単位用量のための様々なフォーマットが欧州特許第2,100,947号に提供され、当該技術分野において既知である。

30

#### 【0326】

本発明の組成物の作製及び使用プロセスに関する本発明の追加の態様は、本明細書に他箇所に記載されている。

#### 【0327】

本発明の方法

本発明は、例えば、食卓食器物品、食卓用器具物品、布地物品、洗濯物品、パーソナルケア物品、メガネなど又はこれらに類するものをクリーニング又は洗浄する方法、並びに、例えば、物品の硬質表面などの硬質又は軟質表面をクリーニング又は洗浄するための方法が挙げられるがこれらに限定されない、洗浄の必要のある物品又は表面(例えば、硬質表面)をクリーニング又は洗浄するための方法を提供する。

40

#### 【0328】

一態様では、本発明は、クリーニングする必要がある物品、対象又は表面をクリーニングするための方法を提供し、この方法は、物品又は表面(あるいはクリーニングすることが望ましい物品又は表面の部分)を、十分な時間にわたって及び/又は、これらの物品、

50

対象若しくは表面を所望の程度までクリーニングするのに好適な若しくは有効な条件下で、本発明の任意のプロテアーゼ変異体又は本発明の組成物と接触させることを含む。一部のこのような方法は、物品、対象又は表面を水ですすぐことを更に含む。一部のこのような方法では、クリーニング組成物は食器洗浄洗剤組成物であり、クリーニングすべき物品又は対象は、食卓食器物品又は食卓用器具物品である。食卓食器物品は、食物を給仕する又は食べるのに通常使用される食器物品である。食卓食器物品は、例えば、皿、平皿、カップ、ボウルなど及びこれらに類するものであり得るがこれらに限定されない。食卓用器具は、例えば、皿、カトラリー、ナイフ、フォーク、スプーン、箸、ガラス製品、ピッチャー、ソース入れ、飲料容器など及びこれらに類するものが挙げられるがこれらに限定されない、より広い用語であり、食卓用器具物品は、食物を給仕する又は食べるためのこれらの又は同様の物品のいずれも含む。一部のこのような方法では、クリーニング組成物は、自動食器洗浄組成物又は手による食器洗浄洗剤組成物であり、クリーニングすべき物品又は対象は、食卓食器又は食卓用器具物品である。一部のこのような方法では、クリーニング組成物は、例えば、電動式洗濯洗剤組成物又は液体洗濯洗剤組成物などの洗濯洗剤組成物であり、クリーニングすべき物品は布地物品である。

10

## 【0329】

一態様では、本発明は、選択的にそれぞれクリーニング又は洗浄の必要のある布地物品の、クリーニング又は洗浄のための方法を提供する。一部のこのような方法は、プロテアーゼ変異体を含む組成物（例えば、布地又は洗濯クリーニング組成物が挙げられるがこれらに限定されない）とクリーニングする必要のある布地物品又は洗濯物品とを供給することと、布地若しくは洗濯物品を所望の程度までクリーニング又は洗浄するのに十分な若しくは有効な条件下で、この布地物品又は洗濯物品（又はクリーニングすることが所望される物品の部分）を組成物と接触させることと、を含む。

20

## 【0330】

一態様では、本発明は、選択的にクリーニングする必要のある物品若しくは表面（例えば、硬質表面）をクリーニング又は洗浄するための方法を提供し、この方法は、クリーニング若しくは洗浄すべき物品又は表面を供給することと、物品若しくは表面を所望の程度までクリーニング又は洗浄するのに、十分な時間にわたって並びに/又は十分な若しくは有効な条件下で、本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体又は少なくとも1つのこのようなプロテアーゼ変異体を含む本発明の組成物と物品若しくは表面（又はクリーニング若しくは洗浄されることが所望される物品若しくは表面の部分）を接触させることと、を含む。このような組成物としては、例えば、本発明のクリーニング組成物又は洗剤組成物（例えば、手による食器洗浄洗剤組成物、手による食器洗浄クリーニング組成物、洗濯洗剤若しくは布地洗剤若しくは洗濯若しくは布地クリーニング組成物、液体洗濯洗剤、液体洗濯クリーニング組成物、粉末洗濯洗剤組成物、粉末洗濯クリーニング組成物、自動食器洗浄洗剤組成物、洗濯促進クリーニング若しくは洗剤組成物、洗濯クリーニング添加剤及び洗濯シミ抜き組成物などが挙げられるがこれらに限定されない）が挙げられるがこれらに限定されない。一部の例では、所望される場合、特に追加のクリーニング又は洗浄が所望される場合、この方法は一回以上繰り返すことができる。例えば、一部の例では、この方法は、選択的に、物品若しくは表面を所望の程度までクリーニング又は洗浄するのに十分若しくは有効な時間にわたって、物品又は表面を少なくとも1つのプロテアーゼ変異体又は組成物と接触させたままにしておくことを更に含む。一部のこのような方法は、物品又は表面を水ですすぐことを更に含む。一部のこのような方法は、物品又は表面を、本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体又は本発明の組成物と再び接触させることと、物品若しくは表面を所望の程度までクリーニング又は洗浄するのに、十分な時間にわたって、物品又は表面を少なくとも1つのプロテアーゼ変異体又は組成物と接触させたままにしておくことと、を更に含む。一部のこのような方法では、クリーニング組成物は食器洗浄洗剤組成物であり、クリーニングすべき物品は、食卓食器又は食卓用器具物品である。一部のこのような方法では、クリーニング組成物は、自動食器洗浄組成物又は手による食器洗浄洗剤組成物であり、クリーニングすべき物品は、食卓食器又は食卓用器具物品で

30

40

50

ある。一部のこのような方法では、クリーニング組成物は洗濯洗剤組成物であり、クリーニングすべき物品は、布地物品である。

【0331】

一態様では、本発明は、自動食器洗浄機で食卓用器具又は食卓食器物品をクリーニングする方法を提供し、この方法は、自動食器洗浄機を用意することと、(例えば、機械の中の適切な又は用意されている洗剤区画若しくはディスペンサーに組成物を配置することにより)機械の中に食卓用器具又は食卓食器をクリーニングするのに十分な本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体又は本発明の組成物を含む一定量の自動食器洗浄組成物を配置することと、機械の中に食卓食器又は食卓用器具を入れることと、食卓用器具又は食卓食器物品をクリーニングするように(例えば、製造者の指示に従って)機械を操作することと、を含む。このような方法は、例えば、本明細書に記載の任意のプロテアーゼ変異体を含むがこれらに限定されない、本明細書に記載の任意の自動食器洗浄組成物を含むことができる。使用すべき自動食器洗浄組成物の量は、製造者の指示又は提案に従って容易に判定することができ、本明細書に記載の任意のものを含む本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体を含む任意の形態の自動食器洗浄組成物(例えば、液体、粉末、固体、ゲル、タブレット(tablet)など)が採用され得る。

10

【0332】

一態様では、本発明は、選択的にクリーニングする必要がある表面、物品又は対象をクリーニングするための方法を提供し、この方法は、物品若しくは表面を所望の程度までクリーニング又は洗浄するのに、十分な時間にわたって並びに/又は十分な若しくは有効な条件下で、本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体又は未希釈形態の若しくは洗浄溶液で希釈した本発明のクリーニング組成物と、物品若しくは表面(又はクリーニングされることが所望される物品若しくは表面の部分)とを接触させることを含む。表面、物品又は対象は、次に(選択的に)所望される場合、洗浄及び/又はすすがれる。本発明の目的のために、「洗浄」としては、例えば、擦ること及び機械的攪拌が挙げられるがこれらに限定されない。一態様では、クリーニング組成物は、溶液(例えば、水溶液)中に約500ppm~約15,000ppmの濃度で採用される。洗浄溶媒が水である場合、水は典型的には約5~約90の範囲であり、部位が布地を含む場合、水と布地の質量比は典型的には約1:1~約30:1である。

20

【0333】

一態様では、本発明は、洗濯機で洗濯物又は布地物品をクリーニングする方法を提供し、この方法は、洗濯機を用意することと、(例えば、機械の中の適切な又は用意されている洗剤区画若しくはディスペンサーに組成物を配置することにより)機械の中に洗濯物又は布地物品をクリーニングするのに十分な本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体を含む一定量の洗濯洗剤組成物を配置することと、機械の中に洗濯物又は布地物品を入れることと、食卓用器具又は食卓食器物品をクリーニングするように(例えば、製造者の指示に従って)機械を操作することと、を含む。このような方法は、例えば、本明細書に記載の任意のプロテアーゼ変異体を含むがこれらに限定されない、本明細書に記載の任意の洗濯洗剤組成物を含むことができる。使用すべき自動洗濯洗剤組成物の量は、製造者の指示又は提案に従って容易に計量することができ、本明細書に記載の任意のものを含む本発明の少なくとも1つのプロテアーゼ変異体を含む任意の形態の洗濯洗剤組成物(例えば、固体、粉末、液体、タブレット、ゲルなど)が採用され得る。

30

40

【0334】

第十八態様では、本発明は、クリーニングする必要がある物品、対象又は表面をクリーニングするための方法を提供し、この方法は、物品、対象又は表面を、(i)本発明の第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八若しくは第九態様の変異体(又は第三態様にあるようなポリペプチド)と、又は(ii)本発明の第十七態様の組成物と、接触させることを含む。本発明の第十八態様の方法は、物品、対象又は表面を水ですすぐことを更に含み得る。

【0335】

50

第十九態様では、本発明は、物品又は硬質表面をクリーニングするための方法を提供し、この方法は、物品若しくは硬質表面を所望の程度までクリーニング又は洗浄するのに、十分な時間にわたって並びに/又は十分な若しくは有効な条件下で、クリーニングすべき物品又は硬質表面の少なくとも一部分を、(i)本発明の第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八若しくは第九態様の変異体(又は第三態様にあるようなポリペプチド)と、又は(ii)本発明の第十七態様の組成物と、接触させることを含み、選択的に物品又は硬質表面を水ですすぐことを含む。

【0336】

第二十態様では、本発明は、表面若しくは布地を処理及び/又はクリーニングする方法を提供し、この方法は、選択的に上記表面若しくは布地を洗浄及び/又はすすぐこと、上記表面若しくは布地を(i)本発明の第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八若しくは第九態様の変異体(又は第三態様にあるようなポリペプチド)と、又は(ii)本発明の第十七態様の組成物と、接触させること、次に選択的に上記表面若しくは布地を洗浄及び/又はすすぐことを含む。

10

【0337】

洗濯及び/又は食器洗浄洗剤組成物中に含まれるがこれらに限定されない洗剤組成物中での本発明のプロテアーゼ変異体又はポリペプチドの使用が含まれる。

【0338】

追加の代表的クリーニング方法は、全体にわたって及び下記実施例にて提供される。

【0339】

20

実験

以降のパートI実施例及びパートII実施例の実験についての開示では、以下の略記が適用される：PI(性能指数)、ppm(百万分率)、M(モル濃度)、mM(ミリモル濃度)、 $\mu$ M(マイクロモル濃度)、nM(ナノモル濃度)、mol(モル)、mmol(ミリモル)、 $\mu$ mol(マイクロモル)、nmol(ナノモル)、gm(グラム)、mg(ミリグラム)、 $\mu$ g(マイクログラム)、pg(ピコグラム)、L(リットル)、ml及びmL(ミリリットル)、 $\mu$ l及び $\mu$ L(マイクロリットル)、cm(センチメートル)、mm(ミリメートル)、 $\mu$ m(マイクロメートル)、nm(ナノメートル)、U(ユニット)、V(ボルト)、MW(分子量)、sec(秒)、min(分)、h及びhr(時間)、(セルシウス度)、QS(十分量)、ND(実施せず)、rpm(毎分回転数)、GH(ドイツ硬度)、 $H_2O$ (水)、 $dH_2O$ (脱イオン水)、HCl(塩酸)、aa(アミノ酸)、bp(塩基対)、kb(キロ塩基対)、kD(キロダルトン)、cDNA(コピー又は相補的DNA)、DNA(デオキシリボ核酸)、ssDNA(単鎖DNA)、dsDNA(2本鎖DNA)、dNTP(デオキシリボヌクレオチド三リン酸)、RNA(リボ核酸)、 $MgCl_2$ (塩化マグネシウム)、NaCl(塩化ナトリウム)、w/v(体積対重量)、v/v(体積対体積)、w/w(重量対重量)、g(重さ)、OD(光学密度)、ppm(百万分率)、ダルベッコリン酸緩衝溶液(DPBS)、SOC(2%バクトトリプトン、0.5%バクト酵母抽出物、10mMのNaCl、2.5mMのKCl)、テリフィック培地(TB、12g/Lバクトトリプトン、24g/Lグリセロール、2.31g/L  $KH_2PO_4$ 、及び12.54g/L  $K_2HPO_4$ )、 $OD_{280}$ (280nmでの光学密度)、 $OD_{600}$ (600nmでの光学密度)、 $A_{405}$ (405nmでの吸光度)、Vmax(酵素触媒反応の飽和最大速度)、PAGE(ポリアクリルアミドゲル電気泳動)、PBS(リン酸緩衝生理食塩水[150mMのNaCl、10mMのナトリウムリン酸緩衝液、pH 7.2])、PBST(PBS+0.25% TWEEN(登録商標)-20)、PEG(ポリエチレングリコール)、PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)、RT-PCR(逆転写PCR)、SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)、トリス(トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン)、HEPES(N-[2-ヒドロキシエチル]ピペラジン-N-[2-エタンスルホン酸])、HBS(HEPES緩衝生理食塩水)、トリス-HCl(トリス[ヒドロキシメチル]アミノメタン-塩酸塩)、トリシン(N-[トリス-(ヒドロキシメチル)-メチル]-グリシン)、CHES(

30

40

50

2 - (N - シクロ - ヘキシルアミノ) エタン - スルホン酸)、TAPS (3 - { [ トリス  
 - (ヒドロキシメチル) - メチル ] - アミノ } - プロパンスルホン酸)、CAPS (3 -  
 (シクロ - ヘキシルアミノ) - プロパン - スルホン酸、DMSO (ジメチルスルホキシド  
 )、DTT (1, 4 - ジチオ - DL - トレイトール)、SA (シナピン酸 (s, 5 - ジメ  
 トキシ - 4 - ヒドロキシケイ皮酸)、TCA (トリクロロ酢酸)、Glut 及び GSH ( 10  
 還元グルタチオン)、GSSG (酸化グルタチオン)、TCEP (トリス [ 2 - カルボキ  
 シエチル ] ホスフィン)、Ci (キュリー)、mCi (ミリキュリー)、 $\mu$ Ci (マイク  
 ロキュリー)、HPLC (高速液体クロマトグラフィー)、RP - HPLC (逆相高速液  
 体クロマトグラフィー)、TLC (薄層クロマトグラフィー)、MALDI - TOF (マ  
 トリックス支援レーザー脱離ノイオン化法 - 飛空時間型)、Ts (トシル)、Bn (ベン  
 ジル)、Ph (フェニル)、Ms (メシル)、Et (エチル)、Me (メチル)、Taq  
 (好熱菌 (Thermus aquaticus) DNA ポリメラーゼ)、クレノウ (DNA ポリメラーゼ  
 I ラージ (クレノウ) フラグメント)、EGTA (エチレングリコール - ビス ( - ア  
 ミノエチルエーテル) N, N, N', N' - 四酢酸)、EDTA (エチレンジアミン四酢  
 酸)、bla ( - ラクタマーゼ又はアンピシリン耐性遺伝子)、HDL (強力液体)、  
 HDD (強力粉末洗剤)、HSG (高起泡顆粒洗剤)、CEE (中央及び東ヨーロッパ)  
 、WE (西ヨーロッパ)、洗剤を参照する際に使用する場合のNA (北アメリカ)、洗剤  
 を参照する際に使用する場合の日本及びJPN (日本)、MTP (マイクロタイタープレ  
 ート)、MJ Research (MJ Research, Reno, NV)、Bas  
 eclear (Baseclear BV, Inc., Leiden, The Neth  
 erlands)、PerSeptive (PerSeptive Biosystem  
 s, Framingham, MA)、ThermoFinnigan (ThermoFi  
 nnigan, San Jose, CA)、Argo (Argo BioAnalyti  
 ca, Morris Plains, NJ)、Seitz EKS (Seitz Sche  
 nk Filtersystems GmbH, Bad Kreuznach, Germ  
 any)、Pall (Pall Corp.) (East Hills, NY 及び Bad  
 Kreuznach, Germany)、Spectrum (Spectrum La  
 boratories, Dominguez Rancho, CA)、Molecula  
 r Structure (Molecular Structure Corp., Wo  
 odlands, TX)、Accelrys (Accelrys, Inc., San D  
 iego, CA)、Chemical Computing (Chemical Com  
 puting Corp., Montreal, Canada)、New Brunsw  
 ick (New Brunswick Scientific, Co., Edison,  
 NJ)、CFT (Center for Test Materials, Vlaard  
 ingen, The Netherlands)、P&G 及び Procter & Ga  
 mble (Procter & Gamble, Inc., Cincinnati, OH)  
 )、GE Healthcare (GE Healthcare, Chalfont St.  
 Giles, United Kingdom)、DNA 2.0 (DNA 2.0, Me  
 nlo Park, CA)、OXOID (Oxoid, Basingstoke, Ham  
 pshire, UK)、MegaZyme (MegaZyme Internation  
 al Ireland Ltd., Bray Business Park, Bray,  
 Co., Wicklow, Ireland)、FinnZymes (FinnZymes  
 Oy, Espoo, Finland)、Kelco (CP Kelco, Wilmin  
 gton, DE)、Corning (Corning Life Sciences, C  
 orning, NY)、NEN (NEN Life Science Products  
 , Boston, MA)、Pharma AS (Pharma AS, Oslo, Nor  
 way)、Dynal (Dynal, Oslo, Norway)、Bio - Synthe  
 sis (Bio - Synthesis, Lewisville, TX)、ATCC (Am  
 erican Type Culture Collection, Rockville  
 , MD)、Gibco/BRL (Gibco/BRL, Grand Island, NY 50

)、Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)、Pharmacia (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)、NCBI (National Center for Biotechnology Information)、Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA)、BD Biosciences 及び/又は Clontech (BD Biosciences CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA)、Operon Technologies (Operon Technologies, Inc., Alameda, CA)、MWG Biotech (MWG Biotech, High Point, NC)、Oligos Etc (Oligos Etc. Inc, Wilsonville, OR)、Bachem (Bachem Bioscience, Inc., King of Prussia, PA)、Difco (Difco Laboratories, Detroit, MI)、Mediatech (Mediatech, Herndon, VA)、Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA)、Oxoid (Oxoid Inc., Ogdensburg, NY)、Worthington (Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ)、GIBCO BRL 又は Gibco BRL (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD)、Millipore (Millipore, Billerica, MA)、Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA)、Invitrogen (Invitrogen Corp., San Diego, CA)、NEB (New England Biolabs, Beverly, MA)、Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)、Pierce (Pierce Biotechnology, Rockford, IL)、タカラ (タカラバイオ株式会社、大津、日本)、Roche (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland)、Gene Oracle (Gene Oracle, Inc., Mountain View, CA)、EM Science (EM Science, Gibbstown, NJ)、Qiagen (Qiagen, Inc., Valencia, CA)、Biodesign (Biodesign Intl., Saco, Maine)、Aptagen (Aptagen, Inc., Herndon, VA)、Sorvall (Sorvall brand, from Kendro Laboratory Products, Asheville, NC)、Molecular Devices (Molecular Devices, Corp., Sunnyvale, CA)、R&D Systems (R&D Systems, Minneapolis, MN)、Siegfried Handel (Siegfried Handel AG, Zofingen, Switzerland)、Stratagene (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA)、Marsh (Marsh Biosciences, Rochester, NY)、Geneart (Geneart GmbH, Regensburg, Germany)、Bio-Tek (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT)、(Biacore (Biacore, Inc., Piscataway, NJ)、PeproTech (PeproTech, Rocky Hill, NJ)、SynPep (SynPep, Dublin, CA)、New Objective (New Objective brand、Scientific Instrument Services, Inc., Ringoes, NJ)、Waters (Waters, Inc., Milford, MA)、Matrix Science (Matrix Science, Boston, MA)、Dionex (Dionex, Corp., Sunnyvale, CA)、Monsanto (Monsanto Co., St. Louis, MO)、Wintershall (Wintershall AG, Kassel, Germany)、BASF (BASF Co., Florham Park, NJ)

10

20

30

40

50



、Huntsman (Huntsman Petrochemical Corp., Salt Lake City, UT)、Shell Chemicals (Shell Chemicals, Inc., London, UK)、Stepan (Stepan, Northfield, IL)、Clariant (Clariant, Sulzbach, Germany)、Industrial Zeolite (Industrial Zeolite Ltd., Grays, Essex, UK)、Jungbunzlauer (Jungbunzlauer, Basel, Switzerland)、Solvay (Solvay, Brussels, Belgium)、3V Sigma (3V Sigma, Bergamo, Italy)、Innospec (Innospec, Ellesmere Port, UK)、Thermphos (Thermphos, Vlissingen-Ost, The Netherlands)、Ciba Specialty (Ciba Specialty Chemicals, Basel, Switzerland)、Dow Corning (Dow Corning, Barry, UK)、Enichem (Enichem Iberica, Barcelona, Spain)、Fluka Chemie AG (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland)、Gist-Brocades (Gist-Brocades, NV, Delft, The Netherlands)、Dow Corning (Dow Corning Corp., Midland, MI)、Mettler-Toledo (Mettler-Toledo Inc, Columbus, OH)、RB (Reckitt-Benckiser, Slough, UK)、及びMicrosoft (Microsoft, Inc., Redmond, WA)。

10

20

**【0340】**

本明細書に適用されている例示の洗剤組成物では、酵素濃度は、総組成物の重量に基づいて純粋な酵素により表され、特に指定しない限り、洗剤成分は総組成物の重量に基づいて表される。ここで略された構成成分の名称は、以下の意味を有する：

【表 2 - 1】

略称	成分
LAS	: 直鎖 $C_{11\sim 13}$ アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム
NaC16~17HSAS	: $C_{16\sim 17}$ 高可溶性アルキル硫酸ナトリウム
TAS	: 牛脂アルキル硫酸ナトリウム
C <sub>xy</sub> AS	: $C_{1x}\sim C_{1y}$ アルキル硫酸ナトリウム
C <sub>xy</sub> EZ	: 平均2モルのエチレンオキシドと縮合した $C_{1x}\sim C_{1y}$ の主に直鎖第一級アルコール
C <sub>xy</sub> AEZS	: 平均2モルのエチレンオキシドと縮合した $C_{1x}\sim C_{1y}$ アルキル硫酸ナトリウム。実施例において分子名を加える。
非イオン性	: 3, 8の平均エトキシル化度と4, 5の平均プロポキシル化度を有するアルコールである例えば、Plurafac LF404といった混合エトキシル化/プロポキシル化脂肪族アルコール。
QAS	: $R_2\cdot N^+(CH_3)_2(C_2H_4OH)$ 、但し、 $R_2=C_{12}\sim C_{14}$
ケイ酸塩	: 非晶質ケイ酸ナトリウム ( $SiO_2:Na_2O$ 比=1.6~3.2:1)
メタケイ酸塩	: メタケイ酸ナトリウム ( $SiO_2:Na_2O$ 比=1.0)
ゼオライトA	: 式 $Na_{12}(AlO_2SiO_2)_{12}\cdot 27H_2O$ の水和アルミノケイ酸塩
SKS-6	: 式 $\delta-Na_2Si_2O_5$ の結晶質層状ケイ酸塩
硫酸塩	: 無水硫酸ナトリウム
STPP	: トリポリリン酸ナトリウム
MA/AA	: 4:1アクリレート/マレエートのランダムコポリマー、平均分子量約70,000~80,000
AA	: 平均分子量(MW)4,500のポリアクリル酸ナトリウムポリマー
ポリカルボキシレート	: BASFから市販されている、MW4,500のアクリル酸コポリマーであるSokolanなどの、2,000~80,000の分子量範囲を有するアクリレート、マレエート及びメタクリレート(methacrylate)などのカルボキシル化モノマーの混合物を含むコポリマー
BB1	: 3-(3,4-ジヒドロイソキノリニウム)プロパンスルホネート
BB2	: 1-(3,4-ジヒドロイソキノリニウム)-デカン-2-サルフェート
PB1	: 過ホウ酸ナトリウム-水和物
PB4	: 公称式 $NaBO_3\cdot 4H_2O$ の過ホウ酸ナトリウム四水和物
過炭酸塩	: 公称式 $2Na_2CO_3\cdot 3H_2O_2$ の過炭酸ナトリウム
TAED	: テトラアセチルエチレンジアミン
NOBS	: ナトリウム塩の形態のノナノイルオキシベンゼンスルホネート
DTPA	: ジエチレントリアミン五酢酸
HEDP	: 1,1-ヒドロキシエタンジホスホン酸
DETPMP	: Monsantoにより商品名Dequest 2060で市販されているジエチルトリアミンペンタ(メチレン)ホスホネート
EDDS	: エチレンジアミン-N, N'-ニコハク酸、そのナトリウム塩の形態の(S, S)異性体
ジアミン	: ジメチルアミノプロピルアミン; 1,6-ヘザン(heezane)ジアミン; 1,3-プロパンジアミン; 2-メチル-1,5-ペンタンジアミン; 1,3-ペンタンジアミン; 1-メチル-ジアミノプロパン
DETBCHD	: 5,12-ジエチル-1,5,8,12-テトラアザビシクロ[6,6,2]ヘキサデカン, ジクロリド, Mn(II)塩
PAAC	: ペンタアミン酢酸コバルト(III)塩
パラフィン	: Wintershallにより商品名Winog 70で販売されているパラフィン油
パラフィンスルホネート	: 一部の水素原子がスルホネート基により置換されたパラフィン油又はワックス

10

20

## 【表 2 - 2】

(上記表の続き)

略称	成分
アルドースオキシダーゼ	: Novozymes A/Sにより商品名Aldose Oxidaseで販売されているオキシダーゼ酵素
ガラクトースオキシダーゼ	: Sigmaからのガラクトースオキシダーゼ
nprE	: 枯草菌 (Bacillus subtilis)により発現される中性メタロプロテアーゼの組み換え形態 (国際公開第07/044993号を参照されたい)
PMN	: パテルス・アミロリケファシエンス (Bacillus amyloliquefaciens)由来の精製された中性メタロプロテアーゼ
アミラーゼ	: 国際公開第94/18314号、同第96/05295号に記載され、Genencorにより販売されている、商品名PURAFECT(登録商標)Oxで販売されているもの;すべてNovozymes A/Sから入手可能なNATALASE(登録商標)、TERMAMYL(登録商標)、FUNGAMYL(登録商標)及びDURAMYL(商標)などの、好適なデンプン分解酵素。
リパーゼ	: Novozymes A/Sにより商品名LIPEX(登録商標)、LIPOLASE(登録商標)、LIPOLASE(登録商標)Ultraで販売されているもの及びGist-Brocadesにより商品名Lipomax(商標)で販売されているものなどの好適な脂肪分解酵素。
セルラーゼ	: Novozymes A/Sにより商品名CAREZYME(登録商標)、CELLUZYME(登録商標)及び/又はENDOLASE(登録商標)で販売されているものなどの好適なセルロース分解酵素。
ペクチンリアーゼ	: Novozymes A/Sから入手可能な商品名XPECT(登録商標)、PECTAWAY(登録商標)及びPECTAWASH(登録商標)で販売されているものなどの好適なペクチンリアーゼ。
PVP	: 平均分子量60,000を有するポリビニルピロリドン
PVNO	: 平均分子量50,000を有するポリビニルピリジン-N-酸化物
PVPVI	: 平均分子量20,000を有する、ビニルイミダゾールとビニルピロリドンのコポリマー
増白剤1	: ニナトリウム4,4'-ビス(2-スルホステリル)ピフェニル
シリコーン消泡剤	: 分散剤としてシロキサン-オキシアルキレンコポリマーを有するポリジメチルシロキサン発泡制御剤。上記発泡制御剤と上記分散剤の比は、10:1~100:1である。
抑泡剤	: 顆粒形態で、12%シリコーン/シリカ、18%ステアリルアルコール、70%デンプン
SRP 1	: アニオンで末端封鎖されたポリエステル
PEG X	: 分子量xのポリエチレングリコール
PVP K60(登録商標)	: ビニルピロリドンホモポリマー(平均MW 160,000)
Jeffamine(登録商標)ED-2001	: Huntsmanからの末端保護されたポリエチレングリコール
Isachem(登録商標)AS	: Enichemからの分枝鎖アルコールアルキルサルフェート
MME PEG(2000)	: Fluka Chemie AGからのモノメチルエーテルポリエチレングリコール(MW 2000)
DC3225C	: Dow Corningからのシリコーン油とシリカの混合物である、シリコーン発泡抑制剤
TEPAE	: テトラエチレンペンタミンエトキシレート
BTA	: ベンゾトリアゾール
ベタイン	: $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$
砂糖	: 産業グレードD-ブドウ糖又は食品グレード砂糖
CFAA	: $\text{C}_{12}\sim\text{C}_{14}$ アルキルN-メチルグルカミド
TPKFA	: $\text{C}_{12}\sim\text{C}_{14}$ の抜頭全留分脂肪酸
粘土	: 一般式 $\text{Al}_2\text{O}_3\cdot\text{SiO}_2\cdot x\text{H}_2\text{O}$ の水和ケイ酸アルミニウム。タイプ:カオリナイト、モンモリロナイト、アタパルジャイト、イライト、ベントナイト、ハロイサイト
pH	: 20°Cにて蒸留水中1%溶液として測定

10

20

## 【0341】

(上記表の続き)

30

北アメリカ (NA) 及び西ヨーロッパ (WE) の強力液体洗濯 (HDL) 洗剤に関しては、予め計量した液体洗剤 (ガラス瓶内) を、95 のウォーターバスに2時間にわたって配置することで、市販の洗剤中に存在する酵素の加熱不活性化を実施する。NA及びWEの自動食器洗浄 (ADW: auto dish washing) 洗剤を加熱不活性化するためのインキュベーション時間は8時間である。不活性化率を正確に測定するために、未加熱及び加熱洗剤のどちらも、洗剤を溶解させて5分以内にアッセイにする。酵素活性はAAPFアッセイにより試験する。

## 【0342】

加熱不活性化した洗剤の酵素活性の試験に関しては、洗剤の希釈標準溶液は加熱不活性化母液から調製した。所望の条件に一致するよう、適切な水硬度 (例えば、6 gpg又は12 gpg) 及び緩衝剤を洗剤溶液に加える。瓶をボルテックスにかけるか反転させるかして溶液を混合する。以下の表は本明細書で使用される市販の洗剤及び試験条件の一部についての情報を提供する。一部の試験では、追加の及び/又は他の市販の洗剤が以下の実施例で使用されることが見出される。

40

【表 3】

地域	形態	用量	洗剤*	緩衝剤	gpg	pH	T(°C)
洗濯用(強力液体及び顆粒洗剤)							
NA	HDL	0.78g/L	P&G TIDE(登録商標)2X	5mM HEPES	6	8.0	20
WE	HDL	5.0g/L	Henkel PERSIL(商標)	5mM HEPES	12	8.2	40
WE	HDG	8.0g/L	P&G ARIEL(登録商標)	2mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	12	10.5	40
JPN	HDG	0.7g/L	P&G TIDE(登録商標)	2mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	6	10.0	20
NA	HDG	1.0g/L	P&G TIDE(登録商標)	2mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	6	10.0	20
自動食器洗浄							
WE	ADW	3.0g/L	RB CALGONIT(商標)	2mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	21	10.0	40
NA	ADW	3.0g/L	P&G CASCADE(登録商標)	2mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	9	10.0	40

10

## 【0343】

一部の更なる態様では、以下の溶液の使用が見出される：

【表 4】

界面活性剤	温度(C)	界面活性剤 g/L	pH	緩衝剤	gpg
TIDE(登録商標)2X Cold	16	0.98	8	5mM HEPES	6
TIDE(登録商標)2X Cold	32	0.98	8	5mM HEPES	6
TIDE(登録商標)2X Cold	16	0.98	7	5mM MOPS	6

20

## 【0344】

実施例は純粋に本発明の例示を目的とするものであり、したがって、決して本発明を限定することを意図するものではなく、また、本発明の上記の態様及び実施形態を記載し、詳述するものである。前述の実施例及び発明を実施するための形態は、実例として提供されるものであり、制限を目的とするものではない。

30

## 【0345】

パート I  
洗剤の表

パート I 実施例のアッセイで使用される洗剤の組成を表 1 - 3 に示す。BPN' 変異体タンパク質サンプルを、パート I 実施例 1 に記載のような洗剤組成物に添加して、様々な試験特性についてアッセイした。

## 【0346】

以下は、タテ型 (top-loading) 自動洗濯機に好適な液体洗濯洗剤組成物 (1、2 及び 4) 並びにドラム式 (front loading) 洗濯機に好適な液体洗濯洗剤組成物 (3) である。

40

【表 5】

成分	組成 (組成物の重量%)			
	1	2	3	4
C <sub>12~15</sub> アルキルエトキシ(1.8)サルフェート	14.7	11.6		16.31
C <sub>11.8</sub> アルキルベンゼンスルホネート	4.3	11.6	8.3	7.73
C <sub>16~17</sub> 分枝鎖アルキルサルフェート	1.7	1.29		3.09
C <sub>12~14</sub> アルキル-9-エトキシレート	0.9	1.07		1.31
C <sub>12</sub> ジメチルアミノオキッド	0.6	0.64		1.03
クエン酸	3.5	0.65	3	0.66
C <sub>12~18</sub> 脂肪酸	1.5	2.32	3.6	1.52
ホウ酸ナトリウム(ホウ砂)	2.5	2.46	1.2	2.53
C <sub>12~14</sub> アルキルエトキシ三硫酸ナトリウム			2.9	
C <sub>14~15</sub> アルキル7-エトキシレート			4.2	
C <sub>12~14</sub> アルキル7-エトキシレート			1.7	
ギ酸カルシウム	0.09	0.09		0.09
次の一般構造:ビス((C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O)(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub> )(CH <sub>3</sub> )-N <sup>+</sup> -C <sub>x</sub> H <sub>2x</sub> -N <sup>+</sup> -(CH <sub>3</sub> )- ビス((C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O)(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub> )(式中、nは20~30であり、xは3~8である)を有する化合物、又は このサルフェート化若しくはスルホネート化変異体			1.2	
ランダムグラフトコポリマー <sup>1</sup>		1.46	0.5	
エトキシ化ポリエチレンイミン <sup>2</sup>	1.5	1.29		1.44
ジエチレントリアミン五酢酸	0.34	0.64		0.34
ジエチレントリアミンペンタ(メチレンホスホン酸)			0.3	
Tinopal AMS-GX		0.06		
Tinopal CBS-X	0.2	0.17		0.29
両親媒性アルコキシル化グリースクリーニングポリマー <sup>3</sup>	1.28	1	0.4	1.93
エタノール	2	1.58	1.6	5.4
プロピレングリコール	3.9	3.59	1.3	4.3
ジエチレングリコール	1.05	1.54		1.15
ポリエチレングリコール	0.06	0.04		0.1
モノエタノールアミン	3.05	2.41	0.4	1.26
NaOH	2.44	1.8		3.01
クメンスルホン酸ナトリウム			1	
ギ酸ナトリウム		0.11		0.09
水、審美剤(染料、香料)及び微量成分(酵素、溶媒、構造剤)	残部	残部	残部	

【0347】

<sup>1</sup> ランダムグラフトコポリマーは、ポリエチレンオキッド主鎖と複数のポリビニルアセテート側鎖とを有する、ポリビニルアセテートグラフト化ポリエチレンオキッドコポリマーである。ポリエチレンオキッド主鎖の分子量は約6000であり、ポリエチレンオキッドとポリビニルアセテートとの重量比は約40:60であり、50個のエチレンオキッド単位当たりのグラフト点は1以下である。

【0348】

<sup>2</sup> -NHにつき20個のエトキシル基を有するポリエチレンイミン(MW=600)

【0349】

<sup>3</sup> 両親媒性アルコキシル化グリースクリーニングポリマーは、-NHにつき24個のエトキシル基、及び-NHにつき16個のプロポキシル基を有するポリエチレンイミン(MW=600)である。

【0350】

パートI 実施例

【実施例】

【0351】

(実施例1)

10

20

30

40

50

### アッセイ

以下に示されるような様々なアッセイを用いた。以下に提供されるプロトコルからの任意の派生が、続く実施例に示される。

#### 【0352】

A. 96ウェルマイクロタイタープレートでタンパク質含量を測定するためのTCAアッセイ。

#### 【0353】

BPN'及びBPN'変異体に関し、このアッセイは、33~37にて、加湿エアレーション下で、230~250rpmで振盪させながら3~4日増殖させた、マイクロタイタープレートの、枯草菌(*B. subtilis*)細菌培養上清の濾過物を用いて開始した。新しい96ウェルの平底マイクロタイタープレート(MTP)をアッセイに使用した。最初に、100µL/ウェルの0.25N HClを各ウェルに配置した。次いで、培養ブロス濾過物25µLを加えた。次いで、「ブランク」読み取り値を得るために、405nmで光散乱/吸光度(プレートリーダーの5秒混合モードを使用)を測定した。試験のため、100µL/ウェルの30%(w/v)トリクロロ酢酸(TCA)をプレートに配置し、室温で10分にわたってインキュベートした。次いで、405nmでの光散乱/吸光度(プレートリーダーの5秒混合モードを使用)を測定した。装置はBiomek FXロボット(Beckman Coulter)及びSpectraMAX(340型、Molecular Devices)MTPリーダーを使用した。MTPはCostarから得た(9017型)。

#### 【0354】

計算は、TCAを用いる試験読み取り値から、ブランク(TCA不使用)を減算することで実施され、サンプル中のタンパク質含量が相対的に測定された。必要に応じて、既知の変換係数を用い、クローンのAAPFアッセイにより、TCA読み取り値を較正することで、検量線を生成することができる。しかしながら、TCA結果は1mLあたり250~2500マイクログラムのタンパク質濃度(ppm)に対して直線であることから、良好に機能する変異体を選択するために、酵素性能に対して直接プロットすることができる。サンプルの濁度/光散乱は、培養上清中の沈殿し得る合計タンパク質の量に相関して増加する。

#### 【0355】

B. 96ウェルマイクロタイタープレートでのAAPFプロテアーゼアッセイ  
本発明のプロテアーゼ及び変異体のプロテアーゼ活性を測定するために、N-スクシニル-L-アラニル-L-アラニル-L-プロリル-L-フェニル-p-ニトロアニリド(suc-AAPF-pNA)の加水分解を計測した。使用した試薬溶液は、以下のものであった: 0.005%のTWEEN(登録商標)-80を含有している100mMのトリス/HCl(pH 8.6)(トリス希釈緩衝液)、10mMのCaCl<sub>2</sub>及び0.005%のTWEEN(登録商標)-80を含有している100mMトリス緩衝液(pH 8.6)(トリス/Ca緩衝液)、並びに160mMのsuc-AAPF-pNA/DMSO(suc-AAPF-pNA保存溶液)(Sigma:S-7388)。suc-AAPF-pNA希釈標準溶液を調製するために、1mLのsuc-AAPF-pNA原液を100mLのトリス/Ca緩衝液に加え、少なくとも10秒にわたってウェルをよく混合した。10µLの希釈プロテアーゼ溶液を各ウェルに加え、直ちに1mg/mLのsuc-AAPF-pNA希釈標準溶液190µLを加えてアッセイを実施した。溶液を5秒にわたって混合し、吸光度の変化を、25にて、405nmで、MTPリーダーの動的解析モードにより読み取りした(5分毎に25回読み取り)。プロテアーゼ活性はAUとして表記される(活性 = OD · min<sup>-1</sup> ml<sup>-1</sup>)。

#### 【0356】

##### C. BMI微小標本アッセイ

血液、ミルク及びインク(BMI)のシミをつけた、直径5.5ミリメートルの円形微小標本をCFTから得た。標本を切りだす前に、布地(EMPA 116)を水で洗浄し

10

20

30

40

50

た。96ウェル非結合マイクロタイタープレート(Corning 3641)の各ウェルに微小標本を1つずつ配置した。アッセイに使用した洗剤には、洗剤組成物1、洗剤組成物2及び洗剤組成物4が含まれた。洗剤をミリQ(脱イオン)水で濃度0.788g/Lの使用強度に希釈した。5mMのHEPES(pH 8.2又はpH 7.2)を洗剤に加えることで、これらの洗剤をそれぞれpH 8又はpH 7に緩衝化させた。更に、ガロンあたり6グレイン(gpg)の硬度の水(3:1のCa:Mg-CaCl<sub>2</sub>:MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O)を添加した。洗剤溶液を、16でのアッセイのためにアイスウォーターバスで(32でのアッセイのためには室温で)予め平衡化し、循環リザーバ(Beckman FX)に注入した。次いで、微小標本を含有しているMTPの各ウェルに所望の洗剤溶液190µLを加えた。この混合物に、酵素を希釈した10µLのマスター希釈溶液を加え、酵素濃度をおよそ0.4~0.5µg/mLにした。マスター希釈物は培養上清から8µg/mLで調製されており、ここで、培養上清及びBPN'-v3又はBPN'-v36親対照の、およその酵素濃度は、既知の濃度の精製BPN'-v3又はBPN'-v36標準の濃度に基づいて、AAPFプロテアーゼ活性アッセイを用いて判定した。MTPをテープでシールし、冷蔵保管されるサンプルの場合16に予め設定した、又は卓上のサンプルの場合32に予め設定したiEMS恒温器/振盪機(Termo/Labsystems)内に、1400rpmで撹拌しながら20分間定置した。適切な条件下でのインキュベーション後、各プレートからシーリングテープを取り外し、各ウェルから125µLの溶液(より少量を選別するため手作業によりピペット操作を行う場合には150µL)を新しいMTP(Corning 9017)に移した。125µL~150µLの溶液/ウェルを含有させた新しいMTPを、MTP SpectraMaxリーダー(340型、Molecular Devices)を用い、600nmで(5秒混合モードのプレートリーダーにより)読み取りした。ブランク対照には微小標本及び洗剤は含有させたが、酵素は含有させなかった。得られた吸光度値をブランク値(酵素を除く基質)について補正し、加水分解活性を測定した。各サンプル(変異体)に関し、性能指数を以下に記載するように算出した。60°F(16)及びpH 8にて実施するこのBMI微小標本アッセイを、本明細書では「試験方法」として参照する。

#### 【0357】

##### D. 卵微小標本アッセイ

色素含むCS38時効処理卵黄でシミを付けた直径5.5ミリメートルの円形綿微小標本をCFTから得た。これらの標本は、水で予めすすがなかった。96ウェル非結合マイクロタイタープレート(Corning 3641)の各ウェルに微小標本を1つずつ配置した。洗剤組成物4をミリQ(脱イオン)水で濃度0.788g/Lの使用強度に希釈した。5mMのHEPES(pH 8.2)を洗剤に加えることで、この洗剤をpH 8に緩衝化させた。更に、ガロンあたり6グレイン(gpg)の硬度の水(3:1のCa:Mg-CaCl<sub>2</sub>:MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O)を添加した。洗剤溶液を、16でのアッセイのためにアイスウォーターバスで(32でのアッセイのためには室温で)予め平衡化し、循環リザーバ(Beckman FX)に注入した。次いで、微小標本を含有しているMTPの各ウェルに185µLの所望の洗剤溶液を添加した。この混合物に、酵素を希釈した15µLのマスター希釈溶液を加え、反応液中の酵素濃度をおよそ0.6µg/mLにした。マスター希釈物は培養上清から8µg/mLで調製されており、ここで、培養上清及びBPN'-v3又はBPN'-v36親対照の、およその酵素濃度は、既知の濃度の精製BPN'-v3又はBPN'-v36標準の濃度に基づいて、AAPFプロテアーゼ活性アッセイを用いて判定した。MTPをテープでシールし、冷蔵保管されるサンプルの場合16に予め設定した、又は卓上のサンプルの場合32に予め設定したiEMS恒温器/振盪機(Termo/Labsystems)内に、1400rpmで撹拌しながら30分間定置した。適切な条件下でのインキュベーション後、各プレートからシーリングテープを取り外し、各ウェルから125µLの溶液(より少量を選別するため手作業によりピペット操作を行う場合には150µL)を新しいMTP(Corning 9017)に移した。125µL~150µLの溶液/ウェルを含有させた新しいMTP

10

20

30

40

50

を、MTP SpectraMaxリーダー(340型、Molecular Devices)を用い、405nmで(5秒混合モードのプレートリーダーにより)読み取りした。ブランク対照には微小標本及び洗剤は含有させたが、酵素は含有させなかった。得られた吸光度値をブランク値(酵素を除く基質)について補正し、加水分解活性を測定した。各サンプル(変異体)に関し、性能指数を以下に記載するように算出した。

#### 【0358】

##### E. 植物微小標本アッセイ

WarwickからWarwick Equestの植物を擦りつけた織布綿標本を得た。これらの標本は、96ウェル非結合マイクロタイタープレート(Corning 3641)の各ウェルに1つの微小標本を配置する特注96ウェル押し抜き機を用いて、5.5ミリメートル直径の円形微小標本に切断された。標本の切断後、この布地を、水で希釈した50%使用強度の洗剤組成物4をウェルあたり100 $\mu$ L用いてウェルの中で洗浄した(予洗いした)。100 $\mu$ Lの50%の洗剤予洗い液により20分間予洗いした後、予洗い液を手操作により注意深くピペティングして除去した。洗剤組成物4をミリQ(脱イオン)水で濃度0.788g/Lの使用強度に希釈した。5mMのHEPES(pH 8.2)を洗剤に加えることで、これらの洗剤をpH 8に緩衝化させた。更に、ガロンあたり6グレイン(gpg)の硬度の水(3:1のCa:Mg-CaCl<sub>2</sub>:MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O)を添加した。洗剤溶液を、16でのアッセイのためにアイスウォーターバスで(32でのアッセイのためには室温で)予め平衡化した。次に、予洗いの完了後、直ちに180 $\mu$ Lの所望の洗剤溶液を、微小標本を含有するMTPの各ウェルに添加した。この混合物に、希釈した酵素のマスター希釈液を20 $\mu$ L加え、反応時酵素濃度をおよそ0.8 $\mu$ g/mLにした。マスター希釈物は培養上清から8 $\mu$ g/mLで調製されており、ここで、培養上清及びBPN'-v36親対照の、およその酵素濃度は、既知の濃度の精製BPN'-v36標準の濃度に基づいて、AAPFプロテアーゼ活性アッセイを用いて判定した。MTPをテープでシールし、冷蔵保管されるサンプルの場合16に予め設定した、又は卓上のサンプルの場合32に予め設定したiEMS恒温器/振盪機(Thermo/Labsystems)内に、1400rpmで撹拌しながら30分間定置した。適切な条件下でのインキュベーション後、各プレートからシーリングテープを取り外し、各ウェルから125 $\mu$ Lの溶液(より少量を選別するため手作業によりピペット操作を行う場合には150 $\mu$ L)を新しいMTP(Corning 9017)に移した。125 $\mu$ L~150 $\mu$ Lの溶液/ウェルを含有させた新しいMTPを、MTP SpectraMaxリーダー(340型、Molecular Devices)を用い、430nm及び670nmの両方で(5秒混合モードのプレートリーダーにより)読み取りした。ブランク対照には微小標本及び洗剤は含有させたが、酵素は含有させなかった。得られた吸光度値をブランク値(酵素を除く基質)について補正し、加水分解活性を測定した。各サンプル(変異体)に関し、性能指数を以下に記載するように算出した。

#### 【0359】

##### F. 安定性アッセイ

水に希釈した40%の濃洗剤組成物3の存在下で、プロテアーゼ変異体の安定性を測定した。試薬は、ミリQ水で50%に希釈した洗剤組成物3、10mMのMES 0.01% TWEEN(登録商標)-80(pH 5.8)マスター希釈緩衝液、AAPF試薬を使用した: AAPFアッセイのプロトコルを参照されたい。装置は、希釈酵素を洗剤に希釈するための平底MTP(Corning 9017)、並びにsuc-AAPF-pNAプレート、Biomek FX(Beckman Coulter)、Spectramax Plus 384 MTPリーダー(Molecular Devices)、iEMS恒温器/振盪機(1mm振幅)(Thermo Electron Corporation)、シーリングテープ: Nunc(236366)、循環リザーバ(Beckman Fx)を使用した。

#### 【0360】

まず始めに洗剤組成物3を水で50%に希釈する。この洗剤を室温に維持し、循環リザ

10

20

30

40

50



ーバを循環させた。iEMS恒温器/振盪機(Thermo/Labsystems)を予め43に設定した。マスター希釈緩衝液を含有させたプレートで、培養上清を約20ppmの濃度に希釈した(マスター希釈プレート)。次いで、50%洗剤組成物3を160 $\mu$ L含有しているプレートに、マスター希釈プレートから40 $\mu$ Lのサンプルを加え、最終インキュベーション濃度4ppmを得た。含有物を混合し、室温で維持し、これらのプレートで三組AAPFアッセイを直ちに実施して、ストレス負荷していない読み取り値として記録した。上記工程のサンプル20 $\mu$ Lを190 $\mu$ Lのsuc-AAPF-pNA希釈標準溶液に加えるようAAPFアッセイを改変した。プレートを直ちにシーリングテープで覆い、43のiEMS震盪機に、650rpmにて30分の間配置した。30分間インキュベーションした後、これらのストレス負荷プレートで三組AAPFアッセイを実施し、ストレス負荷した場合の読み取り値を記録した。次のように残留及び開始AAPF比を算出することにより、サンプルの安定性を測定した：残効性(%) = [mOD $\cdot$ min<sup>-1</sup>ストレス負荷] \* 100 / [mOD $\cdot$ min<sup>-1</sup>ストレス未負荷] 各サンプル(変異体)に関し、性能指数を以下に記載するように算出した。

10

## 【0361】

## G.LAS/EDTA安定性アッセイ

代表的なアニオン性界面活性剤(LAS = 直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩、具体的には、ドデシルベンゼン硫酸ナトリウムDOBS)及びEDTA二ナトリウムの存在下でのプロテアーゼ変異体の安定性を、所定の条件下でのインキュベーション後に測定し、AAPFアッセイを用いて残効性を測定した。試薬は、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム塩(DOBS, Sigma No. D-2525)、TWEEN(登録商標) - 80 (Sigma No. P-8074)、EDTA二ナトリウム(Siegfried Handel No. 164599-02)、HEPES(Sigma No. H-7523)、未負荷緩衝液：50mMのHEPES(11.9g/L) + 0.005% TWEEN(登録商標) - 80(pH 8.0)、負荷緩衝液：50mMのHEPES(11.9g/L)、0.1%(w/v)DOBS(1g/L)、10mMのEDTA(3.36g/L)(pH 8.0)、参照プロテアーゼ及びプロテアーゼ変異体培養上清(200~400 $\mu$ g/mLのタンパク質を含有)を使用した。装置は、希釈プレートとしてV又はU底MTP(それぞれGreiner 651101及び650161)、未負荷及びLAS/EDTA緩衝液用平底MTP(Corning 9017)、並びにsuc-AAPF-pNAプレート、Biomek FX(Beckman Coulter)、Spectramax Plus 384 MTPリーダー(Molecular Devices)、iEMS恒温器/振盪機(1mm振幅)(Thermo Electron Corporation)、及びNuncシーリングテープ(236366)を使用した。

20

30

## 【0362】

iEMS恒温器/振盪機(Thermo/Labsystems)は29に設定した。培養上清を、未負荷緩衝液を含有しているプレートで約25ppm濃度に希釈した(マスター希釈プレート)。次いで、マスター希釈プレートから、20 $\mu$ Lのサンプルを、未負荷緩衝液を180 $\mu$ L含有しているプレートに加え、最終インキュベーション濃度2.5ppmを得た。含有物を混合し、室温で維持し、このプレートでAAPFアッセイを実施した。次いで、マスター希釈プレートから、20 $\mu$ Lのサンプルを、180 $\mu$ L負荷緩衝液(50mMのHEPES(11.9g/L)、0.1%(w/v)DOBS(1g/L)、10mMのEDTA(3.36g/L)(pH 8.0))を含有しているプレートに加えた。溶液を混合し、直ちに、29のiEMS震盪機に400rpmで30分間配置した。30分間インキュベーションした後、AAPFアッセイを負荷プレートで実施した。次のように残留及び開始AAPF比を算出することにより、サンプルの安定性を測定した：残効性(%) = [mOD $\cdot$ min<sup>-1</sup>ストレス負荷] \* 100 / [mOD $\cdot$ min<sup>-1</sup>ストレス未負荷] 各サンプル(変異体)に関し、性能指数を以下に記載するように算出した。

40

50

## 【0363】

## 性能指数

性能指数により、同じタンパク質濃度下での変異体の性能（実測値）と標準又は参照プロテアーゼ酵素の性能（理論値）との比較が得られる。理論値は、標準/参照プロテアーゼの性能 - 用量応答曲線（performance dose response curve）のパラメーターを用いて（すなわちラングミュア等式を用いて性能曲線を生成することで）算出することができる。性能指数（ $PI$ ）が1超（ $PI > 1$ ）の場合は、標準又は参照プロテアーゼ（例えば、野生型プロテアーゼ又はその他のプロテアーゼ変異体であり得る）と比較したときに、変異体がより良好なものであることが特定され、一方で $PI$ が1（ $PI = 1$ ）である場合は、変異体が標準又は参照プロテアーゼと同様に機能することが特定され、及び $PI$ が1未

10

## 【0364】

参照又は標準プロテアーゼよりも性能指数の値が小さい本発明のプロテアーゼ変異体は、値の小ささにも関わらず本明細書に記載の用途及び方法で有用であることに留意することが重要である。例えば、タンパク質分解活性を有する参照又は標準プロテアーゼよりも性能指数が低い本発明のプロテアーゼ変異体は、本発明の組成物、例えば限定するものではないが、例えば、様々な表面及び物品（例えば、洗濯物、布地、及び食卓用食器類、及びパーソナルケア用品及び組成物が含まれるが挙げられるがこれらに限定されない）などをクリーニングするためのクリーニング組成物（限定するものではないが、例えば、洗剤クリーニング組成物が挙げられる）並びにパーソナルケア用適用物及び本明細書に記載されるような組成物に使用するのに有用であり、このようなプロテアーゼ変異体は、同様に本明細書に記載される布地ケア製品及びホームケア製品及び組成物、並びに布地ケア及びホームケア用ではない製品及び組成物、並びに本発明の方法（限定するものではないが、例えば、本明細書に記載されるクリーニング方法、パーソナルケアの方法など）にも有用である。

20

## 【0365】

以下に示される様々な用語は変異体を記載するために使用される：有害でない変異体は $PI > 0.05$ であり、有害な変異体は $PI$ が $0.05$ 以下であり、組み合わせ可能な変異体は少なくとも1つの特性について性能指数が $0.2$ 以上であり、すべての特性について $> 0.05$ である。組み合わせ可能な変異体は、1つ以上の所望の特性について適切な性能指数を有する送達タンパク質と組み合わせることができる。これらのデータは、任意のスプチリシン/サブチラーゼ又はプロテアーゼを設計するために使用される。サブチラーゼ又はプロテアーゼが、1つ以上の特定の位置でスプチリシンBPN'と異なるアミノ酸を有するように設計された場合でさえも、これらのデータは、BPN'野生型アミノ酸の置換を含む最良の置換の選択を特定することにより、所望の特性を変更するアミノ酸置換を特定するのに使用される。

30

40

## 【0366】

## （実施例2）

BPN'ライブラリの構築及びBPN'変異体のクリーニング性能

## a) ライブラリ構築に使用されるBPN' - v3発現カセットの説明

コンビナトリアルライブラリの構築に使用されるBPN' - v3（G097A - G128A - Y217Q置換を含有するBPN'プロテアーゼ）発現カセットは、apRE - BPN'ハイブリッドリーダー配列（すなわち、シグナル配列）、パチルス・アミロリケファシエンス（*B. amyloliquefaciens*）由来のBPN'プロ及びBPN'成熟配列を含む、BPN'発現カセットを用いて作成された。DNA配列を以下に配列番号1として示し、BPN'前駆タンパク質をコードしている配列を以下に配列番号168として示す。

50

## 【配列表 1】

【0367】

GTGAGAAGCAAAAAATTGTGGATCAGTTTGCTGTTTGCTTTAGCGTTAATCTTTACGATGGC  
 GTTCGGCAGCACATCCTCTGCCAGGCGGCAGGGAAAATCAAACGGGGAAAAGAAATATATT  
GTCCGGTTTAAACAGACAATGAGCACGATGAGCGCCGCTAAGAAGAAAGATGTCATTTCTG  
AAAAAGGCGGGAAAGTGCAAAAGCAATTCAAATATGTAGACGCAGCTTCAGCTACATTA  
CGAAAAAGCTGTAAAAGAATTGAAAAAGACCCGAGCGTTCGCTTACGTTGAAGAAGATCAC  
GTAGCACATGCGTACGCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAAATTAAGCCCCTGC  
 TCTGCACTCTCAAGGCTACACTGGATCAAATGTTAAAGTAGCGGTTATCGACAGCGGT  
 ATCGACTCGAGCCATCCAGATCTTAAAGTCGCTGGAGGGGCTTCTATGGTGCCGTCCG  
 AAACAAACCCGTTTCAAGATAACAATTCTCATGGCACACACGTCGCAGGAACGGTTGC  
 GCGTAAACAATTCTATTGGCGTGCTTGGTGTAGCCCCGTCTGCTTCGCTCTACGCC  
 GTTAAAGTTCTTGGCGCAGACGGATCAGGCCAATACTCATGGATTATCAACGGCATCG  
 AATGGGCCATCGGAATAACATGGATGTAATCAACATGAGCCTGGGAGGACCAAGCG  
 GCAGTGCGGCACTTAAAGCAGCAGTTGATAAAGCTGTTGCATCTGGTGTGCTCGTAGT  
 AGCGGCAGCTGGGAATGAGGGAACATCCGGATCATCGAGTACCGTCGGTTATCCAGG  
 CAAGTACCCTTCAGTGATTGCAGTGGGCGCTGTAGACTCTTCAAATCAACGTGCCTCT  
 TTTTCTCCGTGGGACCGGAGCTGGATGTCATGGCCCCCTGGCGTTTCTATTC AATCGA  
 CGCTTCCAGGGAACAAGTATGGTGCGTATAACGGGACTTCCATGGCCTCGCCGCATGT  
 AGCTGGGGCGGCCGATTGATTCTTTCTAAGCACCCGAACTGGACAAACACTCAAGTC  
 CGCAGCAGTTTAGAAAAACACCACTACAAAACCTTGGTGATTCTTTCTACTATGGAAAAG  
 GGCTGATCAACGTACAGGCGGCAGCTCAG (配列番号1)

10

20

配列番号1のヌクレオチド配列において、成熟型プロテアーゼをコードしているDNA配列を太字で示し、リーダー配列(aprE-BPN'ハイブリッドリーダー配列)をコードしているヌクレオチド配列は標準テキスト(下線なし)で示し、及びプロ配列(BPN')をコードしているヌクレオチド配列には下線を付する。配列番号168にBPN'前駆タンパク質のアミノ酸配列(aprE-BPN'ハイブリッドリーダー配列、BPN'プロ配列、及びBPN'成熟タンパク質の配列)を示す。太字の箇所は成熟スブチリンBPN'プロテアーゼを示す。

## 【配列表 2】

【0368】

VRSKKLWISLLFALALIFTMAFGSTSSAQAAGKSNGEKKYIVGFKQTMSTMSAAKKKDVISEKG  
 GKVQKQFKYVDAASATLNEKAVKELKKDPSVAYVEEDHVAHAYAQSVPYGVSQIKAPALHS  
 QGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGASMVPSETNPFQDNNSHGTHVAGTVAALNNSI  
 GVLGVAPSASLYAVKVLGADGSGQYSWIINGIEWAIANNM  
 DVINMSLGGPSGSAALKAAVDKAVASGVVVVAAAGNEGTS  
 GSSSTVGYPGKYP SVI AVGAVDSSNQ RASFSSVGP ELDVM  
 APGVS IQSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALILSKHP  
 NWTNTQVRSSLENTTTKLGDSFY YGKGLINVQAAAQ (配列番号168)

30

したがって、成熟スブチリンBPN'プロテアーゼのアミノ酸配列は、以下である：

AQSVPYGVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGASMVPSETNPFQDNNSHGTHVAGTVAALNNSI  
 GVLGVAPSASLYAVKVLGADGSGQYSWIINGIEWAIANNM  
 DVINMSLGGPSGSAALKAAVDKAVASGVVVVAAAGNEGTS  
 GSSSTVGYPGKYP SVI AVGAVDSSNQ RASFSSVGP ELDVM  
 APGVS IQSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALILSKHP  
 NWTNTQVRSSLENTTTKLGDSFY YGKGLINVQAAAQ (配列番号2)

40

成熟BPN'-v3遺伝子のヌクレオチド配列は、以下に示される(BPN'-v3発現カセットで使用されるシグナル配列及びプロペプチド配列は、配列番号1に示されるBPN'と同様である)：

GCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAAATTAAGCC

50

CCTGCTCTGCACTCTCAAGGCTACACTGGATCAAATGTTA  
 AAGTAGCGGTTATCGACAGCGGTATCGACTCGAGCCATCC  
 AGATCTTAAAGTCGCTGGAGGGGCTTCTATGGTGCCGTCC  
 GAAACAAACCCTTCAAGATAACAATTCTCATGGCACAC  
 ACGTCGCAGGAACGGTTGCGGCGTTAAACAATTCTATTGG  
 CGTGCTTGGTGTAGCCCCGTCTGCTTTCGCTCTACGCCGTT  
 AAAGTTCTTGCAAGCAGACGGATCAGGCCAATACTCATGGA  
 TTATCAACGGCATCGAATGGGCCATCGCGAATAACATGGA  
 TGTAATCAACATGAGCCTGGGAGCACCAAGCGGCAGTGCG  
 GCACTTAAAGCAGCAGTTGATAAAGCTGTTGCATCTGGTG 10  
 TCGTCGTAGTAGCGGCAGCTGGGAATGAGGGAACATCCGG  
 ATCATCGAGTACCGTCCGGTTATCCAGGCAAGTACCCTTCA  
 GTGATTGCAAGTGGGCGCTGTAGACTCTTCAAATCAAACGTG  
 CCTCTTTTCTCCTCCGTGGGACCGGAGCTGGATGTCATGGC  
 CCCTGGCGTTTCTATTCAATCGACGCTTCCAGGGAACAAG  
 TATGGTGCAGCAAACGGGACTTCCATGGCCTCGCCGCATG  
 TAGCTGGGGCGGCGCATTGATTCTTTCTAAGCACCCGAA  
 CTGGACAAACACTCAAGTCCGCAGCAGTTTAGAAAACACC  
 ACTACAAAACCTTGGTGAATTCTTTCTACTATGGAAAAGGGC  
 TGATCAAACGTACAGGCGGCAGCTCAG (配列番号3) 20

成熟BPN' - v3プロテアーゼ変異体のタンパク質配列は、以下に示される(BPN' - v3発現カセットで使用されるシグナル配列及びプロペプチド配列は、配列番号168に示されるBPN'と同じである)：

AQSVPYGVVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSH  
 PDLKVAGGASMPSETNPFQDNNSHGTHVAGTVAA LNNSI  
 GVLGVAPSASLYAVKVLAADGSGQYSWIINGIEWAIANNM  
 DVINMSLGPSSGSAALKAAVDKAVASGVVVVAAAGNEGTS  
 GSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRASFSVGPELDVM  
 APGVS IQSTLPGNKYGAQNGTSMASPHVAGAAALILSKHP  
 NWTNTQVRS SLENTTTKLGD SFY YGKGLINVQAAAQ (配列番 30  
 号4)

b) pHPLT - BPN' - v3プラスミドを用いるコンビナトリアルライブラリの構築

上記のBPN' - v3発現カセットを含有しているpHPLT - BPN' - v3プラスミド(図1を参照されたい)を、クローニング用のテンプレートDNAとして使用して、BPN' - v3から誘導された変異体を得た。ベクターpHPLT(米国特許第6,566,112号、図4)は、パチルス・リケニホルミス(*B. licheniformis*)LATプロモーター(「Plat」)と、LATシグナルペプチドをコードしている配列(「プレLAT」)を含有する。プラスミドpUB110に由来する更なるプラスミド成分はMcKenzie et al., *Plasmid* 15(2):93~103(1986)に開示されている:「ori-pUB」はpUB110の複製起点であり「neo」はpUB110に由来するネオマイシン/カナマイシン耐性遺伝子であり、「終結領域」はパチルス・リケニホルミス(*B. licheniformis*)のアミラーゼの転写終結領域である。

【0369】

コンビナトリアルなDNAライブラリはDNA 2.0で合成され、個々のライゲーション反応物として供給された。枯草菌(*B. subtilis*)の効率的な形質転換については、場合によっては、Illustra TempliPhiキット(GE Healthcare)を用いるローリング・サークル型増幅(RCA)により、ライゲーション反応混合物からDNAを増幅させた。反応は製造元のプロトコルに従って実施した。1マイクロリットルの、10倍希釈した増幅DNAを使用して、コンピテントな枯草菌(*B. subtili* 50

s) 細胞 ( *aprE*, *nprE*, *amyE* : : *xy1RPxy1AcomK-phil*  
*eo* ) 50  $\mu$ L を形質転換させた。形質転換混合物を 37 °C にて 1 時間にわたって振盪し  
 た。形質転換混合物の 10 マイクロリットルアリコート、10  $\mu$ g/mL のネオマイシ  
 ン ( *Teknova* ) を添加したスキムミルク ( 1.6% ) *Luria* 寒天プレートに蒔  
 いた。

#### 【0370】

スキムミルクプレート上でハローを形成した形質転換体をつつき、10  $\mu$ g/mL のネ  
 オマイシンを添加した 150  $\mu$ L のルリアブラス ( *LB* ) 培地を含有しているマイクロタ  
 イタープレートに植菌した。マイクロタイタープレートに *EnzyScreen lid*  
 ( *EnzyScreen* ) を用い、プレートを 37 °C、70 ~ 80% 湿度にて、250 ~ 10  
 300 rpm で振盪させながら一晩増殖させた。一晩培養したプレートを使用し、96ピ  
 ンの複製ツール ( *EnzyScreen* ) を用いて、2.5  $\mu$ g/mL のネオマイシンを  
 添加した 180  $\mu$ L の *MBD* 培地 ( *MOPS* 系合成培地 ) を含有している新しいマイクロ  
 タイタープレートに接種した。NH<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>、FeSO<sub>4</sub>、及び CaCl<sub>2</sub> を基本培地か  
 ら除外したこと、3 mM の K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> を用いたこと、並びに、60 mM の尿素、及び、  
 210 g/L のグルコースと 350 g/L のマルトデキストリンとから作製した 100 m  
 L の溶液を含有させたこと、を除き、*MBD* 培地は本質的に当該技術分野において既知で  
 あるように調製した *Letal*, *J. Bacteriol.* 119: 736 ~ 74  
 7 [ 1974 ] を参照されたい)。1 g/L の *BD* バクト酵母抽出物を添加し、*KOH* で  
 pH を 7.4 に調整した。微量栄養素は、400 mg の FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、100 m  
 20  
 g の MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O、100 mg の ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、50 mg の CuCl<sub>2</sub> ·  
 2H<sub>2</sub>O、100 mg の CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O、100 mg の NaMoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O、  
 100 mg の Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O、10 mL の 1 M CaCl<sub>2</sub> 及び 10 mL の  
 0.5 M の 0.5 M のクエン酸ナトリウムを 1 リットル中に含有している、100 X 原液  
 として調製した。プロテアーゼ変異体を発現させるために、*EnzyScreen lid*  
*s* ( *EnzyScreen* ) を用いて、*MBD* 培地を含有しているマイクロタイタープレ  
 ートで、37 °C、70 ~ 80% 湿度にて、250 ~ 300 rpm で、64 時間にわた  
 って増殖させた。翌日、培養物をマイクロフィルタプレート ( 0.22  $\mu$ m、*Millipore* )  
 で濾過し、プロテアーゼ変異体を含有している得られた濾液を生化学的解析に使用  
 した。

#### 【0371】

16 °C 及び pH 8 での洗剤組成物 1 の *BMI* 微小標本アッセイ、並びに 16 °C 及び pH  
 8 での洗剤組成物 2 の *BMI* 微小標本アッセイを用いて、プロテアーゼ変異体をクリ  
 ーニング性能について試験した。タンパク質含量は *TCA* アッセイを用いて測定した。実  
 施例 1 に記載のようにアッセイを実施し、*BPN' - v3* ( *PI* 値 1.0 を有する ) と比  
 較して性能指数を算出した。

#### 【0372】

以下のスプチリシン *BPN'* プロテアーゼ変異体 ( : アミノ酸置換 *G097A - G12*  
*8A - P210S - Y217Q*, の組を含む *BPN'* アミノ酸配列 ( 配列番号 2 ) ) は、  
 pH 8 及び 16 °C での洗剤組成物 1 の *BMI* 微小標本クリーニングアッセイにおいて、  
 40  
*BPN' - v3* ( 配列番号 4 ) と比較して 1.0 超、少なくとも 1.1、少なくとも 1.  
 2、少なくとも 1.3、少なくとも 1.4、少なくとも 1.5、少なくとも 1.6、少な  
 くとも 1.7、少なくとも 1.8、少なくとも 1.9、少なくとも 2 ~ 約 5、又は、1.  
 0 超 ~ 約 5 の *PI* 値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配  
 列番号 2 の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、この *BMI*  
*BMI* 微小標本クリーニングアッセイにおいて *BPN' - v3* に対し 1.1 である *PI* 値を有  
 し、本アッセイにおいて、*BPN'* ( 配列番号 2 ) と比較して向上したタンパク質分解活  
 性を有し、*BPN'* の *PI* 値よりも大きい *PI* 値を有する。本発明には、本アッセイにお  
 いて、*BPN'* ( 配列番号 2 ) と比較して向上したタンパク質分解活性を有するプロテア  
 ーゼ変異体を含み、この変異体はアミノ酸置換 *G097A - G128A - P210S - Y*  
 50

217Q, を含むアミノ酸配列を有し、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。本アッセイにおいて、配列番号2と比較して向上したタンパク質分解活性を有するプロテアーゼ変異体も包含され、この変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸置換G097A - G128A - P210S - Y217Q, を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。BMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいはBPN' (配列番号2)及び/又はBPN' - v3のPI値を超えるPI値を有する、スブチリシンプロテアーゼ変異体も提供され、この変異体は配列番号2と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ここで、この変異体は、置換X097A - X128A - X210S - X217Q, を含み、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされ、選択的に、この変異体はG097A, G128A, P210S, 及びY217Qの群から選択される少なくとも1つの置換を含む。このようなプロテアーゼ変異体は、単離物、組み換え体、実質的な純品、又は天然に生じたものではないプロテアーゼ変異体であり得る。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、このようなプロテアーゼ変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、このような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

10

20

## 【0373】

以下のBPN'変異体: G097A - G128A - Y217Q, G097A - G128A - E156S - P210S - Y217Q, G097A - G128A - P210S - Y217Q - N218A, G097A - G128A - P210S - Y217Q - N218S, 及びG097A - Y104F - G128A - E156S - P210I - Y217Q, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列(配列番号2)は、pH 8及び16での洗剤組成物1のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v3と比較して約1.0のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN' (配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'よりもPI値が大きい。本発明は、本BMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' (配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、あるいは、BPN' - v3と比較して約1.0のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。BMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN' - v3と比較して約1.0のPI値を有する、スブチリシンプロテアーゼ変異体も提供され、この変異体は配列番号2に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ここで、この変異体はX097A, X104F, X128A, X156A/S, X210I/S, X217Q, X218A/Sの群から選択される少なくとも1つの置換を含み、選択的に、G097A, Y104F, G128A, E156A/S, P210I/S, Y217Q, 及びN218A/Sの群から選択される少なくとも1つの置換を含み、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

30

40

50

## 【0374】

以下のBPN'変異体：G097A - G128A - E156A - P210S - Y217Q - N218S及びG097A - G128A - Y217Q - N218A，からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列（配列番号2）は、pH 8及び16での洗剤組成物1のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v3と比較して約0.9のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、本アッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、BPN' - v3と比較して約0.9のPI値を有する、並びに/又はBPN'と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列、並びに上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物（クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない）、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

10

## 【0375】

以下のBPN'変異体：G097A - G128A - P210S - Y217Q - N218A及びG097A - G128A - P210S - Y217Q，からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列（配列番号2）は、pH 8及び16での洗剤組成物2のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v3と比較して1.0超～約5のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。本発明は、本BMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'（配列番号2）と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN' - v3と比較して1.0超～約5のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'（配列番号2）と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'よりもPI値が大きい。本BMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN' - v3と比較して1超、少なくとも1.1、少なくとも1.2、少なくとも1.3、少なくとも1.4、少なくとも1.5、少なくとも1.6、少なくとも1.7、少なくとも1.8、少なくとも1.8、少なくとも1.9～約5のPI値を有する、スブチリシンプロテアーゼ変異体も提供され、この変異体は配列番号2に対して少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ここで、この変異体は、X097A，X104F，X128A，X156A/S，X210I/S，X217Q，X218A/Sの群から選択される少なくとも1つの置換を含み、選択的に、G097A，Y104F，G128A，E156A/S，P210I/S，Y217Q，及びN218A/Sの群から選択される少なくとも1つの置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'（配列番号2）と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'よりもPI値が大きい。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物（クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない）、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

20

30

40

50

## 【0376】

以下のBPN'変異体：G097A - G128A - Y217Q（すなわち、BPN' - v3）、G097A - G128A - E156S - P210S - Y217Q、及びG097A - G128A - P210S - Y217Q - N218S、からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列（配列番号2）は、pH 8及び16での洗剤組成物2のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v3と比較して約1.0のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、タンパク質分解活性を有し、BPN'と比較して向上したタンパク質分解活性を有する。本発明は、本アッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、BPN' - v3と比較して1.0のPI値を有する、並びに/あるいは、BPN'と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列、並びに上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物（クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない）、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

10

## 【0377】

以下のBPN'変異体：G097A - G128A - E156A - P210S - Y217Q - N218S、G097A - G128A - Y217Q - N218A、及びG097A - Y104F - G128A - E156S - P210I - Y217Q、からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列（配列番号2）は、pH 8及び16での洗剤組成物2のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v3と比較して約0.9のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、本アッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、BPN' - v3と比較して約0.9のPI値を有する、並びに/あるいは、BPN'と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列、並びに、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物（クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない）、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

20

30

## 【0378】

(実施例3)

コンビナトリアルライブラリの作成及び変異体BPN' - v3 + S78Nのクリーニング性能

40

a) BPN' - v3 + S78N変異体及びこの変異体から誘導される合成遺伝子配列の説明

Gene Oracleは、8つの遺伝子を合成し、pHPLT - BPN' - v3 + S78N (BPN' - S78N - G97A - G128A - Y217Q) 親プラスミド (図2を参照されたい) にクローン化した。これらの遺伝子のうちいくつかをテンプレート (親) として使用し、コンビナトリアルライブラリを作成した。当該技術分野において既知の標準的な分子生物学的手法を用いてBPN' - v3 + S78N変異体を生成した。BPN' - v3 + S78N変異体をコードするヌクレオチド配列を以下に示す。

## 【0379】

50



GCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAAATTAAGCC  
 CCTGCTCTGCACTCTCAAGGCTACACTGGATCAAATGTTA  
 AAGTAGCGGTTATCGACAGCGGTATTGATTCGAGCCATCC  
 AGATCTTAAAGTCGCTGGAGGGGCTTCTATGGTGCCGTCC  
 GAAACA AACCCGTTTCAAGATAACAATTCTCATGGCACAC  
 ACGTCGCAGGAACGGTTGCGGCGTTAAACAATAATATTGG  
 CGTGCTTGGTGTAGCCCCGTCTGCTTCGCTCTACGCCGTT  
 AAAGTTCTTGCAGCAGACGGATCAGGCCAATACTCATGGA  
 TTATCAACGGCATCGAATGGGCCATCGCGAATAACATGGA  
 TGTAATCAACATGAGCCTGGGAGCACCAAGCGGCAGTGCG  
 GCACTTAAAGCAGCAGTTGATAAAGCTGTTGCATCTGGTG  
 TCGTCGTAGTAGCGGCAGCTGGGAATGAGGGAACATCCGG  
 ATCATCGAGTACCGTCCGGTTATCCAGGCCAAGTACCCTTCA  
 GTGATTGTCAGTGGGCGCTGTAGACTCTTCAAATCAACGTG  
 CCTCTTTTTCCTCCGTGGGACCGGAGCTGGATGTCATGGC  
 CCTTGGCGTTTCTATTCAAATCGACGCTTCCAGGGGAACAAG  
 TATGGTGC GCAAAACGGGACTTCCATGGCCTCGCCGCATG  
 TAGCTGGGGCGGCCGCATTGATTTCTTTCTAAGCACCCGAA  
 CTGGACA AACACTCAAGTCCGCAGCAGTTTAGAAAACACC  
 ACTACA AAAACTTGGTGATTTCTTTCTACTATGGAAAAGGGC  
 TGATCAACGTACAGGCGGCAGCTCAG (配列番号7)

10

20

BPN' - v3 + S78N 変異体のアミノ酸配列を以下に示す。

【0380】

AQSVPYGVVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSH  
 PDLKVAGGASMPSETNPFQDNNSHGTHVAGTVAAALNNNI  
 GVLGVAPSASLYAVKVLAADGSGQYSWIINGIEWAIANNM  
 DVINMSL GAPS GSAALKAAVDKAVASGVVVVAAAGNEGTS  
 GSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRASFSVGPELDVM  
 APGVS IQSTLPGNKYGAQNGTSMASPHVAGAAALILSKHP  
 NWTNTQVRSSLENTTTKLGDSFY YGKGLINVQAAAQ (配列番  
 号8)

30

遺伝子GcM90-96及びGcM100の、ヌクレオチド配列及びタンパク質配列を以下に示す。合成された遺伝子GcM90のヌクレオチド配列は、以下の通りである。

【0381】

GCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAAATTAAGCC  
 CCTGCTCTGCACTCTCAAGGCTACACTGGATCAAATGTTA  
 AAGTAGCGGTTATCGACAGCGGTATCGACTCGAGCCATCC  
 AGATCTTAAAGTCGCTGGAGGGGCTTCTATGGTGCCGGGA  
 GAAACA AACCCGTTTCAAGATAACAATTCTCATGGCACAC  
 ACGCAGCAGGAACGGTTGCGGCGTTAAACAATAATATTGG  
 CGTGCTTGGTGTAGCCCCGTCTGCTTCGCTCTACGCCGTT  
 AAAGTTCTTGCAGCAGACGGATCAGCACAAATACTCATGGA  
 TTATCAACGGCATCGAATGGGCCATCGCGAATAACATGGA  
 TGTAATCAACATGAGCCTGGGAGCAACAAGCGGCAGTGCG  
 GCACTTAAAGCAGCAGTTGATAAAGCTGTTGCATCTGGTG  
 TCGTCGTAGTAGCGGCAGCTGGGAATGAGGGAACATCCGG  
 ATCATCGAGTACCGTCCGGTTATCCAGGCCAAGTACCCTTCA  
 GTGATTGTCAGTGGGCGCTGTAGACTCTTCAAATCACCGTG  
 CCTCTTTTTCCTCCGTGGGACCGGAGCTGGATGTCATGGC  
 CCTTGGCGTTTCTATTCAAATCGACGCTTCCAGGGGAACAAG

40

50

T A T G G T G C G C A A A A C G G G A C T T C C A T G G C C T C G C C G C A T G  
 T A G C T G G G G C G G C C G C A T T G A T T C T T T C T A A G C A C C C G A A  
 C T G G A C A A A C A C T C A A G T C C G C A G C A G T T T A G A A A A C A C C  
 A C T A C A A A A C T T G G T G A T T C T T T C T A C T A T G G A A A A G G G C  
 T G A T C A A C G T A C A G G C G G C A G C T C A G T A A (配列番号 9)

G c M 9 0 のアミノ酸配列は以下に提供される。

【 0 3 8 2 】

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 D L K V A G G A S M V P G E T N P F Q D N N S H G T H A A G T V A A L N N N I  
 G V L G V A P S A S L Y A V K V L A A D G S A Q Y S W I I N G I E W A I A N N M  
 D V I N M S L G A T S G S A A L K A A V D K A V A S G V V V V A A A G N E G T S  
 G S S S T V G Y P G K Y P S V I A V G A V D S S N T R A S F S S V G P E L D V M  
 A P G V S I Q S T L P G N K Y G A Q N G T S M A S P H V A G A A A L I L S K H P  
 N W T N T Q V R S S L E N T T T K L G D S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q (配列番  
 号 1 0)

10

合成された遺伝子 G c M 9 1 のヌクレオチド配列は以下に提供される。

【 0 3 8 3 】

G C G C A G T C C G T G C C T T A C G G C G T A T C A C A A A T T A A A G C C  
 C C T G C T C T G C A C T C T C A A G G C T A C A C T G G A T C A A A T G T T A  
 A A G T A G C G G T T A T C G A C A G C G G T A T C G A C T C G A G C C A T C C  
 A G A T C T T A A A G T C G C T G G A G G G G C T T C T A T G G T G C C G T C C  
 G A A A C A A A C C C G T T T G T C G A T A A C A A T T C T C A T G G C A C A C  
 A C G T C G C A G G A A C G G T T G C G G C G T T A A A C A A T A A T A T T G G  
 C G T G C T T G G T G T A G C C C C G T C T G C T T C G C T C T A C G C C G T T  
 A A A G T T C T T G C A G C A G A C G G A T C A G G C C A A T A C T C A T G G A  
 T T G T C A A C G G C A T C G A A T G G G C C A T C G C G A A T A A C A T G G A  
 T G T A A T C A A C A T G A G C C T G G G A G C A C C A A G C G G C A G T G C G  
 G C A C T T A A A G C A G C A G T T G A T A A A G C T G T T G C A T C T G G T C  
 A A G T C G T A G T A G C G G C A G C T G G G A A T G A G G G A A C A T C C G G  
 A T C A T C G A G T A C C G T C G G T T A T C C A G G C A A G T A C C C T T C A  
 G T G A T T G C A G T G G G C G C T G T A G A C T C T T C A A A T C A A C G T G  
 C C T C T T T T T C C T C C G T G G G A C C G G A G C T G G A T G T C A T G G C  
 C C C T G G C G T T T C T A T T C A A T C G A C G C T T C C A G C A A A C A A G  
 T A T G G T G C G C A A A A C G G G A C T T C C A T G G C C T C G C C G C A T G  
 T A G C T G G G G C G G C C G C A T T G A T T C T T T C T A A G C A C C C G A A  
 C T G G A C A A A C A C T C A A G T C C G C A G C A G T T T A G A A C A A A C C  
 A C T A C A A A A C T T G G T G A T T C T T T C T A C T A T G G A A A A G G G C  
 T G A T C A A C G T A C A G G C G G C A G C T C A G T A A (配列番号 1 1)

20

30

G c M 9 1 のアミノ酸配列は以下に提供される。

【 0 3 8 4 】

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 D L K V A G G A S M V P S E T N P F V D N N S H G T H V A G T V A A L N N N I  
 G V L G V A P S A S L Y A V K V L A A D G S G Q Y S W I V N G I E W A I A N N M  
 D V I N M S L G A P S G S A A L K A A V D K A V A S G Q V V V A A A G N E G T S  
 G 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 P G V S I Q S T L P A N K Y G A Q N G T S M A S P H V A G A A A L I L S K H P  
 N W T N T Q V R S S L E Q T T T K L G D S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q (配列番  
 号 1 2)

40

合成された遺伝子 G c M 9 2 のヌクレオチド配列は以下に提供される。

【 0 3 8 5 】

50

GCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAAATTAAGCC  
 CCTGCTCTGCACTCTCAAGGCTACACTGGATCAAATGTTA  
 AAGTAGCGGTTATCGACAGCGGTATCGACTCGAGCCATCC  
 AGATCTTAAAGTCGCTGGAGGGGCTTCTATGGTGCCGTCC  
 GAAACA AACCCGTTTCAAGATGCAAATTCATGGCACAC  
 ACGTCGCAGGAACGGTTGCGGCGTTAAACAATAATATTGG  
 CGTGCTTGGTGTAAGCCCCGGAAGCTTCGCTCTACGCCGTT  
 AAAGTTCTTGCAGCAGACGGATCAGGCCAATACTCATGGA  
 TTATCAACGGCATCGAATGGGCCATCGCGAATAACATGGA  
 TGTAATCAACATCAGCCTGGGAGCACCAAGCGGCAGTGCG  
 GCACTTAAAGCAGCAGTTGATAAAGCTGTTGCATCTGGTG  
 TCGTCGTAGTAGCGGCAGCTGGGAATGAGGGAACATCCGG  
 ACCTTCGAGTACCGTCGGTTATCCAGGCCAAGTACCCTTCA  
 GTGATTGCAAGTGGGCGCTGTAGACTCTTCAAATCAACGTG  
 CCTCTTTTTTCTCCTCCGTGGGACCGGAGCTGGATGTCATGGC  
 CCTTGGCGTTTTCTATTCAAATCGACGCTTCCAGGGAAACAAG  
 TATGGTGC GCAAAACGGGACTTCCATGGCCGCACCGCATG  
 TAGCTGGGGCGGCCGCATTGATTCTTTCTAAGCACCCGAA  
 CTGGACA AACACTCAAGTCCGCAGCAGTTTAGAAAACACC  
 ACTACA AAAACTTGGTGATTCTTTCTACTATGGAAAAGGGC  
 TGATCAACGTACAGGCGGCAGCTCAGTAA (配列番号13)

10

20

GcM92のアミノ酸配列は以下に提供される。

【0386】

AQSVPYGVVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSH  
 PDLKVAGGASMPSETNPFQDANSHGTHVAGTVAAALNNNI  
 GVLGVAPEASLYAVKVLAADGSGQYSWIINGIEWAIANNM  
 DVINISL GAPS GSAALKAAVDKAVASGVVVVAAAGNEGTS  
 GPSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRASFSVGPELDVM  
 APGVS IQSTLPGNKYGAQNGTSMAPHVAGAAALILSKHP  
 NWTNTQVRS SLENTTTKLGDSFY YGKGLINVQAAAQ (配列番  
 号14)

30

合成された遺伝子GcM93のヌクレオチド配列は以下に提供される。

【0387】

GCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAAATTAAGCC  
 CCTGCTCTGCACTCTCAAGGCTACACTGGATCAAATGTTA  
 AAGTAGCGGTTATCGACAGCGGTATCGACTCGAGCCATCC  
 AGATCTTAAAGTCGCTGGAGGGGCTTCTATGGTGCCGTCC  
 GAAACA AACCCGTTTCAAGATAACCAATTCATGGCACAC  
 ACGTCGCAGGAACGGTTGCGGCGTTAAACAATAATATTGG  
 CGTGCTTGGTGTAAGCCCCGTCTGCTTCGCTCTACGCCGTT  
 AAAGTTCTTGCAGCAGACA ACTCAGGCCAATACTCATGGA  
 TTATCAACGGCATCGAATGGGCCATCGCGAATAACATGGA  
 TGTAATCAACATGGCACTGGGAGCACCAAGCGGCAGTGCG  
 GCACTTAAAGCAGCAGTTGATAAAGCTGTTGCATCTGGTG  
 TCGTCGTAGTAGCGGCAGCTGGGAATGAGGGAACAGATGG  
 ATCATCGAGTACCGTCGGTTATCCAGGCCAAGTACCCTTCA  
 GTGATTGCAAGTGGGCGCTGTAGACTCTTCAAATCAACGTG  
 CCTCTTTTTTCTCCTCCGTGGGACCGGAGCTGGATGTCATGGC  
 CCTTGGCGTTTTCTATTCAAATCGACGCTTCCAGGGAAACAAG  
 TATGGTGC GCAAAACGGGACTTCCATGGCCCTCGCCGCATG

40

50

T A G C T G G G G C G G C C G C A T T G A T T C T T T C T A A G C A C C C G T C  
 A T G G A C A A A C A C T C A A G T C C G C A G C A G T T T A G A A A A C A C C  
 A C T A C A A A A C T T G G T G A T T C T T T C T A C T A T G G A A A A G G G C  
 T G A T C A A C G T A C A G G C G G C A G C T C A G T A A ( 配列番号 1 5 )

G c M 9 3 のアミノ酸配列は以下に提供される。

【 0 3 8 8 】

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 D L K V A G G A S M V P S E T N P F Q D N Q S H G T H V A G T V A A L N N N I  
 G V L G V A P S A S L Y A V K V L A A D N S G Q Y S W I I N G I E W A I A N N M  
 D V I N M A L G A P S G S A A L K A A V D K A V A S G V V V V A A A G N E G T D  
 G 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 P G V S I Q S T L P G N K Y G A Q N G T S M A S P H V A G A A A L I L S K H P  
 S W T N T Q V R S S L E N T T T K L G D S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q ( 配列番  
 号 1 6 )

10

合成された遺伝子 G c M 9 4 のヌクレオチド配列は以下に提供される。

【 0 3 8 9 】

G C G C A G T C C G T G C C T T A C G G C G T A T C A C A A A T T A A A G C C  
 C C T G C T C T G C A C T C T C A A G G C T A C A C T G G A T C A A A T G T T A  
 A A G T A G C G G T T A T C G A C A G C G G T A T C G A C T C G A G C C A T C C  
 A G A T C T T A A A G T C G C T G G A G G G G C T T C T A T G G T G C C G T C C  
 G A A A C A A A C C C G T T T C A A G A T A A C A A T A C A C A T G G C A C A C  
 A C G T C G C A G G A A C G G T T G C G G C G T T A A A C A A T A A T A T T G G  
 C G T G C T T G G T G T A G C C C C G T C T G C T T C G C T C T A C G C C G T T  
 A A A G T T C T T G C A G C A G A C G G A G C A G G C C A A T A C T C A T G G A  
 T T A T C A A C G G C A T C G A A T G G G C C A T C G C G A A T A A C A T G G A  
 T G T A A T C A A C A T G A G C G T C G G A G C A C C A A G C G G C A G T G C G  
 G C A C T T A A A G C A G C A G T T G A T A A A G C T G T T G C A T C T G G T G  
 T C G T C G T A G T A G C G G C A G C T G G G A A T G A G G G A A C A T C C G G  
 A T C A T C G A G T A C C G T C G G T T A T C C A G G C A A G T A C C C T T C A  
 G T G A T T G C A G T G G G C G C T G T A G A C T C T A C A A A T C A A C G T G  
 C C T C T T T T T C C T C C G T G G G A C C G G A G C T G G A T G T C A T G G C  
 C C C T G G C G T T T C T A T T C A A T C G A C G C T T C C A G G G A A C A A G  
 T A T G G T G C G C A A A A C G G G A C T T C C A T G G C C T C G C C G C A T G  
 T A G C T G G G G C G G C C G C A T T G A T T C T T T C T A A G C A C C C G A A  
 C T G G A C A A A C A A C C A A G T C C G C A G C A G T T T A G A A A A C A C C  
 A C T A C A A A A C T T G G T G A T T C T T T C T A C T A T G G A A A A G G G C  
 T G A T C A A C G T A C A G G C G G C A G C T C A G T A A ( 配列番号 1 7 )

20

30

G c M 9 4 のアミノ酸配列は以下に提供される。

【 0 3 9 0 】

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 D L K V A G G A S M V P S E T N P F Q D N N T H G T H V A G T V A A L N N N I  
 G V L G V A P S A S L Y A V K V L A A D G A G Q Y S W I I N G I E W A I A N N M  
 D V I N M S V G A P S G S A A L K A A V D K A V A S G V V V V A A A G N E G T S  
 G S S S T V G Y P G K Y P S V I A V G A V D S T N Q R A S F S S V G P E L D V M  
 A P G V S I Q S T L P G N K Y G A Q N G T S M A S P H V A G A A A L I L S K H P  
 N W T N N Q V R S S L E N T T T K L G D S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q ( 配列番  
 号 1 8 )

40

合成された遺伝子 G c M 9 5 のヌクレオチド配列は以下に提供される。

【 0 3 9 1 】

G C G C A G T C C G T G C C T T A C G G C G T A T C A C A A A T T A A A G C C

50

CCTGCTCTGCACTCTCAAGGCTACACTGGATCAAATGTTA  
 AAGTAGCGGTTATCGACAGCGGTATCGACTCGAGCCATCT  
 GGATCTTAAAGTCGCTGGAGGGGCTTCTATGGTGCCGGGA  
 GAAACAAACCCTTGTGATGCACAAACACATGGCACAC  
 ACGTCGCAGGAACGGTTGCGGC GTTAAACAATAATATTGG  
 CGTGCTTGGTGTAGCCCCGGAAGCTTTCGCTCTACGCCGTT  
 AAAGTTCTTGCAGCAGACAACGCAGCACAACTCATGGA  
 TTGTCAACGGCATCGAATGGGCCATCGCGAATAACATGGA  
 TGTAATCAACATGAGCCTGGGAGCACCAAGCGGCAGTGCG  
 GCACCTTAAAGCAGCAGTTGATAAAGCTGTTGCATCTGGTG  
 TCGTCGTAGTAGCGGCAGCTGGGAATGAGGGAACATCCGG  
 ATCATCGAGTACCGTCCGGTTATCCAGGCAAGTACCCTTCA  
 GTGATTGCAAGTGGGCGCTGTAGACTCTTCAAATCAACGTG  
 CCTCTTTTCTCCTCCGTGGGACCGGAGCTGGATGTCATGGC  
 CCCTGGCGTTTCTATTCAATCGACGCTTCCAGGGAACAAG  
 TATGGTGCAGCAAAACGGGACTTCCATGGCCTCGCCGCATG  
 TAGCTGGGGCGGCGCATTGATTCTTTCTAAGCACCCGAA  
 CTGGACAAACACTCAAGTCCGCAGCAGTTTAGAAAACACC  
 ACTACAAAACCTTGGTGAATTCTTTCTACTATGGAAAAGGGC  
 TGATCAACGTACAGGCGGCAGCTCAGTAA (配列番号19)

10

20

GcM95のアミノ酸配列は以下に提供される。

【0392】

AQSVPYGVVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSH  
 LDLKVAGGASMPGETNPFVDAQTHGTHVAGTVAAALNNNI  
 GVLGVAPEASLYAVKVLAADNAAQYSWIVNGIEWAIANNM  
 DVINMSLGAPSGSAAALKAAVDKAVASGVVVVAAGNEGTS  
 GSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRFSSVGPELDVM  
 APGVS IQSTLPGNKYGAQNGTSMASPHVAGAAALILSKHP  
 NWTNTQVRSSLENTTTKLGDSFYYGKGLINVQAAAQ (配列番  
 号20)

30

合成された遺伝子GcM96のヌクレオチド配列は以下に提供される。

【0393】

GCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAAATTAAGCC  
 CCTGCTCTGCACTCTCAAGGCTACACTGGATCAAATGTTA  
 AAGTAGCGGTTATCGACAGCGGTATCGACTCGAGCCATCC  
 AGATCTTAAAGTCGCTGGAGGGGCTTCTATGGTGCCGTCC  
 GAAACAAACCCTTCAAGATAACAATTCTCATGGCACAC  
 ACGTCGCAGGAACGGTTGCGGC GTTAAACAATAATATTGG  
 CGTGCTTGGTGTAGCCCCGTCTGCTTTCGCTCTACGCCGTT  
 AAAGTTCTTGCAGCAGACGGATCAGGCCAATACTCATGGA  
 TTATCAACGGCATCGAATGGGCCATCGCGAATAACATGGA  
 TGTAATCAACATGAGCCTGGGAGCAACAAGCGGCAGTGCG  
 GCACCTTAAAGCAGCAGTTGATAAAGCTGTTGCATCTGGTC  
 AAGTCGTAGTAGCGGCAGCTGGGAATGAGGGAACAGATGG  
 ACCCTTCGAGTACCGTCCGGTTATCCAGGCAAGTACCCTTCA  
 GTGATTGCAAGTGGGCGCTGTAGACTCTACAAATCACCGTG  
 CCTCTTTTCTCCTCCGTGGGACCGGAGCTGGATGTCATGGC  
 CCCTGGCGTTTCTATTCAATCGACGCTTCCAGCAAAACAAG  
 TATGGTGCAGCAAAACGGGACTTCCATGGCCGCACCCGCATG  
 TAGCTGGGGCGGCGCATTGATTCTTTCTAAGCACCCGTC

40

50

ATGGACAAACAACCAAGTCCGCAGCAGTTTAGAACAAACC  
 ACTACAAAACCTTGGTGATTCTTTCTACTATGGAAAAGGGC  
 TGATCAACGTACAGGCGGCAGCTCAGTAA (配列番号21)

GcM96のアミノ酸配列は以下に提供される。

【0394】

AQSVPYGVVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSH  
 PDLKVAGGASMPSETNPFQDNNSHGTHVAGTVAAALNNNI  
 GVLGVAPSASLYAVKVLAADGSGQYSWIINGIEWAIANNM  
 DVINMSLGATSGSAALKAAVDKAVASGQVVVAAAGNEGTD  
 GPSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSTNTRASFSVGPELDVM  
 APGVS IQSTLPANKYGAQNGTSM AAPHVAGAAALILSKHP  
 SWTNNQVRS SLEQT TTKLGD SFYYGKGLINVQAAAQ (配列番  
 号22)

10

合成された遺伝子GcM100のヌクレオチド配列は以下に提供される。

【0395】

GCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAAATTAAGCC  
 CCTGCTCTGCACTCTCAAGGCTACACTGGATCAAATGTTA  
 AAGTAGCGGTTATCGACAGCGGTATCGACTCGAGCCATCC  
 AGATCTTAAAGTCGCTGGAGGGGCTTCTATGGTGCCTCC  
 GAAACA AACCCGTTTCAAGATAACAATTCTCATGGCACAC  
 ACGCAGCAGGAACGGTTGCGGCGTTAAACAATAATATTGG  
 CGTGCTTGGTGTAGCCCCGTCTGCTTCGCTCTACGCCGTT  
 AAAGTTCTTGCAGCAGACGGATCAGCACAACTCATGGA  
 TTATCAACGGCATCGAATGGGCCATCGCGAATAACATGGA  
 TGTAATCAACATGGCACTGGGAGCACCAAGCGGCAGTGCG  
 GCACTTAAAGCAGCAGTTGATAAAGCTGTTGCATCTGGTG  
 TCGTCGTAGTAGCGGCAGCTGGGAATGAGGGGAACATCCGG  
 ATCATCGAGTACCCTCGGTTATCCAGGCAAGTACCCTTCA  
 GTGATTGTCAGTGGGCGCTGTAGACTCTTCAAATCAACGTG  
 CCTCTTTTCTCCTCCGTGGGACCGGAGCTGGATGTCATGGC  
 CCTTGGCGTTTCTATTCAATCGACGCTTCCAGCAAACAAG  
 TATGGTGCAGCAAACGGGACTTCCATGGCCTCGCCGCATG  
 TAGCTGGGGCGGC CCGCATTTGATTTCTTTCTAAGCACCCGA  
 A  
 CTGGACAAACA CTCAAGTCCGCAGCAGTTTAGAAAACACC  
 ACTACAAAACCTTGGTGATTCTTTCTACTATGGAAAAGGGC  
 TGATCAACGTACAGGCGGCAGCTCAGTAA (配列番号23)

20

30

GcM100のアミノ酸配列は以下に提供される。

【0396】

AQSVPYGVVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSH  
 PDLKVAGGASMPSETNPFQDNNSHGTHAAGTVAAALNNNI  
 GVLGVAPSASLYAVKVLAADGSAQYSWIINGIEWAIANNM  
 DVINMALGAPSGSAALKAAVDKAVASGVVVVAAAGNEGTS  
 GSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRFSSVGPELDVM  
 APGVS IQSTLPANKYGAQNGTSM ASPHVAGAAALILSKHP  
 NWTNTQVRS SLENT TTKLGD SFYYGKGLINVQAAAQ (配列番  
 号24)

40

b) 合成遺伝子GcM90~94及びGcM100を用いるコンビナトリアルライブラ  
 リCG1~CG5及びCG8の構築

【表 6】

表3-1. 導入可能な置換及びコンビナトリアルライブラリCG1~CG5及びCG8の構築に使用されるプライマーの一覧

合成遺伝子 (テンプレートすなわち親)	ライブラリ名	導入された置換	プライマー名	プライマー配列
GcM90	CG1	G53S	1 S53 f	/5Phos/CTTCTATGGTGCCGTCCGAAACAAACCGTTTCAAG(配列番号25)
		A68V	1 V68 f	/5Phos/TCATGGCACACACGTCGCAGGAACCGTTGCGGCG(配列番号26)
		A102G	1 G102 f	/5Phos/AGCAGACGGATCAGGCCAATACTCATGGATTATCAAC(配列番号27)
		T129P	1 P129 f	/5Phos/TGAGCCTGGGAGCACCAAGCGGCAATGCGGCACCTTAAAG(配列番号28)
		T185Q	1 Q185 f	/5Phos/TAGACTCTTCAAATCAACGTGCCTCTTTTTCTCCGTG(配列番号29)
GcM91	CG2	V59Q	2 Q59 f	/5Phos/GAAACAAACCGTTTCAAAGATAACAATTCTCATG(配列番号30)
		V108I	2 I108 f	/5Phos/ATACTCATGGATTATCAACGGCATCGAATGGGCCATC(配列番号31)
		Q147V	2 V147 f	/5Phos/TGTTGCATCTGGTGTCTGCTAGTAGCGGCAGCTGG(配列番号32)
		A211G	2 G211 f	/5Phos/ATCGACGCTTCCAGGGAACAAGTATGGTGCGCAAAAC(配列番号33)
		Q252N	2 N252 f	/5Phos/CAGCAGTTTAGAAAACACCACATACAAAACCTTGGTG(配列番号34)
GcM92	CG3	A61N	3 N61 f	/5Phos/CAAACCGTTTCAAAGATAACAATTCTCATGGCACACAC(配列番号35)
		E87S	3 S87 f	/5Phos/TTGGTGTAGCCCCGTCTGCTTCCGCTCTACGCCGTTAAAG(配列番号36)
		I124M	3 M124 f	/5Phos/TGGATGTAATCAACATGAGCCTGGGAGCACCAAGCGC(配列番号37)
		P161S	3 S161 f	/5Phos/AGGGAACATCCGGATCATCGAGTACCCTCGTTATCCAG(配列番号38)
		A224S	3 S224 f	/5Phos/GACTTCCATGGCCTCGCCCATGTAGCTGGGGCGGC(配列番号39)
GcM93	CG4	Q62N	4 N62 f	/5Phos/GTTTCAAGATAACAATTCTCATGGCACACACGTCGC(配列番号40)
		N100G	4 G100 f	/5Phos/GTTCTTGACGACGACGGATCAGGCCAATACTCATG(配列番号41)
		A125S	4 S125 f	/5Phos/ATGTAATCAACATGAGCCTGGGAGCACCAAGCGGCAG(配列番号42)
		D159S	4 S159 f	/5Phos/GGAATGAGGGAACATCCGGATCATCGAGTACCCTCGG(配列番号43)
		S240N	4 N240 f	/5Phos/CTTTCTAAGCACCCGAACTGGACAAAACACTCAAGTCCG(配列番号44)
GcM94	CG5	T63S	5 S63 f	/5Phos/TCAAGATAACAATTCTCATGGCACACACGTCGCAGG(配列番号45)
		A101S	5 S101 f	/5Phos/TGCAGCAGACGGATCAGGCCAATACTCATGGATTATC(配列番号46)
		V126L	5 L126 f	/5Phos/AATCAACATGAGCCTGGGAGCACCAAGCGGCAGT(配列番号47)
		T183S	5 S183 f	/5Phos/CGCTGTAGACTCTTCAAATCAACGTGCCTCTTTTTCC(配列番号48)
		N244T	5 T244 f	/5Phos/GAACTGGACAAACACTCAAGTCCGACAGTTTAG(配列番号49)
GcM100	CG8	A68V	1 V68 f	/5Phos/TCATGGCACACACGTCGCAGGAACCGTTGCGGCG(配列番号50)
		A102G	1 G102 f	/5Phos/AGCAGACGGATCAGGCCAATACTCATGGATTATCAAC(配列番号51)
		A211G	2 G211 f	/5Phos/ATCGACGCTTCCAGGGAACAAGTATGGTGCGCAAAAC(配列番号52)
		A125S	4 S125 f	/5Phos/ATGTAATCAACATGAGCCTGGGAGCACCAAGCGGCAG(配列番号53)

10

20

## 【0397】

各合成遺伝子を p H P L T - B P N ' - S 7 8 N - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q 親分子に組み込んだ。6つの合成遺伝子 G c M 9 0 - 9 4 を含有しているプラスミドを得て、G c M 1 0 0 をテンプレートとして用いて各位置でコンビナトリアルライブラリを作成した(表3-1)。2つの異なる遺伝子、G c M 9 5 及び G c M 9 6 も解析のため同様に合成したが、ライブラリのための親 DNA としては使用しなかった。これらの遺伝子は、p H P L T - B P N ' - S 7 8 N - G 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q 親分子上に9つの変異を有する。

30

## 【0398】

合成遺伝子 G c M 9 0 - 9 4 及び G c M 1 0 0 を含有している親プラスミド(テンプレートDNA)は、2マイクログラムのDNA及びメチラーゼ(NEB)を用い、NEBプロトコルに従ってメチル化した。次いでDNA Clean and Concentratorキット(Zymo Research)を用いてメチル化DNAを精製した。Q U I K C H A N G E (登録商標) Multi Site - Directed Mutagenesis Kit(「QCMSキット」、Stratagene)を用いて、製造元のプロトコルに従って(各プライマーをプロトコルに示されている50ngの代わりに86.5ng使用したライブラリCG3及びCG4は除く)、コンビナトリアルライブラリCG1~5及びCG8を作成した(それぞれのテンプレート及びプライマーの組み合わせについては表3-1を参照されたい)。各ライブラリに、所望の置換を導入するために使用されたすべてのプライマーを表3-1に列挙する。Integrated DNA Technologiesによりこれらが合成され、提供された。各ライブラリのQCMS反応の完了後、0.5~1µLのDpnI(QCMSキット)を加え37で1~4時間インキュベートし、続いて更に0.5~1µLのDpnIを加え、更に37で1~4時間インキュベートすることでテンプレートDNAを消化した。枯草菌(B. subtilis)を効率的に形質転換させるため、形質転換前にQCMS反応混合物のDNAを増幅させ、形質転換体を実施例2に記載のように増殖させた。

40

50

更なる変異体 BPN' - v3 + S78N を DNA 2.0 により合成した。以下の置換をそれぞれ BPN' - v3 + S78N 親分子の中に導入した：Q59G, N62Q, V68A, S89Y, A92G, I108V, I115V, M124T, P129L, A138T, V147L, S161P, Y167A, P172V, G211T, L267V, 及び A273S。

【0399】

上記のすべてのコンビナトリアルライブラリ変異体及び DNA 2.0 で合成した変異体を、16 及び pH 8 での洗剤組成物 1 の BMI 微小標本アッセイ、並びに 16 及び pH 8 での洗剤組成物 2 の BMI 微小標本アッセイを用いて、クリーニング性能について試験した。タンパク質含量は TCA アッセイを用いて測定した。実施例 1 に記載のようにアッセイを実施し、BPN' - v3 (PI 値 1.0 を有する) と比較して性能指数を算出した。

10

【0400】

以下の BPN' 変異体：S063T - S078N - G097A - S101A - G128A - S183T - Y217Q - T244N, N061A - S078N - G097A - G128A - Y217Q - S224A, S053G - S078N - G097A - G128A - P129T - Q185T - Y217Q, S063T - S078N - G097A - S101A - G128A - S183T - Y217Q, S063T - S078N - G097A - S101A - G128A - Y217Q, S063T - S078N - G097A - S101A - G128A - Y217Q - T244I, 及び S078N - G097A - G128A - P129T - Y217Q, からなる群から選択される少なくとも 1 組のアミノ酸置換を含む BPN' アミノ酸配列 (配列番号 2) は、pH 8 及び 16 での洗剤組成物 1 の BMI 微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v3 と比較して 1.0 超、少なくとも 1.1、少なくとも 1.2、少なくとも 1.3、少なくとも 1.4、少なくとも 1.5、少なくとも 1.6、少なくとも 1.7、少なくとも 1.8、少なくとも 1.9、少なくとも 2、1.0 超 ~ 約 10、1.0 超 ~ 約 8、又は 1.0 超 ~ 約 5 の PI 値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号 2 の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN' (配列番号 2) と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN' 及び BPN' - v3 よりも PI 値が大きい。本発明は、本 BMI 微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' (配列番号 2) と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに / あるいは、BPN' - v3 と比較して 1 超 ~ 約 5 の PI 値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号 2 の配列に対して少なくとも 60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97% 又は 98% の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも 1 組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号 2 の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような 1 つの変異体を含む組成物 (クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも 1 つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

20

30

【0401】

本 BMI 微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに / あるいは、BPN' - v3 と比較して 1.0 超 ~ 約 5 の PI 値を有する、スブチリシンプロテアーゼ変異体も提供され、この変異体は配列番号 2 に対して少なくとも 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 又は 99% の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ここで、この変異体は、X040E, X053G, X059V, X061A, X062H/Q, X068A, X078N, X087E, X101A, X102A, X108V, X124I, X125A, X126V, X129T, X147Q, X159D, X183T, X185T, X211A, X224A, X244I/N, X252Q, 及び X274D, の群から選択される少なくとも 1 つの置換を含み、選択的に X040E, X053G, X059V, X06

40

50



1 A , X 0 6 2 H / Q , X 0 6 8 A , X 0 7 8 N , X 0 8 7 E , X 1 0 1 A , X 1 0 2 A , X 1 0 8 V , M 1 2 4 I , S 1 2 5 A , L 1 2 6 V , P 1 2 9 T , V 1 4 7 Q , S 1 5 9 D , S 1 8 3 T , Q 1 8 5 T , G 2 1 1 A , S 2 2 4 A , T 2 4 4 I / N , N 2 5 2 Q , 及び A 2 7 4 D , の群から選択される少なくとも1つの置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物（クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない）、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

#### 【0402】

以下のBPN'変異体：G097A - G128A - Y217Q , N061A - S078N - S087E - G097A - G128A - Y217Q - S224A , Q059V - S078N - G097A - G128A - G211A - Y217Q , Q059V - S078N - G097A - G128A - V147Q - Y217Q , Q059V - S078N - G097A - I108V - G128A - Y217Q - N252Q , S053G - S078N - G097A - G128A - P129T - Y217Q , S078N - G097A - G128A - G211A - Y217Q , S078N - G097A - G128A - Q185T - Y217Q , S078N - G097A - G128A - V147Q - Y217Q , S078N - G097A - G128A - Y217Q , S078N - G097A - G128A - Y217Q - S224A , 及びS078N - G097A - G128A - Y217Q - S224A - A274D , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列（配列番号2）は、pH 8及び16での洗剤組成物1のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v3と比較して約1.0のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'（配列番号2）と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'よりもPI値が大きい。本発明は、本BMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'（配列番号2）と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN' - v3と比較して約1.0のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物（クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない）、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

#### 【0403】

以下のBPN'変異体：1組のアミノ酸置換S078N - G097A - I108V - G128A - V147Q - Y217Q , を含むアミノ酸配列（配列番号2）は、pH 8及び16での洗剤組成物1のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいてBPN' - v3と比較して約0.9のPI値を有すると判定され、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、本アッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、BPN' - v3と比較して0.9のPI値を有する、並びに/あるいは、BPN'と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、又は98%の同一性を有するアミノ酸配列、並びに上記アミノ酸置換の組を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物（クリーニング組成物が挙げら

10

20

30

40

50

れるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0404】

以下のBPN'変異体：Q059V-S078N-G097A-I108V-G128A-V147Q-G211A-Y217Q-N252Q, S078N-G097A-I108V-G128A-V147Q-G211A-Y217Q, S078N-G097A-I108V-G128A-V147Q-G211A-Y217Q-N252Q, S078N-G097A-I108V-G128A-V147Q-Y217Q-N252Q, 及びS078N-S087E-G097A-M124I-G128A-Y217Q-S224A, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列(配列番号2)は、pH 8及び16での洗剤組成物1のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'-v3と比較して0.5以上0.9未満のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、タンパク質分解活性を有するプロテアーゼ変異体を含み、変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列、並びに上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

10

20

【0405】

以下のBPN'変異体：S063T-S078N-G097A-S101A-G128A-S183T-Y217Q, S063T-S078N-G097A-S101A-G128A-S183T-Y217Q-T244N, S063T-S078N-G097A-S101A-G128A-Y217Q, 及びS063T-S078N-G097A-S101A-G128A-Y217Q-T244I, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列(配列番号2)は、pH 8及び16での洗剤組成物2のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'-v3と比較して1.0超、少なくとも1.1、少なくとも1.2、少なくとも1.3、少なくとも1.4、少なくとも1.5、少なくとも1.6、少なくとも1.7、少なくとも1.8、少なくとも1.9、少なくとも2、1.0超~約10、1.0超~約8、又は1.0超~約5のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'よりもPI値が大きい。本発明は、本BMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN'-v3と比較して約1.0超~約5のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

30

40

【0406】

以下のBPN'変異体：G097A-G128A-Y217Q, N061A-S078N-G097A-G128A-Y217Q-S224A, N061A-S078N-S0

50

87E - G097A - G128A - Y217Q - S224A, Q059V - S078N - G097A - G128A - G211A - Y217Q, Q059V - S078N - G097A - G128A - V147Q - Y217Q, Q059V - S078N - G097A - I108V - G128A - Y217Q - N252Q, S053G - S078N - G097A - G128A - P129T - Q185T - Y217Q, S053G - S078N - G097A - G128A - P129T - Y217Q, S078N - G097A - G128A - G211A - Y217Q, S078N - G097A - G128A - P129T - Y217Q, S078N - G097A - G128A - Y217Q, S078N - G097A - G128A - Y217Q - S224A, 及びS078N - G097A - G128A - Y217Q - S224A - A274D, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列(配列番号2)は、pH 8及び16での洗剤組成物2のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v3と比較して約1.0のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'よりもPI値が大きい。本発明は、本BMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN' - v3と比較して約1のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

#### 【0407】

以下のBPN'変異体：S078N - G097A - G128A - V147Q - Y217Q及びS078N - G097A - I108V - G128A - V147Q - Y217Q, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列(配列番号2)は、pH 8及び16での洗剤組成物2のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v3と比較して約0.9のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、本アッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、BPN' - v3と比較して約0.9のPI値を有する、並びに/あるいは、BPN'と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列、並びに上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により更に詳細に記載されるような、少なくとも1つのこのような変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられる)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いてクリーニングの必要な物品又は表面をクリーニングするための方法も含まれる。

#### 【0408】

以下のBPN'変異体：Q059V - S078N - G097A - I108V - G128A - V147Q - G211A - Y217Q - N252Q, S078N - G097A - I108V - G128A - V147Q - G211A - Y217Q, S078N - G097A - I108V - G128A - V147Q - G211A - Y217Q - N252Q, S078

10

20

30

40

50

N - G 0 9 7 A - I 1 0 8 V - G 1 2 8 A - V 1 4 7 Q - Y 2 1 7 Q - N 2 5 2 Q , 及び S 0 7 8 N - S 0 8 7 E - G 0 9 7 A - M 1 2 4 I - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 2 4 A , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列(配列番号2)は、pH 8及び16での洗剤組成物2のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v 3と比較して0.5以上0.9未満のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、タンパク質分解活性を有するプロテアーゼ変異体を含み、変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列、並びに上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所に更に詳細に記載されるような、少なくとも1つのこのような変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられる)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いてクリーニングの必要な物品又は表面をクリーニングするための方法も含まれる。

10

## 【0409】

## (実施例4)

BPN'変異体の生産及びクリーニング性能

QUIKCHANGE(登録商標)Multi Site-Directed MutagenesisによるBPN'変異体LC1~LC4の作製

20

QUIKCHANGE(登録商標)Multi Site-Directed Mutagenesis Kitを用い、異なる親プラスミドからBPN'変異体を構築した。NEB Damメチラーゼキットを用いて、親プラスミド(表4-1)を、77.5µLのH<sub>2</sub>O+10µLの10X緩衝液+0.25µLのSAM+2uLのDAMメチラーゼ+10µLのミニプレップDNA(約150ng/µL)を含有させた反応液中で、37で一晩メチル化した。メチル化したプラスミドDNAを、QIAGEN(登録商標)PCR精製キットを用い精製した。2.5µLの5X緩衝液+0.5µLのプライマー1(25µM)+0.5µLのプライマー2(25µM)+1µLのdNTP's+1µLの酵素ブレンド+18µLのH<sub>2</sub>O+1.5µLのDNAを含有させた反応混合液で、各DNAテンプレートに対してQUIKCHANGE(登録商標)Multi Site-Directed Mutagenesis反応を行った。使用したPCRプログラムは以下の通りであった:95で1分、(95で1分、53で1分、65で9:39分)×29サイクル、65で10分、4で保持。プライマー配列は表4-2に示される。すべての反応で、MJ Research PTC-200 Peltier thermal cyclerを用いてPCRを実施した。1µLのDpnIをQUIKCHANGE(登録商標)Multi Site-Directed Mutagenesis反応物に加え、37で一晩置くことでPCRサンプルから親DNAを除去した。形質転換頻度を増加させるために、製造元のプロトコルに従ってIllustra TempliPhiキットを用い、ローリング・サークル型増幅(RCA)させることで、DpnI消化した反応物を増幅させた。枯草菌(B. subtilis)細胞(aprE, nprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo)を、各1µLのRCA反応物で形質転換し、形質転換させた細胞を、10ppmのネオマイシンを含有しているLA+1.6%スキムミルクプレートに蒔き、37で一晩インキュベートした。一晩増殖物からコロニーを選択し、「pURETaq Ready-To-Go PCR Beads」(Amersham)を用いて配列決定するためにコロニーPCRを実施した。PCR及び配列決定に使用したプライマーは、pHPLT F1(/5PHOS/TACATATGAGTTATGCAAGTTTG(配列番号54))及びpHPLT seq R1(/5PHOS/TTATCCTTTACCTTGTCCTC(配列番号55))であった。適切な配列を有するコロニーを凍結した。実施例2に記載のように、尿素を含有しているMOPS系培地中で、37で68時間にわたり、96ウェルマイクロタイタープレートで

30

40

50

枯草菌 (*B. subtilis*) 形質転換体を増殖させることで、BPN' 変異体タンパク質を生産させた。

【表 7】

表4-1. 親プラスミド及びBPN' 変異体LC1~LC4の生成に使用したプライマー		
親プラスミド	導入した変異	使用したプライマー
BPN' - G097A - G128A - Y217Q - S024G - N025G - N061P - S101N (LC1と呼ぶ)	A128S	A128Sf, A128Sr
BPN' - G097A - G128A - Y217Q - S053G - N061P - S101N - V203Y (LC2と呼ぶ)	A128S	A128Sf, A128Sr
BPN' - G097A - G128A - Y217Q - S024G - N025G - S053G - T055P - N061P - S101N - V203Y (LC3と呼ぶ)	A128S	A128Sf, A128Sr
BPN' - G097A - G128A - Y217Q - S024G - N025G - S053G - T055P - N061P - S101N - V203Y (LC4と呼ぶ)	P55T	P55Tf, P55Tr

10

【表 8】

表4-2. BPN' 変異体LC1~LC4を作成するためのQUIKCHANGE(登録商標)Multi Site-Directed Mutagenesis反応に使用されたプライマー配列	
プライマー名	プライマー配列(5'~3')
A128Sf	/5Phos/CAACATGAGCCTGGGATCACCAAGCGGCAGTGCGG(配列番号56)
A128Sr	/5Phos/CCGCACTGCCGCTTGGTGATCCCAGGCTCATGTTG(配列番号57)
P55Tf	/5Phos/CTATGGTGCCGGGCGAAACAAACCCGTTTCAAGATCCG(配列番号58)
P55Tr	/5Phos/CGGATCTTGAACGGGTTTGTTCGCCCGGCACCATAG(配列番号59)

20

## 【0410】

更なるBPN' 変異体LC5~LC37の生成

BPN' 核酸を親遺伝子として含有させた発現プラスミドpHPLT - BPN' partial opt (図3を参照されたい)を用いて、連続的にLC5~LC37と名付けられた更に33種のBPN' 変異体をDNA2.0により作成した。LC5~LC37のBPN' 変異体は、それぞれ以下の通りである: BPN' - P52L - V68A - G97A - I111V, BPN' - I111V - M124V - Y167A - Y217Q, BPN' - Y104N - G128A - Y217Q, BPN' - M124V - Y167A - Y217Q, BPN' - I111V - M124V - Y217Q, BPN' - P52L - V68A - G97A, BPN' - G97A - I111V - M124V, BPN' - V68A - A92G - G97A, BPN' - G97A - I111V - M124V - Y167A - Y217Q, BPN' - P52L - V68A - I111V - Y217Q, BPN' - P52L - V68A - I111V, BPN' - V68A - A92G - I111V, BPN' - P52L - V68A - G97A - I111V - Y217Q, BPN' - V68A - G97A - I111V, BPN' - G97A - I111V - Y217Q, BPN' - G97A - I111V - M124V - Y167A, BPN' - S89Y - I111V - M124V, BPN' - V68A - S89Y - I111V, BPN' - V68A - A92G - Y217Q, BPN' - I111V - Y167A - Y217Q, BPN' - G97A - I111V - Y167A - Y217Q, BPN' - G97A - I111V - M124V - Y217Q, BPN' - V68A - I111V - Y167A - Y217Q, BPN' - I111V - G128A - Y217Q, BPN' - G97A - M124V - Y217Q, BPN' - V68A - Y167A - Y217Q, BPN' - I111V - M124V - Y167A, BPN' - N62Q - G97A - I111V, BPN' - G97A - M124V - Y167A - Y217Q, BPN' - G97A - L126A - Y217Q, BPN' - V68A - I111V - Y217Q, BPN' - S89Y - M124V - Y217Q, 及びBPN' - L96T - G97A - Y217Q。同様に、プラスミドpHPLT - BPN' partial optもDNA2.0により作成した。

30

40

## 【0411】

実施例2に記載のように、形質転換体をつつき、マイクロタイタープレートに植菌し、増殖させた。16及びpH 8での洗剤組成物2のBMI微小標本アッセイを用いて、

50

変異体をクリーニング性能についてアッセイした。タンパク質含量はT C Aアッセイを用いて測定した。実施例1に記載のようにアッセイを実施し、B P N ' - v 3 ( P I 値 1 . 0 を有する ) と比較して性能指数を算出した。

【 0 4 1 2 】

以下のB P N ' 変異体：G 0 9 7 A - I 1 1 1 V - M 1 2 4 V - Y 2 1 7 Q , G 0 9 7 A - I 1 1 1 V - Y 1 6 7 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - V 2 0 3 Y - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - T 0 5 5 P - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 S - V 2 0 3 Y - Y 2 1 7 Q , 及びV 0 6 8 A - A 0 9 2 G - Y 2 1 7 Q , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むB P N ' アミノ酸配列(配列番号2)は、p H 8 及び1 6 での洗剤組成物2のB M I 微小標本クリーニングアッセイにおいて、B P N ' - v 3 と比較して1 . 0 超、少なくとも1 . 1、少なくとも1 . 2、少なくとも1 . 3、少なくとも1 . 4、少なくとも1 . 5、少なくとも1 . 6、少なくとも1 . 7、少なくとも1 . 8、少なくとも1 . 9、少なくとも2、1 . 0 超~約1 0、1 . 0 超~約8、又は1 . 0 超~約5のP I 値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、B P N ' (配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、B P N ' よりもP I 値が大きい。本発明は、本B M I 微小標本クリーニングアッセイにおいて、B P N ' (配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、B P N ' - v 3 と比較して1 . 0 超~約5のP I 値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号2の配列に対して少なくとも6 0 %、7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %又は9 8 %の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本B M I 微小標本クリーニングアッセイにおいて、B P N ' と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、B P N ' - v 3 と比較して1 . 0 超~約5のP I 値を有する、スブチリシンプロテアーゼ変異体も提供され、この変異体は配列番号2に対して少なくとも8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %又は9 9 %の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ここで、この変異体は、X 0 2 4 G , X 0 2 5 G , X 0 5 2 L , X 0 5 3 G , X 0 5 5 P , X 0 6 1 P , X 0 6 2 Q , X 0 6 8 A , X 0 8 9 Y , X 0 9 2 G , X 0 9 6 T , X 0 9 7 A , X 1 0 1 N , X 1 0 4 N , X 1 1 1 V , X 1 2 4 V , X 1 2 6 A , X 1 2 8 A / S、X 1 6 7 A , X 2 0 3 Y , 及びX 2 1 7 Q , の群から選択される少なくとも1つの置換を含み、選択的に、S 0 2 4 G , N 0 2 5 G , P 0 5 2 L , S 0 5 3 G , T 0 5 5 P , N 0 6 1 P , N 0 6 2 Q , V 0 6 8 A , S 0 8 9 Y , A 0 9 2 G , L 0 9 6 T , G 0 9 7 A , S 1 0 1 N , Y 1 0 4 N , I 1 1 1 V , M 1 2 4 V , L 1 2 6 A , G 1 2 8 A / S、Y 1 6 7 A , V 2 0 3 Y , 及びY 2 1 7 Q , の群から選択される少なくとも1つの置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【 0 4 1 3 】

以下のB P N ' 変異体：G 0 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , G 0 9 7 A - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q , G 0 9 7 A - I 1 1 1 V - Y 2 1 7 Q , I 1 1 1 V - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , I 1 1 1 V - M 1 2 4 V - Y 1 6 7 A , I 1 1 1 V - M 1 2 4 V - Y 2 1 7 Q , L 0 9 6 T - G 0 9 7 A - Y 2 1 7 Q , N 0 6 2 Q - G 0 9 7 A - I 1 1 1 V , S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 S - V 2 0 3 Y - Y 2 1 7 Q , S 0 8 9 Y - M 1 2 4 V - Y 2 1 7 Q , 及びV 0 6 8 A - I 1 1 1 V - Y 2 1 7 Q , からなる

群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列(配列番号2)は、pH 8及び16での洗剤組成物2のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'-v3と比較して約1.0のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。本発明は、本BMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN'-v3と比較して約1.0のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'よりもPI値が大きく、BPN'-v3と比較して約1.0のPI値を有する。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

10

## 【0414】

以下のBPN'変異体：G097A-I111V-M124V, G097A-L126A-Y217Q, G097A-M124V-Y217Q, I111V-Y167A-Y217Q, M124V-Y167A-Y217Q, P052L-V068A-G097A, S089Y-I111V-M124V, V068A-A092G-G097A, V068A-A092G-I111V, V068A-G097A-I111V, V068A-S089Y-I111V, 及びY104N-G128A-Y217Q, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列(配列番号2)は、pH 8及び16での洗剤組成物2のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'-v3と比較して約0.9のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、本アッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、BPN'-v3と比較して約0.9のPI値を有する、並びに/あるいは、BPN'と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列、並びに上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

20

30

## 【0415】

以下のBPN'変異体：G097A-M124V-Y167A-Y217Q, V068A-Y167A-Y217Q, G097A-I111V-M124V-Y167A, I111V-M124V-Y167A-Y217Q, V068A-I111V-Y167A-Y217Q, G097A-I111V-M124V-Y167A-Y217Q, 及びP052L-V068A-I111V, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列(配列番号2)は、pH 8及び16での洗剤組成物2のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'-v3と比較して0.5以上0.9未満のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、タンパク質分解活性を有するプロテアーゼ変異体を含み、変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91

40

50

％、92％、93％、94％、95％、96％、97％又は98％の同一性を有するアミノ酸配列、並びに上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物（クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない）、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0416】

（実施例5）

BPN' 変異体のクリーニング性能

親BPN' に基づく変異体をDNA2.0により作成した。実施例2に記載のように変異体を増殖させ、16及びpH8での洗剤組成物1のBMI微小標本アッセイ、16及びpH8での洗剤組成物4のBMI微小標本アッセイ、並びに16及びpH8での洗剤組成物4の卵微小標本アッセイで、クリーニング性能について試験した。タンパク質含量はTCAアッセイを用いて測定した。実施例1に記載のようにアッセイを実施し、BPN' - v3（PI値1.0を有する）と比較して性能指数を算出した。

【0417】

以下のBPN' 変異体：N061P - G097A - S101N - G128A - P210S - Y217Q, S024G - N025G - S053G - N061P - G097A - S101N - G128A - P210S - Y217Q, S024G - N025G - S053G - N061P - G097A - S101N - G128S - Y217Q, 及びS024G - N025G - S053G - N061P - S078N - G097A - S101N - I111V - G128S - Y217Q, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN' アミノ酸配列（配列番号2）は、pH8及び16での洗剤組成物4のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v3と比較して1.0超、少なくとも1.1、少なくとも1.2、少なくとも1.3、少なくとも1.4、少なくとも1.5、少なくとも1.6、少なくとも1.7、少なくとも1.8、少なくとも1.9、少なくとも2.0超～約10、1.0超～約8、又は1.0超～約5のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'（配列番号2）と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN' よりもPI値が大きい。本発明は、本BMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'（配列番号2）と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN' - v3と比較して1.0超～約5のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号2の配列に対して少なくとも60％、70％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％又は98％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物（クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない）、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0418】

以下のBPN' 変異体：G097A - G128A - Y217Q, G097A - G128A - P210S - Y217Q, G097A - G128S - P210S - Y217Q, G097A - I111V - M124I - Y217Q, G097A - I111V - M124V - P210S - Y217Q, G097A - N123Q - P210S - Y217Q, G097A - N123Q - Y217Q, N061P - G097A - G128A - P210S - Y217Q, N061P - G097A - G128S - Y217Q, N061P - G097A - I111V - M124V - Y217Q, N061P - G097A - N123Q - Y217Q, N061P - G097A - S101N - I111V - M124V - Y217Q, N0

10

20

30

40

50



6 1 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - N 1 2 3 Q - Y 2 1 7 Q , N 0 6 1 P - G 1 0 2 A - P 1 2 9 S - Y 2 1 7 Q , N 0 6 1 P - N 0 6 2 Q - G 0 9 7 A - G 1 0 0 N - S 1 0 1 N - Y 2 1 7 Q , N 0 6 1 P - N 0 6 2 Q - G 0 9 7 A - G 1 0 0 N - Y 2 1 7 Q , N 0 6 1 P - N 0 6 2 Q - G 0 9 7 A - G 1 0 0 Q - P 2 1 0 S - Y 2 1 7 Q , N 0 6 1 P - N 0 6 2 Q - G 0 9 7 A - I 1 1 1 V - Y 2 1 7 Q , N 0 6 1 P - N 0 6 2 Q - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - I 1 1 1 V - Y 2 1 7 Q , N 0 6 1 P - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - I 1 1 1 V - M 1 2 4 I - Y 2 1 7 Q , N 0 6 1 P - S 0 7 8 N - G 1 0 2 A - I 1 1 1 V - P 1 2 9 S - Y 2 1 7 Q , N 0 6 2 Q - G 0 9 7 A - I 1 1 1 V - P 2 1 0 S - Y 2 1 7 Q , N 0 6 2 Q - G 0 9 7 A - I 1 1 1 V - Y 2 1 7 Q , N 0 6 2 Q - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - I 1 1 1 V - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - P 2 1 0 S - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - I 1 1 1 V - M 1 2 4 V - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - N 1 2 3 Q - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - N 0 6 2 Q - G 0 9 7 A - G 1 0 0 N - S 1 0 1 N - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - N 0 6 2 Q - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - I 1 1 1 V - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - S 1 0 1 N - G 1 0 2 A - P 1 2 9 S - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - M 1 2 4 I - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - I 1 1 1 V - M 1 2 4 V - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - G 1 0 2 A - P 1 2 9 S - P 2 1 0 S - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - G 1 0 2 A - P 1 2 9 S - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - N 0 6 2 Q - G 0 9 7 A - G 1 0 0 N - S 1 0 1 N - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - N 0 6 2 Q - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - I 1 1 1 V - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 - N 0 6 1 P - S 1 0 1 N - G 1 0 2 A - P 1 2 9 S - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - I 1 1 1 V - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q , S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q , 及び S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - I 1 1 1 V - M 1 2 4 V - Y 2 1 7 Q , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列(配列番号2)は、pH 8及び16での洗剤組成物4のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v3と比較して約1.0のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'よりもPI値が大きい。本発明は、本BMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN' - v3と比較して約1.0のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

#### 【0419】

以下のBPN'変異体：N061P - G097A - M124I - Y217Q, N061P - G097A - M124V - Y217Q, N061P - N062Q - G097A - G100D - Y217Q, N061P - N062Q - G097A - G100Q - S101N - Y217Q, N061P - N062Q - G097A - G100Q - Y217Q, N061P - N062Q - G100N - G102A - Y217Q, N061P - N062Q - S078N - G097A - G100N - I111V - Y217Q, S024G - N025G -

10

20

30

40

50

S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - M 1 2 4 I - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - M 1 2 4 I - Y 2 1 7 Q , 及び S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - N 1 2 3 Q - Y 2 1 7 Q , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列(配列番号2)は、pH 8及び16での洗剤組成物4のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v 3と比較して約0.9のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、本アッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、BPN' - v 3と比較して約0.9のPI値を有する、並びに/あるいは、BPN'と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列、並びに上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

10

#### 【0420】

pH 8及び16での洗剤組成物1又は4のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN' - v 3と比較して1.0超~約5のPI値を有する、スブチリシンプロテアーゼ変異体も提供され、この変異体は配列番号2に対して少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ここで、この変異体は、X 0 2 4 G , X 0 2 5 G , X 0 5 3 G , X 0 6 1 P , X 0 6 2 Q , X 0 7 8 N , X 0 9 7 A , X 1 0 0 D / N / Q , X 1 0 1 N , X 1 0 2 A , X 1 1 1 V , X 1 2 3 A / Q / V , X 1 2 4 I / V , X 1 2 8 A / S , X 1 2 9 S , X 2 1 0 S , X 2 1 7 Q , の群から選択される少なくとも1つの置換を含み、選択的に、S 0 2 4 G , N 0 2 5 G , S 0 5 3 G , N 0 6 1 P , N 0 6 2 Q , S 0 7 8 N , G 0 9 7 A , G 1 0 0 D / N / Q , S 1 0 1 N , G 1 0 2 A , I 1 1 1 V , N 1 2 3 A / Q / V , M 1 2 4 I / V , G 1 2 8 A / S , P 1 2 9 S , P 2 1 0 S , 及び Y 2 1 7 Q , の群から選択される少なくとも1つの置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'よりもPI値が大きい。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

20

30

#### 【0421】

以下のBPN'変異体：G 0 9 7 A - N 1 2 3 A - Y 2 1 7 Q , G 0 9 7 A - N 1 2 3 V - Y 2 1 7 Q , N 0 6 1 P - G 1 0 2 A - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q , N 0 6 1 P - S 1 0 1 N - G 1 0 2 A - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q , Y 2 1 7 Q , S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - I 1 1 1 V - N 1 2 3 Q - Y 2 1 7 Q , 及び G 1 0 2 A - N 1 2 3 Q - Y 2 1 7 Q , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列(配列番号2)は、pH 8及び16での洗剤組成物4のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v 3と比較して0.5以上0.9未満のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、タンパク質分解活性を有するプロテアーゼ変異体を含み、変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列、並びに上記群から選択

40

50

される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物（クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない）、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0422】

以下のBPN'変異体：N061P-G097A-G128S-Y217Q, N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-S101N-I111V-Y217Q, S024G-N025G-N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-G128S-Y217Q, 及びS024G-N025G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-I111V-G128S-Y217Q, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列（配列番号2）は、pH 8及び16での洗剤組成物1のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'-v3と比較して1.0超、少なくとも1.1、少なくとも1.2、少なくとも1.3、少なくとも1.4、少なくとも1.5、少なくとも1.6、少なくとも1.7、少なくとも1.8、少なくとも1.9、少なくとも2、1.0超～約10、1.0超～約8、又は1.0超～約5のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'（配列番号2）と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'よりもPI値が大きい。本発明は、本BMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'（配列番号2）と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN'-v3と比較して1.0超～約5のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物（クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない）、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0423】

以下のBPN'変異体：G097A-G128A-Y217Q, G097A-G128A-P210S-Y217Q, G097A-G128S-P210S-Y217Q, G097A-I111V-M124I-Y217Q, G097A-I111V-M124V-P210S-Y217Q, G097A-N123Q-P210S-Y217Q, G097A-N123Q-Y217Q, N061P-G097A-G128A-P210S-Y217Q, N061P-G097A-I111V-M124V-Y217Q, N061P-G097A-M124V-Y217Q, N061P-G097A-N123Q-Y217Q, N061P-G097A-S101N-I111V-M124V-Y217Q, N061P-G102A-P129S-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100N-S101N-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100Q-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-I111V-Y217Q, N061P-N062Q-S078N-G097A-G100N-I111V-Y217Q, N061P-S078N-G097A-I111V-M124I-Y217Q, N061P-S078N-G102A-I111V-P129S-Y217Q, N062Q-G097A-I111V-P210S-Y217Q, N062Q-G097A-I111V-Y217Q, N062Q-S078N-G097A-I111V-Y217Q, S024

10

20

30

40

50

G - N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - I 1 1 1 V - M 1 2 4 V - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - N 1 2 3 Q - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - N 0 6 2 Q - G 0 9 7 A - G 1 0 0 N - S 1 0 1 N - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - N 0 6 2 Q - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - I 1 1 1 V - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - S 1 0 1 N - G 1 0 2 A - P 1 2 9 S - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - G 1 0 2 A - P 1 2 9 S - P 2 1 0 S - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - N 0 6 2 Q - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - I 1 1 1 V - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - S 1 0 1 N - G 1 0 2 A - P 1 2 9 S - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - I 1 1 1 V - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q , S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q , 及び S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - I 1 1 1 V - M 1 2 4 V - Y 2 1 7 Q , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列(配列番号2)は、pH 8及び16での洗剤組成物1のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v3と比較して約1.0のPI値を有するものと判定されたがここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'よりもPI値が大きい。本発明は、本BMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN' - v3と比較して約1.0のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

#### 【0424】

以下のBPN'変異体：N061P - G097A - M124I - Y217Q, N061P - G097A - S101N - N123Q - Y217Q, N061P - N062Q - G097A - G100N - Y217Q, N061P - N062Q - G097A - G100Q - P210S - Y217Q, N061P - N062Q - G097A - G100Q - S101N - Y217Q, N061P - N062Q - G100N - G102A - Y217Q, S024G - N025G - S053G - N061P - G097A - S101N - M124I - Y217Q, S053G - N061P - G097A - S101N - I111V - M124V - Y217Q, S053G - N061P - G097A - S101N - M124I - Y217Q, S053G - N061P - G097A - S101N - N123Q - Y217Q, 及びS053G - N061P - N062Q - G097A - G100N - S101N - Y217Q, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列(配列番号2)は、pH 8及び16での洗剤組成物1のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v3と比較して約0.9のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、本アッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、BPN' - v3と比較して約0.9のPI値を有する、並びに/あるいは、BPN'と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性

10

20

30

40

50

を有するアミノ酸配列、並びに上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物（クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない）、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0425】

以下のBPN'変異体：G097A-N123A-Y217Q, G097A-N123V-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100D-Y217Q, N061P-S101N-G102A-G128S-Y217Q, Y217Q, N061P-G102A-G128S-Y217Q, S078N-G097A-I111V-N123Q-Y217Q, 及びG102A-N123Q-Y217Q, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列（配列番号2）は、pH 8及び16での洗剤組成物1のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'-v3と比較して0.5以上0.9未満のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、タンパク質分解活性を有するプロテアーゼ変異体を含み、変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列、並びに上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物（クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない）、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0426】

以下のBPN'変異体：アミノ酸置換N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q, の組を含むBPN'アミノ酸配列（配列番号2）は、pH 8及び16での洗剤組成物4の卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'-v3と比較して1.0超～約5のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'（配列番号2）と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'よりもPI値が大きい。本発明は、本卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'（配列番号2）と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN'-v3と比較して1.0超～約5のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号2に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸置換N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q, を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物（クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない）、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0427】

以下のBPN'変異体：G097A-G128A-Y217Q, N061P-G102A-P129S-Y217Q, N062Q-G097A-I111V-P210S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q, S024G-N025G-N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q, N061P-G097A-G128A-P210S-Y217Q, G097A-G128S-P210S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101

10

20

30

40

50

N - I 1 1 1 V - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q , N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q , 及び G 0 9 7 A - G 1 2 8 A - P 2 1 0 S - Y 2 1 7 Q , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列(配列番号2)は、pH 8及び16での洗剤組成物4の卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v3と比較して約1.0のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'よりもPI値が大きい。本発明は、本卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN' - v3と比較して約1.0のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

10

## 【0428】

20

以下のBPN'変異体：N061P - G097A - M124I - Y217Q, S053G - N061P - G097A - S101N - N123Q - Y217Q, S053G - N061P - G102A - P129S - P210S - Y217Q, G097A - I111V - M124V - P210S - Y217Q, G097A - N123Q - P210S - Y217Q, S053G - N061P - S101N - G102A - P129S - Y217Q, S053G - N061P - N062Q - G097A - S101N - I111V - Y217Q, N061P - N062Q - G097A - S101N - I111V - Y217Q, N061P - N062Q - G097A - I111V - Y217Q, N062Q - G097A - I111V - Y217Q, N061P - G097A - S101N - I111V - M124V - Y217Q, G097A - N123Q - Y217Q, N061P - G097A - I111V - M124V - Y217Q, S078N - G097A - I111V - M124V - Y217Q, S053G - S078N - G097A - I111V - G128S - Y217Q, S078N - G097A - G128S - Y217Q, S053G - N061P - G097A - G128S - Y217Q, N061P - N062Q - G097A - G100N - Y217Q, S024G - N025G - S053G - N061P - G097A - S101N - N123Q - Y217Q, N061P - G097A - S101N - N123Q - Y217Q, N061P - N062Q - G097A - G100Q - P210S - Y217Q, N061P - G097A - N123Q - Y217Q, S024G - N025G - S053G - N061P - G097A - S101N - M124I - Y217Q, S053G - N061P - G097A - S101N - M124I - Y217Q, N061P - G097A - I111V - M124I - Y217Q, N061P - G097A - M124V - Y217Q, S024G - N025G - S053G - N061P - N062Q - G097A - G100N - S101N - Y217Q, S024G - N025G - S053G - N061P - S101N - G102A - P129S - Y217Q, N061P - S078N - G102A - I111V - P129S - Y217Q, S053G - N061P - G102A - P129S - Y217Q, S024G - N025G - S053G - N061P - N062Q - G097A - S101N - I111V - Y217Q, N062Q - S078N - G097A - I111V - Y217Q, S024G - N025G - S053G - N061P - G097A - S101N - I111V - M124V - Y217Q, S053G - N061P - G097A -

30

40

50

S 1 0 1 N - I 1 1 1 V - M 1 2 4 V - Y 2 1 7 Q , G 0 9 7 A - I 1 1 1 V - M 1 2 4 I - Y 2 1 7 Q , Y 2 1 7 Q , N 0 6 1 P - N 0 6 2 Q - G 1 0 0 N - G 1 0 2 A - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - N 0 6 2 Q - G 0 9 7 A - G 1 0 0 N - S 1 0 1 N - Y 2 1 7 Q , N 0 6 1 P - N 0 6 2 Q - G 0 9 7 A - G 1 0 0 N - S 1 0 1 N - Y 2 1 7 Q , N 0 6 1 P - N 0 6 2 Q - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - G 1 0 0 N - I 1 1 1 V - Y 2 1 7 Q , N 0 6 1 P - N 0 6 2 Q - G 0 9 7 A - G 1 0 0 Q - Y 2 1 7 Q , N 0 6 1 P - S 1 0 1 N - G 1 0 2 A - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q , G 0 9 7 A - N 1 2 3 V - Y 2 1 7 Q , G 0 9 7 A - N 1 2 3 A - Y 2 1 7 Q , G 1 0 2 A - N 1 2 3 Q - Y 2 1 7 Q , N 0 6 1 P - N 0 6 2 Q - G 0 9 7 A - G 1 0 0 Q - S 1 0 1 N - Y 2 1 7 Q , S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - I 1 1 1 V - N 1 2 3 Q - Y 2 1 7 Q , N 0 6 1 P - N 0 6 2 Q - G 0 9 7 A - G 1 0 0 D - Y 2 1 7 Q , 及び N 0 6 1 P - G 1 0 2 A - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列(配列番号2)は、pH 8及び16での洗剤組成物4の卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v3と比較して0.5以上0.9以下のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、タンパク質分解活性を有し、及び/又は本卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v3と比較して0.5以上0.9以下のPI値を有するプロテアーゼ変異体を含み、変異体は配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、又は98%の同一性を有するアミノ酸配列、並びに上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

10

20

## 【0429】

pH 8及び16での洗剤組成物4の卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN' - v3と比較して1.0超~約5のPI値を有する、スブチリシンプロテアーゼ変異体も提供され、この変異体は配列番号2に対して少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ここで、この変異体は、X024G, X025G, X053G, X061P, X062Q, X078N, X097A, X100D/N/Q, X101N, X102A, X111V, X123A/Q/V, X124I/V, X128A/S, X129S, X210S, 及びX217Q, の群から選択される少なくとも1つの置換を含み、選択的に、S024G, N025G, S053G, N061P, N062Q, S078N, G097A, G100D/N/Q, S101N, G102A, I111V, N123A/Q/V, M124I/V, G128A/S, P129S, P210S, 及びY217Q, の群から選択される少なくとも1つの置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'よりもPI値が大きい。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

30

40

## 【0430】

(実施例6)

BPN'変異体の構築及びクリーニング性能

親BPN'に基づくBPN'コンビナトリアルライブラリはDNA2.0により作成されたものであり、ライゲーション反応物として供給された。枯草菌(B. subtilis)を効

50

率的に形質転換させるため、形質転換前にライゲーション反応混合物中のDNAを増幅させ、形質転換体を実施例2に記載のように増殖させた。これらの変異体を、16及びpH 8での洗剤組成物1及び洗剤組成物4の、BMI微小標本アッセイ、並びに16及びpH 8での洗剤組成物4の卵微小標本アッセイを用いて、クリーニング性能について試験した。TCAアッセイを用いてタンパク質含量を測定し、AAPFアッセイを用いてプロテアーゼ活性についてアッセイした。実施例1に記載のようにアッセイを実施し、BPN'-v3 (PI値1.0を有する)と比較して性能指数を算出した。

【0431】

以下のBPN'変異体：S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S038G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-N061P-S078N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, N061P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-N061P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-T055P-N061P-G097A-G128A-Y217Q, S053G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S053G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q-S249N, S053G-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S053G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S053G-T055P-N061P-S101N-G128A-Y217Q, S053G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, 及びT055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列(配列番号2)は、pH 8及び16での洗剤組成物1のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'-v3と比較して1.0超、少なくとも1.1、少なくとも1.2、少なくとも1.3、少なくとも1.4、少なくとも1.5、少なくとも1.6、少なくとも1.



7、少なくとも1.8、少なくとも1.9、少なくとも2.1.0超～約10、1.0超～約8、又は1.0超～約5のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'（配列番号2）と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'よりもPI値が大きい。本発明は、本BMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'（配列番号2）と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN'-v3と比較して1.0超～約5のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。

10

## 【0432】

以下のBPN'変異体：G097A-G128S-Y217Q, G097A-G128A-Y217Q, N025G-S078N-G097A-G128A-Y217Q, N025G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-I035V-T055P-N061P-S078N-G097A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A, S024G-N025G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-G128A-S130G-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-Y217Q, S024G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S038G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A, S024G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S101N-G128A-Y217Q, T055P-N061P-G097A-A116S-G128A, 及びT055P-N061P-S078N-G128A-Y217Q, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列(配列番号2)は、pH 8及び16での洗剤組成物1のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'-v3と比較して約1.0のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'よりもPI値が大きい。本発明は、本BMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'（配列番号2）と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN'-v3と比較して約1.0のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含

20

30

40

50

み、この変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物（クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない）、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

#### 【0433】

pH 8及び16での洗剤組成物1のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN'-v3と比較して1.0超~約5のPI値を有する、スプチリシンプロテアーゼ変異体も提供され、この変異体は配列番号2に対して少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ここで、この変異体は、X024G, X025G, X035V, X038G, X053G, X055P, X061P, X078N, X097A, X101N, X116S, X128A/S, X130G, X216Q, X217Q, 及びX249N, の群から選択される少なくとも1つの置換を含み、選択的に、S024G, N025G, I035V, S038G, S053G, T055P, N061P, S078N, G097A, S101N, A116S, G128A/S, S130G, Y216Q, Y217Q, 及びS249N, の群から選択される少なくとも1つの置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物（クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない）、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

#### 【0434】

以下のBPN'変異体：S024G-N025G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S053G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, 及びT055P-N061P-S078N-G128A-Y217Q, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列（配列番号2）は、pH 8及び16での洗剤組成物4のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'-v3と比較して1.0超、少なくとも1.1、少なくとも1.2、少なくとも1.3、少なくとも1.4、少なくとも1.5、少なくとも1.6、少なくとも1.7、少なくとも1.8、少なくとも1.9、少なくとも2.0、1.0超~約10、1.0超~約8、又は1.0超~約5のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'（配列番号2）と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'よりもPI値が大きい。本発明は、本BMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'（配列番号2）と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN'-v3と比較して1.0超~約5のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ

10

20

30

40

50

酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。

【0435】

以下のBPN'変異体：G097A - G128S - Y217Q, G097A - G128A - Y217Q, N025G - G097A - S101N - G128A - Y217Q, N025G - S038G - S053G - N061P - S078N - G097A - S101N - G128A - Y217Q, N025G - S053G - N061P - S078N - G128A - Y217Q, N025G - S053G - N061P - S078N - S101N - G128A - Y217Q, N025G - S053G - T055P - N061P - S078N - G097A - S101N - G128A - Y217Q, N025G - S053G - T055P - S078N - G097A - S101N - G128A - Y217Q, N025G - S078N - G097A - S101N - G128A - Y217Q, N025G - T055P - G097A - G128A - Y217Q, N025G - T055P - N061P - S078N - G097A - S101N - G128A - Y217Q, N025G - T055P - N061P - S078N - S101N - G128A - Y217Q, N061P - S101N - G128A - Y217Q, S024G - G097A - S101N - G128A - Y217Q, S024G - I035V - T055P - N061P - S078N - G097A - Y217Q, S024G - N025G - N061P - G097A - G128A - Y217Q, S024G - N025G - N061P - G097A - S101N - G128A - Y217Q, S024G - N025G - N061P - S078N - G097A - S101N - G128A, S024G - N025G - N061P - S078N - S101N - G128A - Y217Q, S024G - N025G - S053G - N061P - G097A - G128A - S130G - Y217Q, S024G - N025G - S053G - N061P - G128A - Y217Q, S024G - N025G - S053G - N061P - S078N - G097A - S101N - G128A - Y217Q, S024G - N025G - S053G - T055P - G097A - G128A - Y217Q, S024G - N025G - S053G - T055P - G097A - S101N - G128A - Y217Q, S024G - N025G - S053G - T055P - G097A - S101N - G128A - Y217Q, S024G - N025G - T055P - G097A - S101N - G128A - Y217Q, S024G - N025G - T055P - N061P - S078N - S101N - G128A - Y217Q, S024G - N025G - S053G - T055P - S078N - S101N - G128A - Y217Q, S024G - N025G - S053G - T055P - G097A - G128A - Y217Q, S024G - N025G - T055P - G097A - S101N - G128A - Y217Q, S024G - N025G - T055P - N061P - S078N - G097A - S101N - G128A - Y217Q, S024G - N061P - S078N - G097A - S101N - G128A - Y217Q, S024G - S038G - S053G - S078N - S101N - G128A - Y217Q, S024G - S053G - N061P - G097A - G128A - Y217Q, S024G - S053G - N061P - S078N - G097A - G128A - Y217Q, S024G - S053G - S078N - S101N - G128A - Y217Q, S024G - S053G - T055P - G097A - S101N - G128A - Y217Q, S024G - S053G - T055P - N061P - S078N - G097A - G128A - Y217Q, S024G - S053G - T055P - N061P - S101N - G128A - Y217Q, S024G - T055P - G097A - G128A - Y217Q, S024G - T055P - N061P - G097A - G128A - Y217Q, S024G - T055P - N061P - G097A - S101N - G128A, S024G - T055P - S078N - G097A - S101N - G128A - Y217Q, S053G - N061P - G097A -

S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 9 N , S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - T 0 5 5 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - T 0 5 5 P - N 0 6 1 P - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - T 0 5 5 P - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , T 0 5 5 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , 及び T 0 5 5 P - N 0 6 1 P - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列(配列番号2)は、pH 8及び16での洗剤組成物4のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v3と比較して約1.0のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'よりもPI値が大きい。本発明は、本BMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN' - v3と比較して約1.0のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

10

20

#### 【0436】

以下のBPN'変異体：T055P - N061P - G097A - A116S - G128A及びS024G - N025G - T055P - N061P - S078N - G097A - Y217Q, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列(配列番号2)は、pH 8及び16での洗剤組成物4のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v3と比較して約0.9のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'(配列番号2)と比較してタンパク質分解活性が向上し得る。本発明は、本アッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、BPN' - v3と比較して約0.9のPI値を有する、並びに/あるいは、BPN'と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列、並びに上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

30

40

#### 【0437】

以下のBPN'変異体：N025G - T055P - N061P - S078N - G097A - S101N - G128A - Y217Q, N061P - S101N - G128A - Y217Q, S024G - N025G - S053G - N061P - S078N - S101N - G128A - Y217Q, S024G - N025G - S053G - T055P - S101N - G128A - Y217Q, S024G - N025G - S053G - T055P - N061P - G128A - Y217Q, S024G - N025G - T055P - N061P -

50

S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - S 0 7 8 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - T 0 5 5 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - N 0 6 1 P - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - T 0 5 5 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - T 0 5 5 P - G 0 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , 及び S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - T 0 5 5 P - G 0 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列(配列番号2)は、pH 8及び16での洗剤組成物4の卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v3と比較して1.0超、少なくとも1.1、少なくとも1.2、少なくとも1.3、少なくとも1.4、少なくとも1.5、少なくとも1.6、少なくとも1.7、少なくとも1.8、少なくとも1.9、少なくとも2、1.0超~約10、1.0超~約8、又は1.0超~約5のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'よりもPI値が大きい。本発明は、本卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN' - v3と比較して1.0超~約5のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。

10

20

#### 【0438】

以下のBPN'変異体：G 0 9 7 A - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q , G 0 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , N 0 2 5 G - T 0 5 5 P - N 0 6 1 P - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - T 0 5 5 P - N 0 6 1 P - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - T 0 5 5 P - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - T 0 5 5 P - N 0 6 1 P - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - T 0 5 5 P - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - T 0 5 5 P - N 0 6 1 P - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - N 0 6 1 P - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - T 0 5 5 P - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , T 0 5 5 P - N 0 6 1 P - S 0 7 8 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , N 0 2 5 G - S 0 3 8 G - S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - T 0 5 5 P - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , T 0 5 5 P - N 0 6 1 P - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - T 0 5 5 P - N 0 6 1 P - S 0 7 8 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - T 0 5 5 P - G 0 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , T 0 5 5 P - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - A 1 1 6 S - G 1 2 8 A , S 0 5 3 G - T 0 5 5 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , T 0 5 5 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1

30

40

50

N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - T 0 5 5 P - N 0 6 1 P - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , N 0 2 5 G - T 0 5 5 P - G 0 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - T 0 5 5 P - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , N 0 2 5 G - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , N 0 2 5 G - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - T 0 5 5 P - N 0 6 1 P - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - Y 2 1 7 Q , 及び S 0 2 4 G - I 0 3 5 V - T 0 5 5 P - N 0 6 1 P - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - Y 2 1 7 Q , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列(配列番号2)は、pH 8及び16での洗剤組成物4の卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v3と比較して約1.0のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'よりもPI値が大きい。本発明は、本卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN' - v3と比較して約1.0のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所に更に詳細に記載されるような、少なくとも1つのこのような変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0439】

以下のBPN'変異体：S101N - G128A - Y217Q, S024G - T055P - N061P - G097A - S101N - G128A, S024G - N025G - N061P - S078N - G097A - S101N - G128A, S024G - T055P - N061P - S078N - S101N - G128A - Y217Q, S024G - N025G - S053G - N061P - S078N - G097A - S101N - G128A - Y217Q, S024G - S053G - T055P - N061P - S078N - G097A - S101N - G128A - Y217Q, S053G - N061P - G097A - S101N - G128A - Y217Q - S249N, N025G - S053G - T055P - S078N - G097A - S101N - G128A - Y217Q, S024G - N025G - T055P - G097A - S101N - G128A - Y217Q, S024G - S053G - N061P - G097A - G128A - Y217Q, S024G - N061P - S078N - G097A - S101N - G128A - Y217Q, S024G - S053G - T055P - N061P - S078N - G097A - G128A - Y217Q, S024G - T055P - N061P - G097A - G128A - Y217Q, S024G - S038G - S053G - S078N - S101N - G128A - Y217Q, S053G - S078N - G097A - S101N - G128A - Y217Q, N025G - S078N - G097A - G128A - Y217Q, 及びS024G - N025G - S053G - N061P - G097A - G128A - S130G - Y217Q, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列(配列番号2)は、pH 8及び16での洗剤組成物4の卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v3と比較して約0.9のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、本アッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、BPN' - v3と比較して約0.9のPI値を有する、並びに/あるいは、BPN'と比

10

20

30

40

50

較して向上したタンパク質分解活性を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列、並びに上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物（クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない）、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0440】

以下のBPN'変異体：アミノ酸置換S024G-S053G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, を含むBPN'アミノ酸配列（配列番号2）は、pH 8及び16での洗剤組成物4の卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'-v3と比較して約0.8のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。本発明は、本アッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、BPN'-v3と比較して0.8のPI値を有する、並びにノあるいは、BPN'と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、並びに、アミノ酸置換S024G-S053G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, を含む、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物（クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない）、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0441】

以下のBPN'変異体：S024G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S101N-G128A-Y217Q, N025G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S053G-T055P-N061P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A, S053G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A, N061P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-S101N-G128A-Y217Q, N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, T055P-N061P-S078N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S038G-S053G-N061P-S078N-G097A-

10

20

30

40

50

S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - T 0 5 5 P - N 0 6 1  
 P - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0  
 2 5 G - S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , N 0 2 5 G - S 0 5 3 G -  
 N 0 6 1 P - S 0 7 8 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - S 0 5 3  
 G - T 0 5 5 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0  
 2 5 G - S 0 5 3 G - T 0 5 5 P - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q ,  
 T 0 5 5 P - N 0 6 1 P - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7  
 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - T 0 5 5 P - N 0 6 1 P - S 0 7 8 N - G 1  
 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N -  
 G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8  
 A - Y 2 1 7 Q - S 2 4 9 N , N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - T 0 5 5 P - S 0 7 8 N - G 0  
 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - T 0 5 5 P - G 0 9 7 A -  
 G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , T 0 5 5 P - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - A 1 1 6 S - G 1 2 8  
 A , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - T 0 5 5 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2  
 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - N 0 6 1 P - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N -  
 G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - T 0 5 5 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8  
 A - Y 2 1 7 Q , T 0 5 5 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0  
 2 4 G - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G -  
 S 0 5 3 G - T 0 5 5 P - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , G 0 9 7  
 A - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - G 1  
 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - N 0 6 1 P - G 0 9 7 A - G 1 2 8 A -  
 Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 6 1 P - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8  
 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - T 0 5 5 P - N 0 6 1 P - S 0 7 8 N - G 0  
 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N -  
 G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - T 0 5 5 P - N 0 6 1  
 P - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - N 0 6 1 P - S 0  
 7 8 N - G 0 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - T 0 5 5 P - N 0 6 1 P -  
 G 0 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - S 0 3 8 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8  
 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 5 3 G - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1  
 2 8 A - Y 2 1 7 Q , N 0 2 5 G - T 0 5 5 P - G 0 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q ,  
 S 0 2 4 G - T 0 5 5 P - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7  
 Q , S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0  
 2 4 G - N 0 2 5 G - T 0 5 5 P - G 0 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G -  
 N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - T 0 5 5 P - G 0 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , N 0 2 5  
 G - S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , N 0 2 5 G - G 0  
 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - N 0 6 1 P -  
 S 0 7 8 N - G 0 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8  
 N - G 0 9 7 A - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , N 0 2 5 G - S 0 7 8 N - G 0  
 9 7 A - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q , 及び S 0 2 4 G - N 0 2 5 G - S 0 5 3 G - N 0 6 1  
 P - G 0 9 7 A - G 1 2 8 A - S 1 3 0 G - Y 2 1 7 Q , からなる群から選択される少な  
 くとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列(配列番号2)は、AAPFタン  
 パク質分解アッセイにおいて、BPN' - v3と比較して1.0超、少なくとも1.1、  
 少なくとも1.2、少なくとも1.3、少なくとも1.4、少なくとも1.5、少なくと  
 も1.6、少なくとも1.7、少なくとも1.8、少なくとも1.9、少なくとも2、1  
 .0超~約10、1.0超~約12、4超~約12、1.0超~約8、又は1.0超~約  
 5のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2  
 の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおい  
 て、BPN'プロテアーゼ(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有し  
 、BPN'よりもPI値が大きい。本発明は、本AAPFアッセイにおいて、BPN'(  
 配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BP

10

20

30

40

50



N' - v 3と比較して1.0超~約5のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。

【0442】

以下のBPN'変異体：アミノ酸置換G097A-G128A-Y217Q，を含むBPN'アミノ酸配列（配列番号2）は、AAPFタンパク質分解アッセイにおいてBPN'-v3と比較して約1.0のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'プロテアーゼ（配列番号2）と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'よりもPI値が大きい。本発明は、本AAPFアッセイにおいて、BPN'（配列番号2）と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN'-v3と比較して約1.0のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸置換G097A-G128A-Y217Q，を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物（クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない）、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

10

20

【0443】

（実施例7）

BPN'-v36の部位評価ライブラリの構築及び

BPN'-v36変異体のクリーニング性能

BPN'-v36の部位評価ライブラリの構築

BPN'-v36のアミノ酸配列は、以下の配列番号6に記載のものである。

【0444】

AQSVPLYGV SQIKAPALHSQGYTG GNVKVAVIDSGIDSSH  
PDLKVAGGASMPGETNPFQDNNSHGTHVAGTVAA LNNNI  
GVLGVAPSSASLYAVKVLGADGNGQYSWIINGIEWAIANNM  
DVINMSL GAPS GSAALKAAVDKAVASGVVVVAAAGNEGTS  
GSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRASFS SVGPELDVM  
APGVSIQSTLPGNKYGAQNGTSMASPHVAGAAALILSKHP  
NWTNTQVRSSLENTTTKLGD SFY YGKGLIN VQAAAQ（配列番号6）

30

BPN'-v36プロテアーゼ変異型をコードする核酸配列は以下のものである。

【0445】

Gcgcagtc cgtgccttacggcggtatcaca aattaaagcc  
cctgctcctgcactctcaaggcctacactggaggcaatgttta  
aagtagcggttatcgcacagcgggtatcgcactcgaagccatcc  
agatcttaaaagt cgttgaggggccttctatggtgcccgggc  
gaaacaaaaccgctttcaagataacaaattctcatggcacac  
acgtcgcaggaaacgggttgccggcggttaaa caataataatgg  
cgtgcttggtgtagccccgctctgcttctgcctctacggcctt  
aaagttcttggtggcgcagacgggaaatggcccaatactcatgga  
ttatcaacggcattcgaatgggccaatcgccgaataacatgga  
tgtaatcaacatgagccctgggagcacc aagcggcagtgccg

40

50

g c a c t t a a a g c a g c a g t t g a t a a a g c t g t t g c a t c t g g t g  
t c g t c g t a g t a g c g g c a g c t g g g a a t g a g g g a a c a t c c g g  
a t c a t c g a g t a c c g t c g g t t a t c c a g g c a a g t a c c c t t c a  
g t g a t t g c a g t g g g c g c t g t a g a c t c t t c a a a t c a a c g t g  
c c t c t t t t t c c t c c g t g g g a c c g g a g c t g g a t g t c a t g g c  
c c c t g g c g t t t c t a t t c a a t c g a c g c t t c c a g g g a a c a a g  
t a t g g t g c g c a a a a c g g g a c t t c c a t g g c c t c g c c g c a t g  
t a g c t g g g g c g g c c g c a t t g a t t c t t t c t a a g c a c c c g a a  
c t g g a c a a a c a c t c a a g t c c g c a g c a g t t t a g a a a a c a c c  
a c t a c a a a a c t t g g t g a t t c t t t c t a c t a t g g a a a a g g g c  
t g a t c a a c g t a c a g g c g g c a g c t c a g ( 配列番号 5 )

BPN' - v36のアミノ酸配列は、配列番号2のスブチリシンBPN'アミノ酸配列を参照することにより表わすことができる。すなわち、BPN' - v36は、6つのアミノ酸置換S024G - S053G - S078N - S101N - G128A - Y217Qを有する、配列番号2のスブチリシンBPN'配列として表すことができる。アミノ酸配列BPN' - v36は、便宜上BPN' - S024G - S053G - S078N - S101N - G128A - Y217Q又はBPN' + S024G + S053G + S078N + S101N + G128A + Y217Qとして表記することもできる。本明細書を通して、特に指定のない限り、アミノ酸配列の各アミノ酸位置は、変異体のアミノ酸配列をバチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) スブチリシンBPN'アミノ酸配列とアラインメントすることによって決定される、配列番号2に示されるバチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) スブチリシンBPN'のアミノ酸配列における対応するアミノ酸位置の番号付けに従って番号付けされる。

#### 【0446】

融合PCRにより、成熟型BPN' - v36 (すなわち、BPN' - S24G - S53G - S78N - S101N - G128A - Y217Q) タンパク質における単独アミノ酸位置各々にて部位評価ライブラリ (SEL) を作成した。

#### 【0447】

各コドンがBPN' - v36プロテアーゼ中で変異するように、部分的に重複している相補的な (変異原性の、順方向及び逆方向) プライマー対を設計した。各変異原性プライマーには、両側に少なくとも15ヌクレオチド隣接させた中央にNNS (N = A、C、G、又はT、及びS = G又はC) 変異原性コドンを含むさせた。所定の位置のライブラリを作成するために、共通の順方向遺伝子に隣接するプライマー (P4974、GCCCTCACATTTGTGCCACCTA; 配列番号60) 及び変異原性NNS逆方向プライマー、あるいは共通の逆方向遺伝子に隣接するプライマー (P4976、CCTCTCTGGTTATGAGTTAGTTC; 配列番号61) 及び変異原性NNS順方向プライマーのいずれかを用いて、2つのPCR反応を実施した。これらのPCR反応は、2種のPCR断片を生成したが、一方は変異BPN' - v36遺伝子の5'側半分 (5'遺伝子断片) をコードするものであり、他方は変異BPN' - v36遺伝子の3'側半分 (3'遺伝子断片) をコードするものである。

#### 【0448】

各PCR増幅反応には、30pmolの各プライマー及び100ngのBPN' - v36親テンプレートDNA (pHPLT - BPN' - v36プラスミド、図4を参照されたい) を含むさせた。増幅はVent DNAポリメラーゼ (NEB) を用いて実施した。PCR反応 (20µL) は、まず始めに95°Cで2.5分加熱した後、続いて94°Cで15秒の変性、55°Cで15秒のアニーリング、及び72°Cで40秒の伸長を30サイクル行った。増幅させた後、5'及び3'遺伝子断片を、QIAGEN (登録商標) ゲルバンド精製用キットによりゲル精製し、混合して (各断片につき50ng)、プライマーP4973 (AAAGGATCCTAATCGGCGCTTTTC、配列番号62) 及びP4950 (CTTGTCCTCCAAGCTTAATAAATAA、配列番号63) を用いて

再度PCRで混合及び増幅させて、完全長の遺伝子断片を生成した。伸長工程を72 で2分にわたって実施したことを除き、PCR条件は上記の条件と同様のものではあった。完全長のDNA断片をQIAGEN(登録商標)ゲルバンド精製用キットによりゲル精製し、制限酵素BamHI及びHindIIIで消化し、同様の制限酵素で消化したpHPLT-BPN' partial optベクターとライゲーションさせた。Illustra TempliPhiキットでローリング・サークル型増幅法を用い、ライゲーション混合物を製造元(GE Healthcare)の推奨に従って増幅させることで、枯草菌(Bacillus subtilis)に形質転換させるための多量体DNAを生成した。この目的のため、1µLのライゲーション混合物と5µLのサンプル緩衝液を混合し、95 で3分間加熱し、氷中で冷却した。次に、5µLの反応緩衝液及び0.2µLの酵素を各チューブに加え、続いて30 で10時間にわたってインキュベートした。ローリング・サークル型増幅産物を100倍希釈し、枯草菌(B. subtilis)細胞の形質転換に用いた(a prE, n prE, amyE::xyLRPxyLAc omK- phleo)。形質転換混合物のアリコート量を、1.6%のスキムミルク及び10µg/mLのネオマイシンを含有しているLBプレートに蒔き、37 で一晩インキュベートした。続いて、ハローを有するコロニーを、10µg/mLのネオマイシンを含有している150µLのLB培地に接種した。翌日、培養物は15%のグリセロールと共に凍結させるか、あるいは実施例2に記載されるような生化学的解析のためにMDB培地で増殖させた。

10

## 【0449】

BPN' - v36変異体のクリーニング性能

20

16及びpH 8での洗剤組成物4のBMI微小標本アッセイ、並びに16及びpH 8での洗剤組成物4の卵微小標本アッセイを用いて、BPN' - v36SEL由来のタンパク質変異体をクリーニング性能について試験した。タンパク質含量はTCAアッセイを用いて測定した。実施例1に記載のようにアッセイを実施し、BPN' - v36(すなわち、BPN' - S24G - S53G - S78N - S101N - G128A - Y217Q)(PI値1.0を有する)と比較して性能指数を算出した。

## 【0450】

以下のBPN'変異体：A116V, G160S, I111L, I115V, N109S, N117M, P005G, Q059V, T164S, Y262M, A015Q, A015S, A098E, A098N, A098S, A098T, A098V, A098Y, A114S, A114T, A116G, A116L, A116S, A116T, A116W, A133G, A133H, A133T, A133V, A137G, A137I, A137L, A137S, A137T, A138S, A216E, A216F, A216V, D099S, D181E, F261A, F261Q, G024F, G024I, G024Q, G024Y, G097S, G160T, G211L, G211V, H017F, H017W, H039V, H226A, I031V, I111V, I268V, K170R, K265R, L016Q, L016T, L135M, L209T, L209V, L233M, L257T, L257V, L267A, L267V, N025A, N025I, N025Q, N025R, N025T, N025V, N101I, N101Q, N101S, N109A, N109G, N109H, N109L, N109M, N109Q, N109T, N117Q, N184A, N184L, N184T, N184W, N212G, N212L, N212V, N243P, N252G, N252M, P005T, P014S, P040G, P040L, P040Q, P129A, P129S, P172G, P172S, P194Q, P210A, P210S, Q185F, Q185G, Q185I, Q185M, Q185N, Q185S, Q275H, R186K, S009A, S009G, S009H, S009M, S018T, S130T, S132N, S145K, S159T, S161I, S161K, S161N, S161T, S162I, S162M, S162Y, S163G, S182F, S182G, S182V, S182W, S183F, S183L, S183M, S183T, S183V, S183W, S224A, S236T, S249V, T022A, T022G, T022Q, T022V, T208V, T2

30

40

50

4 2 S , T 2 5 3 N , T 2 5 3 S , T 2 5 4 A , T 2 5 4 S , T 2 5 5 L , T 2 5 5 S ,  
 T 2 5 5 V , V 0 0 4 A , V 0 0 4 P , V 0 0 4 W , V 0 8 4 C , V 1 3 9 C , V 1 6 5  
 M , V 2 0 3 F , Y 0 2 1 K , Y 0 2 1 N , Y 0 2 1 T , Y 0 2 1 V , Y 1 6 7 F , Y 1  
 7 1 F , Y 2 1 4 F , Y 2 6 2 F , 及び Y 2 6 2 T , からなる群から選択される少なくと  
 も1つのアミノ酸置換を含む B P N ' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1  
 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q ( 配列番号 6 ) ( すなわち、 B P N ' - v 3 6 ) は、 p H  
 8 及び 1 6 での洗剤組成物 4 の B M I 微小標本クリーニングアッセイにおいて、 B P N  
 ' - v 3 6 と比較して 1 . 0 超、少なくとも 1 . 1、少なくとも 1 . 2、少なくとも 1 .  
 3、少なくとも 1 . 4、少なくとも 1 . 5、少なくとも 1 . 6、少なくとも 1 . 7、少な  
 くととも 1 . 8、少なくとも 1 . 9、少なくとも 2、1 . 0 超 ~ 約 1 0、1 . 0 超 ~ 約 8、  
 又は 1 . 0 超 ~ 約 5 の P I 値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位  
 置は、配列番号 2 の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、  
 本アッセイにおいて、 B P N ' ( 配列番号 2 ) と比較して向上したタンパク質分解活性を  
 有し、 B P N ' よりも P I 値が大きい。本発明は、本 B M I 微小標本クリーニングアッセ  
 イにおいて、 B P N ' ( 配列番号 2 ) と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、  
 B P N ' - v 3 及び B P N ' - v 3 6 と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、  
 B P N ' - v 3 の P I 値を超える P I 値を有する、並びに / あるいは、 B P N ' - v 3 6  
 と比較して 1 超 ~ 約 5 の P I 値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列  
 番号 2 又は配列番号 6 の配列に対して少なくとも 6 0 %、7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0  
 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % の同  
 一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも 1、2、3、4、5  
 、6 又はそれ以上のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号 2  
 の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により  
 詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物 ( クリーニ  
 グ組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような  
 変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

#### 【 0 4 5 1 】

以下の B P N ' - v 3 6 変異体 : A 0 0 1 G , A 0 0 1 Y , A 0 1 3 G , A 0 1 3 V ,  
 A 0 1 5 F , A 0 1 5 G , A 0 1 5 K , A 0 1 5 M , A 0 1 5 P , A 0 1 5 T , A 0 1 5  
 W , A 0 1 5 Y , A 0 2 9 G , A 0 7 3 S , A 0 8 8 C , A 0 8 8 I , A 0 8 8 L , A 0  
 8 8 T , A 0 8 8 V , A 0 9 8 D , A 0 9 8 K , A 0 9 8 P , A 0 9 8 R , A 0 9 8 W ,  
 A 1 1 6 D , A 1 1 6 E , A 1 1 6 R , A 1 2 8 S , A 1 3 3 L , A 1 3 3 M , A 1 3 3  
 S , A 1 3 4 G , A 1 3 4 S , A 1 3 7 N , A 1 3 7 V , A 1 4 4 M , A 1 4 4 Q , A 1  
 4 4 S , A 1 4 4 T , A 1 4 4 V , A 1 5 1 C , A 1 7 6 S , A 1 7 6 T , A 1 7 9 S ,  
 A 2 1 6 G , A 2 1 6 L , A 2 1 6 P , A 2 1 6 Q , A 2 1 6 S , A 2 1 6 T , A 2 1 6  
 Y , A 2 2 8 T , A 2 3 0 C , A 2 3 1 C , A 2 7 2 I , A 2 7 2 L , A 2 7 2 Q , A 2  
 7 2 S , A 2 7 2 T , A 2 7 2 W , A 2 7 3 S , A 2 7 4 G , A 2 7 4 L , A 2 7 4 Q ,  
 A 2 7 4 T , A 2 7 4 V , D 0 4 1 E , D 0 9 9 G , D 0 9 9 N , D 1 2 0 A , D 1 2 0  
 K , D 1 2 0 Q , D 1 2 0 R , D 1 2 0 S , D 1 4 0 E , D 1 8 1 S , D 2 5 9 E , E 0  
 5 4 D , E 1 5 6 D , E 1 5 6 T , E 2 5 1 V , F 2 6 1 G , F 2 6 1 H , F 2 6 1 L ,  
 F 2 6 1 R , F 2 6 1 S , F 2 6 1 T , F 2 6 1 V , F 2 6 1 W , G 0 0 7 A , G 0 0 7  
 S , G 0 2 0 A , G 0 2 0 D , G 0 2 0 S , G 0 2 4 N , G 0 2 4 R , G 0 2 4 S , G 0  
 2 4 T , G 0 2 4 V , G 0 2 4 W , G 0 5 3 H , G 0 5 3 K , G 0 5 3 N , G 0 5 3 T ,  
 G 0 9 7 A , G 0 9 7 D , G 0 9 7 T , G 1 3 1 A , G 1 3 1 H , G 1 3 1 P , G 1 3 1  
 Q , G 1 3 1 T , G 1 3 1 V , G 1 6 0 H , G 1 6 0 P , G 1 6 6 A , G 1 6 6 S , G 1  
 6 6 T , G 2 1 1 A , G 2 1 1 D , G 2 1 1 M , G 2 1 1 N , G 2 1 1 P , G 2 1 1 Q ,  
 G 2 1 1 R , G 2 1 1 W , G 2 1 5 A , G 2 1 5 N , G 2 1 5 V , H 0 1 7 L , H 0 1 7  
 M , H 0 1 7 T , H 0 1 7 V , H 0 1 7 Y , H 0 3 9 A , H 0 3 9 C , H 0 3 9 N , H 2  
 2 6 F , H 2 2 6 I , H 2 2 6 M , H 2 2 6 S , H 2 2 6 V , H 2 2 6 Y , I 0 3 5 V ,  
 I 0 7 9 A , I 0 7 9 S , I 0 7 9 T , I 0 7 9 V , I 0 7 9 W , I 1 0 8 V , I 1 1 5

10

20

30

40

50

L, I 1 2 2 A, I 2 3 4 L, I 2 3 4 V, K 0 1 2 R, K 0 2 7 R, K 1 3 6 R, K 1  
4 1 F, K 2 1 3 W, K 2 3 7 R, K 2 5 6 R, K 2 6 5 Q, L 0 1 6 A, L 0 1 6 F,  
L 0 1 6 I, L 0 1 6 S, L 0 1 6 V, L 0 4 2 I, L 0 7 5 A, L 0 7 5 M, L 0 7 5  
Q, L 0 7 5 V, L 0 7 5 Y, L 0 8 2 K, L 0 8 2 M, L 0 8 2 Q, L 0 8 2 V, L 0  
9 0 I, L 1 9 6 I, L 1 9 6 V, L 2 0 9 Q, L 2 0 9 W, L 2 3 3 A, L 2 3 3 Q,  
L 2 3 3 V, L 2 3 5 I, L 2 3 5 K, L 2 5 0 I, L 2 5 7 A, L 2 5 7 H, L 2 5 7  
Q, L 2 5 7 S, L 2 5 7 Y, L 2 6 7 Q, L 2 6 7 R, L 2 6 7 S, L 2 6 7 T, M 1  
9 9 V, N 0 2 5 F, N 0 2 5 G, N 0 2 5 H, N 0 2 5 K, N 0 2 5 L, N 0 2 5 M,  
N 0 2 5 S, N 0 2 5 Y, N 0 6 1 F, N 0 6 1 H, N 0 6 1 P, N 0 6 1 S, N 0 6 1  
T, N 0 6 1 V, N 0 6 1 W, N 0 7 6 G, N 0 7 6 W, N 0 7 8 S, N 0 7 8 T, N 0  
7 8 V, N 1 0 1 A, N 1 0 1 H, N 1 0 1 L, N 1 0 1 T, N 1 0 9 K, N 1 0 9 R,  
N 1 1 7 A, N 1 1 7 E, N 1 1 7 H, N 1 1 7 K, N 1 1 8 G, N 1 8 4 G, N 1 8 4  
H, N 1 8 4 I, N 1 8 4 S, N 1 8 4 V, N 2 1 2 A, N 2 1 2 F, N 2 1 2 I, N 2  
1 2 K, N 2 1 2 P, N 2 1 2 Q, N 2 1 2 S, N 2 1 2 Y, N 2 1 8 A, N 2 1 8 H,  
N 2 1 8 L, N 2 1 8 S, N 2 4 0 E, N 2 4 0 H, N 2 4 0 L, N 2 4 0 R, N 2 4 0  
T, N 2 4 3 A, N 2 4 3 Q, N 2 4 3 T, N 2 4 3 V, N 2 5 2 A, N 2 5 2 K, N 2  
5 2 L, N 2 5 2 Q, N 2 5 2 R, N 2 5 2 S, N 2 5 2 T, N 2 6 9 Q, N 2 6 9 S,  
P 0 1 4 G, P 0 1 4 Q, P 0 1 4 T, P 0 4 0 A, P 0 4 0 H, P 0 4 0 S, P 0 4 0  
T, P 0 4 0 V, P 0 4 0 Y, P 0 8 6 A, P 0 8 6 C, P 0 8 6 F, P 0 8 6 H, P 0  
8 6 S, P 1 2 9 D, P 1 2 9 G, P 1 2 9 K, P 1 2 9 T, P 1 7 2 A, P 1 7 2 Q,  
P 1 9 4 A, P 1 9 4 G, P 1 9 4 L, P 1 9 4 M, P 1 9 4 S, P 1 9 4 V, P 1 9 4  
Y, P 2 1 0 G, P 2 1 0 R, P 2 1 0 V, Q 0 0 2 A, Q 0 0 2 S, Q 0 1 0 A, Q 0  
1 0 F, Q 0 1 0 H, Q 0 1 0 I, Q 0 1 0 L, Q 0 1 0 N, Q 0 1 0 S, Q 0 1 0 T,  
Q 0 1 9 A, Q 0 1 9 G, Q 0 1 9 N, Q 0 1 9 S, Q 0 1 9 T, Q 0 1 9 V, Q 0 1 9  
W, Q 0 5 9 I, Q 1 0 3 L, Q 1 0 3 S, Q 1 8 5 A, Q 1 8 5 H, Q 1 8 5 L, Q 1  
8 5 T, Q 1 8 5 Y, Q 2 0 6 P, Q 2 0 6 S, Q 2 0 6 Y, Q 2 1 7 I, Q 2 1 7 N,  
Q 2 1 7 S, Q 2 1 7 T, Q 2 4 5 K, Q 2 7 5 D, Q 2 7 5 S, Q 2 7 5 W, S 0 0 3  
A, S 0 0 3 G, S 0 0 3 H, S 0 0 3 M, S 0 0 3 P, S 0 0 3 Q, S 0 0 3 T, S 0  
0 3 V, S 0 0 9 I, S 0 0 9 L, S 0 0 9 P, S 0 0 9 T, S 0 0 9 W, S 0 1 8 A,  
S 0 1 8 G, S 0 1 8 I, S 0 1 8 L, S 0 1 8 M, S 0 1 8 N, S 0 1 8 P, S 0 1 8  
V, S 0 1 8 W, S 0 3 3 T, S 0 3 7 Q, S 0 3 7 T, S 0 3 7 V, S 0 3 8 G, S 0  
3 8 H, S 0 3 8 K, S 0 3 8 Q, S 0 3 8 T, S 0 6 3 K, S 0 6 3 N, S 0 6 3 Q,  
S 0 6 3 T, S 0 8 7 A, S 0 8 7 F, S 0 8 7 G, S 0 8 7 Q, S 0 8 7 T, S 0 8 9  
L, S 0 8 9 M, S 0 8 9 N, S 0 8 9 Q, S 0 8 9 T, S 0 8 9 W, S 1 3 0 A, S 1  
3 0 F, S 1 3 0 G, S 1 3 0 L, S 1 3 0 V, S 1 4 5 A, S 1 4 5 H, S 1 4 5 M,  
S 1 4 5 V, S 1 5 9 A, S 1 5 9 G, S 1 5 9 H, S 1 5 9 Q, S 1 5 9 R, S 1 6 1  
A, S 1 6 1 G, S 1 6 1 H, S 1 6 1 L, S 1 6 1 M, S 1 6 1 P, S 1 6 1 Q, S 1  
6 1 W, S 1 6 2 A, S 1 6 2 F, S 1 6 2 G, S 1 6 2 L, S 1 6 2 N, S 1 6 2 P,  
S 1 6 2 R, S 1 6 2 V, S 1 6 3 P, S 1 7 3 A, S 1 7 3 G, S 1 8 2 A, S 1 8 2  
H, S 1 8 2 K, S 1 8 2 L, S 1 8 2 N, S 1 8 2 P, S 1 8 2 Q, S 1 8 2 T, S 1  
8 3 A, S 1 8 3 G, S 1 8 3 H, S 1 8 3 Q, S 1 8 8 A, S 1 8 8 G, S 1 8 8 T,  
S 1 8 8 V, S 1 9 1 A, S 2 0 4 A, S 2 0 4 I, S 2 0 4 L, S 2 0 4 Q, S 2 0 4  
V, S 2 2 4 C, S 2 3 6 A, S 2 3 6 N, S 2 3 6 Q, S 2 4 8 A, S 2 4 8 F, S 2  
4 8 G, S 2 4 8 I, S 2 4 8 K, S 2 4 8 L, S 2 4 8 M, S 2 4 8 N, S 2 4 8 Q,  
S 2 4 8 T, S 2 4 8 V, S 2 4 9 A, S 2 4 9 C, S 2 4 9 H, S 2 4 9 Q, S 2 4 9  
T, S 2 4 9 W, S 2 4 9 Y, S 2 6 0 H, S 2 6 0 N, S 2 6 0 P, S 2 6 0 T, T 0  
2 2 H, T 0 2 2 K, T 0 2 2 N, T 0 2 2 R, T 0 2 2 S, T 0 2 2 Y, T 0 5 5 A,  
T 0 5 5 G, T 0 5 5 L, T 0 5 5 N, T 0 5 5 P, T 0 5 5 Q, T 0 7 1 S, T 1 5 8  
H, T 1 5 8 S, T 1 6 4 N, T 2 0 8 C, T 2 0 8 L, T 2 2 0 S, T 2 4 2 N, T 2  
4 4 A, T 2 4 4 G, T 2 4 4 H, T 2 4 4 I, T 2 4 4 Q, T 2 4 4 S, T 2 4 4 V,

T 2 4 4 W , T 2 5 3 A , T 2 5 3 G , T 2 5 3 H , T 2 5 3 Q , T 2 5 4 V , T 2 5 5 A , T 2 5 5 G , T 2 5 5 H , T 2 5 5 I , T 2 5 5 Q , T 2 5 5 Y , V 0 0 4 G , V 0 0 4 N , V 0 0 4 R , V 0 0 8 A , V 0 0 8 C , V 0 0 8 M , V 0 2 6 I , V 0 4 4 I , V 0 4 4 L , V 0 4 5 H , V 0 4 5 K , V 0 4 5 L , V 0 4 5 M , V 0 4 5 Q , V 0 4 5 S , V 0 4 5 V , V 0 4 5 W , V 0 4 5 Y , V 0 5 1 I , V 0 8 1 L , V 0 8 1 Q , V 0 8 1 T , V 0 8 4 A , V 0 8 4 S , V 0 8 4 T , V 0 9 3 I , V 1 2 1 I , V 1 4 3 N , V 1 4 3 S , V 1 4 3 Y , V 1 4 7 C , V 1 4 7 I , V 1 4 7 L , V 1 4 7 T , V 1 8 0 I , V 1 8 0 L , V 1 8 0 T , V 1 9 2 A , V 1 9 2 S , V 1 9 2 T , V 1 9 8 I , V 1 9 8 L , V 1 9 8 M , V 2 0 3 H , V 2 0 3 I , V 2 0 3 L , V 2 0 3 N , V 2 0 3 Q , V 2 0 3 T , V 2 0 3 W , V 2 0 3 Y , V 2 7 0 A , V 2 7 0 S , V 2 7 0 T , W 2 4 1 M , W 2 4 1 Y , Y 0 0 6 G , Y 0 0 6 H , Y 0 0 6 I , Y 0 0 6 K , Y 0 0 6 L , Y 0 0 6 P , Y 0 0 6 Q , Y 0 0 6 T , Y 0 0 6 V , Y 0 0 6 W , Y 0 2 1 A , Y 0 2 1 D , Y 0 2 1 E , Y 0 2 1 L , Y 0 2 1 Q , Y 0 2 1 R , Y 0 2 1 S , Y 1 0 4 F , Y 1 0 4 I , Y 2 1 4 L , Y 2 1 4 V , Y 2 1 4 W , Y 2 6 2 A , Y 2 6 2 G , Y 2 6 2 L , Y 2 6 2 N , Y 2 6 2 S , Y 2 6 2 W , Y 2 6 3 G , 及び Y 2 6 3 W , からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換を含む B P N ' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q アミノ酸配列 (配列番号 6) は、pH 8 及び 16 での洗剤組成物 4 の B M I 微小標本クリーニングアッセイにおいて、B P N ' - v 3 6 と比較して約 1 . 0 の P I 値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号 2 の配列と対応させることにより番号付けされる。したがって、例えば、本発明は、置換 A 1 2 8 S , を含むアミノ酸配列 B P N ' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q アミノ酸配列 (配列番号 6) 、例えば、B P N ' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 S - Y 2 1 7 Q を含む。このような変異体は、本アッセイにおいて、B P N ' (配列番号 2) と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、B P N ' よりも P I 値が大きい。本発明は、本 B M I 微小標本クリーニングアッセイにおいて、B P N ' (配列番号 2) と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、B P N ' - v 3 と比較して約 1 . 0 の P I 値を有する、並びに / あるいは、B P N ' - v 3 6 と比較して約 1 . 0 の P I 値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号 2 又は配列番号 6 の配列に対して少なくとも 6 0 % 、 7 0 % 、 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 又は 9 9 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 又はそれ以上のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号 2 の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような 1 つの変異体を含む組成物 (クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも 1 つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

#### 【 0 4 5 2 】

以下の B P N ' - v 3 6 変異体 : A 0 0 1 F , A 0 0 1 K , A 0 0 1 L , A 0 0 1 M , A 0 0 1 Q , A 0 0 1 R , A 0 0 1 S , A 0 0 1 T , A 0 0 1 V , A 0 1 3 C , A 0 1 3 S , A 0 1 5 D , A 0 1 5 E , A 0 1 5 L , A 0 1 5 R , A 0 4 8 S , A 0 7 3 N , A 0 7 3 T , A 0 7 4 G , A 0 7 4 S , A 0 8 5 C , A 0 8 5 G , A 0 8 5 S , A 0 8 5 V , A 0 8 8 M , A 0 8 8 S , A 0 9 2 S , A 0 9 8 G , A 1 1 4 G , A 1 3 3 P , A 1 3 7 E , A 1 3 7 H , A 1 4 4 G , A 1 4 4 H , A 1 4 4 K , A 1 4 4 L , A 1 4 4 N , A 1 5 3 S , A 1 5 3 V , A 1 7 6 C , A 1 7 9 G , A 1 8 7 G , A 1 8 7 S , A 2 0 0 G , A 2 1 6 W , A 2 2 3 S , A 2 2 8 S , A 2 3 0 T , A 2 3 0 V , A 2 3 1 V , A 2 3 2 C , A 2 3 2 V , A 2 7 2 E , A 2 7 2 G , A 2 7 2 K , A 2 7 2 P , A 2 7 3 G , A 2 7 3 L , A 2 7 3 V , A 2 7 4 M , A 2 7 4 R , D 0 3 6 E , D 0 9 9 A , D 0 9 9 Q , D 1 2 0 E , D 1 8 1 A , D 1 8 1 G , D 2 5 9 A , D 2 5 9 G , D 2 5 9 Q , D 2 5 9 T , E 1 5 6 A , E 1 5 6 S , E 2 5 1 I , E 2 5 1 L , E 2 5 1 Q , E 2 5 1 T , F 0 5 8 Y , F 2 6 1 C , F 2 6 1 D , F 2 6 1 K , F 2 6 1 P , G 0 2 0 E , G 0 2 0 F ,

10

20

30

40

50

G 0 2 0 H , G 0 2 0 L , G 0 2 0 N , G 0 2 0 Q , G 0 2 0 R , G 0 2 0 T , G 0 2 0  
 Y , G 0 2 4 A , G 0 2 4 P , G 0 5 3 A , G 0 5 3 D , G 0 5 3 E , G 0 5 3 F , G 0  
 5 3 L , G 0 5 3 Q , G 0 5 3 S , G 0 5 3 Y , G 0 9 7 K , G 0 9 7 M , G 1 5 7 A ,  
 G 1 5 7 S , G 1 6 0 A , G 1 6 0 L , G 1 6 6 C , G 1 6 6 I , G 1 6 6 Q , G 1 6 9  
 A , G 2 1 1 K , G 2 1 5 H , G 2 1 5 L , G 2 1 5 S , G 2 1 5 T , G 2 1 5 W , G 2  
 5 8 S , H 0 1 7 I , H 0 3 9 S , H 2 2 6 L , H 2 3 8 N , H 2 3 8 Y , I 0 1 1 L ,  
 I 0 1 1 V , I 0 3 1 L , I 0 7 9 F , I 0 7 9 K , I 0 7 9 L , I 0 7 9 M , I 0 7 9  
 Q , I 2 0 5 A , I 2 0 5 V , I 2 6 8 L , I 2 6 8 M , K 0 1 2 G , K 0 4 3 F , K 0  
 4 3 H , K 0 4 3 I , K 0 4 3 N , K 0 4 3 Q , K 0 4 3 T , K 1 4 1 A , K 1 4 1 R ,  
 K 1 4 1 W , K 1 7 0 A , K 2 1 3 A , K 2 1 3 G , K 2 1 3 H , K 2 1 3 I , K 2 1 3  
 L , K 2 1 3 N , K 2 1 3 Q , K 2 1 3 R , K 2 1 3 S , K 2 1 3 T , K 2 1 3 V , K 2  
 3 7 A , K 2 3 7 H , K 2 3 7 I , K 2 3 7 L , K 2 3 7 N , K 2 3 7 S , K 2 5 6 A ,  
 K 2 5 6 G , K 2 5 6 H , K 2 5 6 M , K 2 5 6 P , K 2 5 6 Q , K 2 5 6 W , K 2 6 5  
 H , L 0 1 6 E , L 0 4 2 V , L 0 7 5 G , L 0 7 5 H , L 0 7 5 I , L 0 7 5 T , L 0  
 8 2 A , L 0 8 2 F , L 0 8 2 H , L 0 8 2 R , L 0 8 2 S , L 0 8 2 T , L 0 9 0 M ,  
 L 1 3 5 F , L 1 9 6 M , L 2 0 9 C , L 2 0 9 H , L 2 0 9 S , L 2 3 3 S , L 2 3 5  
 M , L 2 3 5 R , L 2 3 5 W , L 2 5 7 C , L 2 5 7 G , L 2 6 7 F , M 0 5 0 Y , M 1  
 1 9 C , M 1 1 9 I , M 1 2 4 L , N 0 2 5 C , N 0 2 5 E , N 0 2 5 P , N 0 6 1 A ,  
 N 0 6 1 G , N 0 6 1 I , N 0 6 1 K , N 0 6 1 L , N 0 6 1 Q , N 0 6 1 R , N 0 6 2  
 S , N 0 6 2 T , N 0 7 6 A , N 0 7 6 P , N 0 7 6 Q , N 0 7 6 S , N 0 7 6 T , N 0  
 7 6 V , N 0 7 8 G , N 0 7 8 H , N 0 7 8 K , N 0 7 8 P , N 0 7 8 Q , N 0 7 8 R ,  
 N 1 0 1 F , N 1 1 7 R , N 1 1 7 S , N 1 1 8 D , N 1 1 8 H , N 1 1 8 Q , N 1 1 8  
 R , N 1 1 8 S , N 1 1 8 T , N 1 8 4 C , N 1 8 4 E , N 1 8 4 R , N 2 1 2 D , N 2  
 1 2 R , N 2 1 2 W , N 2 1 8 F , N 2 1 8 G , N 2 1 8 M , N 2 1 8 P , N 2 1 8 T ,  
 N 2 1 8 V , N 2 1 8 W , N 2 4 0 A , N 2 4 0 G , N 2 4 0 Q , N 2 4 0 S , N 2 4 0  
 W , N 2 4 3 C , N 2 4 3 G , N 2 4 3 S , N 2 5 2 V , N 2 6 9 H , P 0 0 5 A , P 0  
 0 5 D , P 0 0 5 M , P 0 0 5 Q , P 0 1 4 A , P 0 1 4 M , P 0 1 4 R , P 0 1 4 V ,  
 P 0 4 0 F , P 0 4 0 R , P 0 4 0 W , P 1 2 9 E , P 1 2 9 R , P 1 7 2 E , P 1 7 2  
 K , P 1 9 4 H , P 1 9 4 R , P 1 9 4 W , P 2 0 1 A , P 2 0 1 G , P 2 1 0 L , P 2  
 3 9 K , P 2 3 9 R , Q 0 0 2 D , Q 0 0 2 E , Q 0 0 2 G , Q 0 0 2 I , Q 0 0 2 P ,  
 Q 0 0 2 V , Q 0 1 0 D , Q 0 1 0 R , Q 0 1 9 C , Q 0 1 9 D , Q 0 1 9 E , Q 0 1 9  
 H , Q 0 1 9 L , Q 0 1 9 P , Q 0 1 9 R , Q 0 5 9 A , Q 0 5 9 E , Q 0 5 9 L , Q 0  
 5 9 S , Q 0 5 9 T , Q 1 0 3 W , Q 1 8 5 D , Q 1 8 5 K , Q 1 8 5 R , Q 1 8 5 W ,  
 Q 2 0 6 G , Q 2 0 6 H , Q 2 0 6 L , Q 2 0 6 V , Q 2 0 6 W , Q 2 1 7 E , Q 2 1 7  
 F , Q 2 1 7 H , Q 2 1 7 L , Q 2 1 7 V , Q 2 4 5 M , Q 2 7 1 A , Q 2 7 1 D , Q 2  
 7 1 G , Q 2 7 1 L , Q 2 7 1 P , Q 2 7 1 T , Q 2 7 1 Y , Q 2 7 5 F , Q 2 7 5 L ,  
 Q 2 7 5 P , Q 2 7 5 R , S 0 0 3 D , S 0 0 3 F , S 0 0 3 K , S 0 0 3 R , S 0 0 9  
 K , S 0 1 8 D , S 0 1 8 R , S 0 3 7 A , S 0 3 7 G , S 0 3 7 K , S 0 3 7 L , S 0  
 3 7 P , S 0 3 8 M , S 0 6 3 A , S 0 6 3 F , S 0 6 3 G , S 0 6 3 M , S 0 6 3 R ,  
 S 0 6 3 Y , S 0 8 7 C , S 0 8 7 K , S 0 8 7 L , S 0 8 7 M , S 0 8 7 N , S 0 8 7  
 Y , S 0 8 9 A , S 0 8 9 D , S 0 8 9 F , S 0 8 9 G , S 0 8 9 H , S 0 8 9 I , S 0  
 8 9 K , S 0 8 9 R , S 0 8 9 V , S 0 8 9 Y , S 1 3 0 D , S 1 3 0 E , S 1 3 0 K ,  
 S 1 3 0 W , S 1 4 5 G , S 1 4 5 L , S 1 4 5 R , S 1 4 5 T , S 1 5 9 D , S 1 5 9  
 L , S 1 5 9 W , S 1 6 1 E , S 1 6 1 R , S 1 6 2 C , S 1 6 2 E , S 1 6 2 W , S 1  
 6 3 A , S 1 8 2 E , S 1 8 2 R , S 1 8 3 C , S 1 8 3 D , S 1 8 3 P , S 1 8 3 R ,  
 S 1 8 8 D , S 1 8 8 P , S 2 0 4 G , S 2 0 4 Y , S 2 0 7 G , S 2 2 4 G , S 2 2 4  
 T , S 2 3 6 C , S 2 3 6 G , S 2 4 8 D , S 2 4 8 H , S 2 4 8 R , S 2 4 9 E , S 2  
 4 9 L , S 2 4 9 R , S 2 6 0 A , S 2 6 0 G , S 2 6 0 K , S 2 6 0 Q , S 2 6 0 V ,  
 S 2 6 0 Y , T 0 2 2 L , T 0 5 5 D , T 0 5 5 E , T 0 5 5 I , T 0 5 5 K , T 0 5 5  
 M , T 0 5 5 S , T 0 5 5 V , T 0 5 5 Y , T 1 5 8 A , T 1 5 8 G , T 1 5 8 L , T 1

10

20

30

40

50

58Q, T158V, T164K, T164Q, T208S, T244D, T244E, T244R, T253E, T253R, T253Y, T254G, T255D, T255E, T255K, T255R, V026A, V028I, V028L, V030I, V044C, V044P, V045E, V045G, V045N, V072L, V081A, V081G, V081H, V081S, V084I, V084M, V095A, V095C, V143A, V143F, V143H, V143Q, V143T, V143W, V147A, V147Q, V147S, V148I, V148L, V149C, V149I, V149L, V165L, V180A, V180C, V180M, V192C, V192F, V192I, V192Q, V192Y, V203A, V203G, V203K, V203S, V270C, V270L, V270P, W241F, Y006A, Y006M, Y006N, Y006R, Y006S, Y021C, Y091W, Y104V, Y104W, Y262C, Y262D, Y262E, Y262H, Y262I, Y262R, 及び Y262V, からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換を含むBPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Qアミノ酸配列(配列番号6)は、pH 8及び16での洗剤組成物4のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'-v36と比較して約0.9のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較してタンパク質分解活性が向上し得、並びに/あるいは、BPN'よりもPI値が大きい場合がある。本発明は、本BMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN'-v36と比較して約0.9のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、変異体は、配列番号2又は配列番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1、2、3、4、5、6又はそれ以上のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

### 【0453】

以下のBPN'-v36変異体: A001D, A001H, A001N, A015C, A048C, A048E, A085T, A133R, A137R, A142C, A144D, A144R, A152S, A153G, A187P, A187Q, A187T, A187V, A216R, A230S, A272R, A273H, A273T, A274H, D036N, D036S, D181H, D181T, D259N, D259P, D259S, E156G, E156H, E156L, E156Q, E156V, E251C, F189S, F189T, F189W, F189Y, F261E, G020C, G024D, G053M, G053R, G097R, G131D, G131R, G157N, G160R, G160V, G166L, G166W, G211E, G215D, G258A, G258D, G258P, I011T, I031C, I079E, I079R, I175L, I205C, K012H, K012N, K027A, K027N, K027S, K043A, K043D, K043E, K043G, K043L, K043M, K043P, K043V, K043W, K043Y, K136H, K141H, K141L, K141M, K141N, K141Q, K141T, K141V, K170G, K170S, K237T, K237V, K256D, K256S, K256T, K256V, K265N, K265S, L042F, L042M, L082E, L209A, L209E, L209G, L209R, L233G, L235V, L257D, L257E, L257P, L257R, L257W, L267E, M050L, N056D, N056S, N061C, N061D, N062A, N062H, N062L, N062V, N062Y, N076D,

10

20

30

40

50



N076L, N076M, N078D, N078F, N101D, N101R, N118A, N212C, N212E, N218C, N218D, N218E, N252D, N252E, P014F, P014K, P057A, P057W, P172R, P194E, P201T, P210E, Q059C, Q059D, Q059R, Q185E, Q206D, Q217A, Q217K, Q217R, Q245A, Q245D, Q245E, Q245H, Q245R, Q271E, Q271F, Q271R, Q271W, Q275G, Q275I, R186I, R186L, R186V, R186W, S003E, S009C, S009E, S018C, S037D, S037E, S037H, S037R, S037Y, S038D, S038P, S038R, S038Y, S063L, S087D, S087R, S089C, S089E, S130C, S130R, S145D, S159C, S159P, S161C, S173T, S182C, S188E, S188F, S188K, S188L, S188R, S188W, S190A, S190G, S190T, S204R, S236D, S236E, S248C, S248E, S260C, S260E, S260R, T022P, T055C, T055W, T071A, T158D, T158E, T158P, T158R, T158Y, T164R, T242D, T242G, T255C, V004E, V004T, V045C, V045D, V045R, V045T, V051H, V081R, V143C, V143E, V143G, V192G, V203C, V203D, V203E, V203M, V203R, V270G, W241L, Y214H, Y214Q, A001E, A133E, A187L, A187N, A216C, A216H, A273Q, D099H, D259H, E156C, E195G, F189H, G131C, G146A, G166V, G215C, G215E, I107L, K012A, K012S, K012T, K043C, K170C, K256C, K256E, K265G, K265Y, L233E, M222F, M222S, N062Q, N076E, N078E, N184P, N218R, P005V, P014D, Q002K, Q002L, Q002R, Q010W, Q271C, R186H, S049C, S063C, S063D, S105T, S188C, S190C, S204E, T055R, T164G, V004D, V044T, V045I, V165C, V180S, Y006C, Y006D, Y006E, Y104T, A001C, A187C, A230G, A273D, A273P, D036Q, F189G, F189L, F189R, G157T, G178A, I031F, I111M, K012F, K012L, K027T, K043R, K136G, K141G, K170Q, M222A, M222L, N062R, N117G, N269C, P005W, P129V, P239A, P239H, P239T, Q059W, Q217G, Q275A, R186A, S191G, T164A, T220A, A001P, A187F, A187W, A273R, D041C, D060G, D197T, F189A, G046D, G157P, K012C, K012E, K012W, L042C, M222T, N062C, P239G, P239N, Q217C, R186M, S049T, S089P, S125A, S173V, 及びV044A, からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換を含むBPN'-S24G-S53G-S78N-S101N-G128A-Y217Qアミノ酸配列(配列番号6)は、pH 8及び16での洗剤組成物4のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'-v36と比較して0.5以上0.9未満のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、本BMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN'-v36と比較して0.5以上0.9未満のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、変異体は、配列番号2又は配列番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1、2、3、4、5、6又はそれ以上のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本

10

20

30

40

50

明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物（クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない）、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0454】

以下のBPN' - v36変異体：A216E, L090I, A098R, A098W, A098Y, A116G, A116R, A116S, A133M, I107L, I115V, M124L, N101I, N109H, N109S, N109T, N117R, P005G, Q185L, S089V, V095A, A015Y, A029G, A098D, A098E, A098G, A098N, A098S, A098T, A098V, A114S, A114T, A116E, A116L, A116T, A116V, A133H, A133L, A133S, A137G, A137I, A137L, A137S, A137V, A138S, A144S, A144V, A176S, A176T, A187T, A216F, A216P, A216Q, A216R, A216S, A216T, A216V, A216Y, D041E, D120A, D120E, D120Q, D120R, D120S, D181S, G020A, G020S, G024A, G097A, G097D, G097S, G131Q, G160S, G166I, G211L, G215N, H039N, H238N, I111L, I111V, I122A, L075I, L075Q, L135M, L209T, L209V, L233V, L235M, L235R, L257A, M119I, N025A, N025G, N025T, N061K, N101F, N101H, N101L, N101Q, N101R, N101S, N101T, N109A, N109G, N109K, N109L, N117E, N117H, N117K, N117S, N212G, N212S, N218F, N218G, N218H, N218L, N218S, N218W, N240Q, N252M, N252R, N252S, P005T, P040A, P040G, P040T, P129D, P129S, P194S, P210R, Q019R, Q019W, Q103L, Q103W, Q185A, Q185G, Q185M, Q185R, Q185T, Q206G, Q206Y, Q217A, Q217E, Q217R, Q217S, Q217T, S003Q, S009H, S018M, S033T, S130A, S130F, S130G, S130T, S130V, S145T, S159A, S161N, S161T, S162V, S162Y, S182L, S182W, S183F, S183L, S183V, S183W, S188K, S188W, S236Q, S236T, S248L, T022H, T022K, T208C, T253H, T255V, V044I, V121I, V139C, V143H, V143Q, V143T, V143W, V143Y, Y006K, Y021A, Y104W, A001F, A001G, A001H, A001K, A001L, A001Q, A001S, A001Y, A013V, A015G, A015K, A015R, A015S, A015T, A015W, A048S, A073N, A073S, A092S, A098K, A098P, A116D, A116W, A128S, A133P, A133T, A133V, A134G, A134S, A137H, A137N, A137T, A144D, A144K, A144L, A144M, A144N, A144R, A179G, A179S, A187V, A216G, A216L, A216W, A223S, A230C, A272K, A272L, A272P, A272S, A272T, A272W, A273G, A273S, A274G, A274M, A274T, D120K, D140E, D181A, D181E, D181G, D181H, D181T, D259E, D259N, D259Q, E054D, E156D, E156T, E251L, E251T, E251V, F058Y, F189W, F261K, F261Q, F261R, G007A, G007S, G020F, G020H, G020N, G020Q, G020T, G020Y, G024F, G024Q, G024R, G024T, G024V, G024W, G024Y, G053T, G097K, G097M, G097R, G097T, G131A, G131H, G131P, G131R, G131T, G131V, G160H, G160T, G166C, G166Q, G166S, G166T, G211A, G211D, G211K, G211M, G211N, G211Q,

G 2 1 1 R , G 2 1 1 V , G 2 1 1 W , G 2 1 5 S , G 2 1 5 T , G 2 1 5 W , H 0 1 7  
T , H 0 1 7 W , H 0 1 7 Y , H 0 3 9 V , H 2 2 6 A , H 2 2 6 F , H 2 2 6 I , H 2  
2 6 L , H 2 2 6 M , H 2 2 6 V , I 0 3 5 V , I 0 7 9 A , I 0 7 9 S , I 1 0 8 V ,  
I 2 0 5 V , I 2 3 4 L , I 2 3 4 V , I 2 6 8 V , K 0 1 2 S , K 0 4 3 P , K 1 3 6  
H , K 1 3 6 R , K 1 4 1 A , K 1 4 1 F , K 1 4 1 T , K 1 4 1 W , K 1 7 0 A , K 1  
7 0 G , K 1 7 0 R , K 2 1 3 A , K 2 1 3 R , K 2 1 3 S , K 2 3 7 A , K 2 3 7 H ,  
K 2 3 7 L , K 2 3 7 S , K 2 3 7 V , K 2 5 6 A , K 2 5 6 G , K 2 5 6 H , K 2 5 6  
M , K 2 5 6 P , K 2 5 6 Q , K 2 5 6 R , L 0 1 6 A , L 0 1 6 Q , L 0 1 6 T , L 0  
1 6 V , L 0 4 2 V , L 0 7 5 M , L 0 7 5 T , L 0 8 2 M , L 0 8 2 V , L 1 3 5 F ,  
L 1 9 6 I , L 2 0 9 H , L 2 0 9 Q , L 2 0 9 R , L 2 0 9 S , L 2 0 9 W , L 2 3 3 10  
A , L 2 3 3 M , L 2 3 3 Q , L 2 3 5 I , L 2 3 5 K , L 2 5 0 I , L 2 5 7 S , L 2  
5 7 T , L 2 5 7 V , L 2 6 7 A , L 2 6 7 Q , L 2 6 7 T , L 2 6 7 V , M 1 1 9 C ,  
M 1 9 9 V , N 0 2 5 C , N 0 2 5 E , N 0 2 5 F , N 0 2 5 I , N 0 2 5 K , N 0 2 5  
L , N 0 2 5 M , N 0 2 5 Q , N 0 2 5 V , N 0 2 5 Y , N 0 6 1 F , N 0 6 1 P , N 0  
6 1 S , N 0 6 1 T , N 0 7 6 G , N 0 7 8 S , N 1 0 1 A , N 1 0 9 M , N 1 0 9 Q ,  
N 1 0 9 R , N 1 1 7 A , N 1 1 7 M , N 1 1 7 Q , N 1 1 8 D , N 1 1 8 G , N 1 1 8  
H , N 1 1 8 Q , N 1 1 8 R , N 1 1 8 S , N 1 8 4 A , N 1 8 4 C , N 1 8 4 G , N 1  
8 4 L , N 1 8 4 R , N 1 8 4 S , N 1 8 4 T , N 1 8 4 V , N 1 8 4 W , N 2 1 2 C ,  
N 2 1 2 F , N 2 1 2 I , N 2 1 2 K , N 2 1 2 L , N 2 1 2 P , N 2 1 2 Q , N 2 1 2 20  
R , N 2 1 2 V , N 2 1 2 W , N 2 1 2 Y , N 2 1 8 A , N 2 1 8 P , N 2 1 8 T , N 2  
4 0 A , N 2 4 0 E , N 2 4 0 G , N 2 4 0 H , N 2 4 0 L , N 2 4 0 R , N 2 4 0 S ,  
N 2 4 0 T , N 2 4 3 C , N 2 4 3 Q , N 2 4 3 T , N 2 4 3 V , N 2 5 2 A , N 2 5 2  
G , N 2 5 2 K , N 2 5 2 Q , P 0 1 4 G , P 0 1 4 Q , P 0 1 4 R , P 0 1 4 S , P 0  
1 4 T , P 0 4 0 F , P 0 4 0 L , P 0 4 0 Q , P 0 4 0 S , P 0 4 0 V , P 0 8 6 C ,  
P 0 8 6 H , P 0 8 6 S , P 1 2 9 A , P 1 2 9 E , P 1 2 9 G , P 1 2 9 K , P 1 2 9  
R , P 1 7 2 A , P 1 7 2 K , P 1 7 2 Q , P 1 7 2 S , P 1 9 4 A , P 1 9 4 G , P 1  
9 4 H , P 1 9 4 L , P 1 9 4 M , P 1 9 4 Q , P 1 9 4 R , P 1 9 4 V , P 1 9 4 W ,  
P 1 9 4 Y , P 2 1 0 A , P 2 1 0 G , P 2 1 0 L , P 2 1 0 S , P 2 3 9 K , P 2 3 9  
R , Q 0 0 2 A , Q 0 0 2 S , Q 0 1 0 A , Q 0 1 0 N , Q 0 1 0 R , Q 0 1 0 T , Q 0 30  
1 9 A , Q 0 1 9 C , Q 0 1 9 D , Q 0 1 9 G , Q 0 1 9 S , Q 0 1 9 T , Q 0 1 9 V ,  
Q 0 5 9 I , Q 0 5 9 V , Q 1 0 3 S , Q 1 8 5 F , Q 1 8 5 H , Q 1 8 5 I , Q 1 8 5  
K , Q 1 8 5 N , Q 1 8 5 S , Q 1 8 5 Y , Q 2 0 6 H , Q 2 0 6 L , Q 2 0 6 P , Q 2  
0 6 W , Q 2 1 7 F , Q 2 1 7 H , Q 2 1 7 I , Q 2 1 7 K , Q 2 1 7 L , Q 2 1 7 N ,  
Q 2 1 7 V , Q 2 7 1 G , Q 2 7 1 R , Q 2 7 1 T , Q 2 7 5 F , Q 2 7 5 P , Q 2 7 5  
R , R 1 8 6 A , R 1 8 6 I , R 1 8 6 K , S 0 0 3 A , S 0 0 3 F , S 0 0 3 G , S 0  
0 3 H , S 0 0 3 K , S 0 0 3 R , S 0 0 3 T , S 0 0 9 T , S 0 1 8 N , S 0 1 8 T ,  
S 0 3 7 G , S 0 3 7 T , S 0 3 7 V , S 0 3 8 G , S 0 3 8 Q , S 0 6 3 N , S 0 6 3  
Q , S 0 6 3 T , S 0 8 9 M , S 0 8 9 N , S 1 3 0 K , S 1 3 0 L , S 1 3 0 R , S 1  
3 0 W , S 1 3 2 N , S 1 4 5 G , S 1 4 5 K , S 1 4 5 M , S 1 4 5 R , S 1 4 5 V ,  
S 1 5 9 C , S 1 5 9 H , S 1 5 9 L , S 1 5 9 Q , S 1 5 9 R , S 1 5 9 T , S 1 5 9 40  
W , S 1 6 1 A , S 1 6 1 C , S 1 6 1 G , S 1 6 1 H , S 1 6 1 I , S 1 6 1 K , S 1  
6 1 P , S 1 6 1 Q , S 1 6 1 R , S 1 6 2 F , S 1 6 2 G , S 1 6 2 I , S 1 6 2 L ,  
S 1 6 2 M , S 1 6 2 N , S 1 6 2 P , S 1 6 2 R , S 1 6 3 G , S 1 7 3 A , S 1 7 3  
G , S 1 8 2 F , S 1 8 2 G , S 1 8 2 K , S 1 8 2 N , S 1 8 2 Q , S 1 8 2 V , S 1  
8 3 A , S 1 8 3 M , S 1 8 3 Q , S 1 8 3 R , S 1 8 3 T , S 1 8 8 A , S 1 8 8 F ,  
S 1 8 8 G , S 1 8 8 P , S 1 8 8 R , S 1 8 8 T , S 1 8 8 V , S 1 9 0 C , S 2 0 4  
A , S 2 0 4 G , S 2 0 4 I , S 2 0 4 L , S 2 0 4 Q , S 2 0 4 R , S 2 0 4 V , S 2  
0 7 G , S 2 2 4 A , S 2 2 4 T , S 2 3 6 C , S 2 3 6 D , S 2 3 6 E , S 2 3 6 G ,  
S 2 3 6 N , S 2 4 8 A , S 2 4 8 F , S 2 4 8 K , S 2 4 8 M , S 2 4 8 T , S 2 4 9  
A , S 2 4 9 R , S 2 4 9 T , S 2 4 9 V , S 2 4 9 W , S 2 4 9 Y , S 2 6 0 G , S 2 50

60H, S260K, S260N, T022A, T022G, T022Q, T022S, T022V, T022Y, T055A, T055K, T158A, T158S, T208L, T208S, T208V, T220S, T242D, T242N, T242S, T244E, T244G, T244I, T244R, T244V, T244W, T253A, T253G, T253N, T253S, T254S, T254V, T255H, T255I, T255K, T255L, T255Q, T255R, T255S, T255Y, V004A, V004N, V004P, V004W, V008A, V008M, V026I, V045S, V045W, V051I, V081Q, V081T, V084C, V093I, V095C, V143A, V143E, V143F, V143N, V143S, V147I, V147L, V147S, V147T, V148I, V149C, V149I, V165M, V180A, V180C, V180I, V180L, V180T, V192A, V192C, V192I, V192S, V192T, V192Y, V198L, V203A, V203F, V203K, V203L, V203M, V203N, V203Y, W241Y, Y006A, Y006G, Y006H, Y006L, Y006N, Y006P, Y006Q, Y006T, Y021E, Y021K, Y021L, Y021N, Y021Q, Y021R, Y021S, Y021T, Y104F, Y104I, Y104V, Y171F, Y214F, Y214L, Y214W, Y262F, 及びY262S, かなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換を含むBPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Qアミノ酸配列(配列番号6)は、16及びpH 8での洗剤組成物4の卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'-v36と比較して1.0超、少なくとも1.1、少なくとも1.2、少なくとも1.3、少なくとも1.4、少なくとも1.5、少なくとも1.6、少なくとも1.7、少なくとも1.8、少なくとも1.9、少なくとも2.1.0超~約10、1.0超~約8、又は1.0超~約5のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'よりもPI値が大きい。本発明は、本卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、BPN'-v3及びBPN'-v36と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、BPN'-v3と比較して1.0超~5のPI値を有する、並びに/あるいは、BPN'-v36と比較して1.0超~約5のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号2又は配列番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1、2、3、4、5、6又はそれ以上のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0455】

以下のBPN'-v36変異体: A001D, A001M, A001N, A001R, A001T, A001V, A013C, A013G, A013S, A015D, A015F, A015L, A015M, A015P, A015Q, A074G, A074S, A085S, A085T, A085V, A088C, A088L, A088S, A088T, A088V, A133E, A133G, A133R, A137E, A144G, A144H, A144Q, A144T, A151C, A152S, A153G, A153S, A153V, A176C, A187G, A187Q, A187S, A200G, A228S, A228T, A230T, A230V, A231C, A231V, A232C, A232V, A272E, A272G, A272I, A272Q, A272R, A273L, A2

10

20

30

40

50

7 3 V , A 2 7 4 L , A 2 7 4 Q , A 2 7 4 R , A 2 7 4 V , D 0 3 6 E , D 2 5 9 A ,  
D 2 5 9 G , D 2 5 9 P , D 2 5 9 S , D 2 5 9 T , E 1 5 6 A , E 1 5 6 S , E 1 5 6  
V , E 1 9 5 G , E 2 5 1 C , E 2 5 1 I , E 2 5 1 Q , F 1 8 9 Y , F 2 6 1 A , F 2  
6 1 G , F 2 6 1 H , F 2 6 1 L , F 2 6 1 P , F 2 6 1 S , F 2 6 1 T , F 2 6 1 V ,  
F 2 6 1 W , G 0 2 0 C , G 0 2 0 D , G 0 2 0 E , G 0 2 0 L , G 0 2 0 R , G 0 2 4  
D , G 0 2 4 I , G 0 2 4 N , G 0 2 4 P , G 0 2 4 S , G 0 5 3 A , G 0 5 3 D , G 0  
5 3 F , G 0 5 3 H , G 0 5 3 K , G 0 5 3 N , G 0 5 3 S , G 0 5 3 Y , G 1 5 7 A ,  
G 1 5 7 S , G 1 6 0 A , G 1 6 0 L , G 1 6 0 P , G 1 6 0 R , G 1 6 6 A , G 1 6 6  
L , G 1 6 6 V , G 1 6 6 W , G 1 6 9 A , G 2 1 1 E , G 2 1 1 P , G 2 1 5 A , G 2  
1 5 D , G 2 1 5 E , G 2 1 5 H , G 2 1 5 V , G 2 5 8 D , G 2 5 8 S , H 0 1 7 F , 10  
H 0 1 7 I , H 0 1 7 L , H 0 1 7 M , H 0 1 7 V , H 0 3 9 C , H 2 2 6 S , H 2 2 6  
Y , I 0 1 1 T , I 0 1 1 V , I 0 3 1 C , I 0 3 1 L , I 0 3 1 V , I 0 7 9 F , I 0  
7 9 K , I 0 7 9 L , I 0 7 9 M , I 0 7 9 Q , I 0 7 9 R , I 0 7 9 T , I 0 7 9 V ,  
I 0 7 9 W , I 1 1 5 L , I 2 0 5 A , I 2 0 5 C , I 2 6 8 L , K 0 1 2 R , K 0 1 2  
T , K 0 2 7 R , K 0 4 3 A , K 0 4 3 E , K 0 4 3 F , K 0 4 3 H , K 0 4 3 I , K 0  
4 3 M , K 0 4 3 N , K 0 4 3 Q , K 0 4 3 T , K 0 4 3 V , K 0 4 3 Y , K 1 4 1 H ,  
K 1 4 1 Q , K 1 4 1 V , K 1 7 0 S , K 2 1 3 G , K 2 1 3 H , K 2 1 3 I , K 2 1 3  
L , K 2 1 3 N , K 2 1 3 Q , K 2 1 3 T , K 2 1 3 W , K 2 3 7 I , K 2 3 7 N , K 2  
3 7 R , K 2 3 7 T , K 2 5 6 C , K 2 5 6 E , K 2 5 6 S , K 2 5 6 T , K 2 5 6 V ,  
K 2 5 6 W , K 2 6 5 H , K 2 6 5 R , L 0 1 6 E , L 0 1 6 F , L 0 1 6 I , L 0 1 6 20  
S , L 0 4 2 I , L 0 4 2 M , L 0 7 5 A , L 0 7 5 H , L 0 7 5 Y , L 0 8 2 K , L 0  
8 2 Q , L 0 8 2 T , L 1 9 6 M , L 1 9 6 V , L 2 0 9 A , L 2 0 9 C , L 2 0 9 E ,  
L 2 0 9 G , L 2 3 5 W , L 2 5 7 C , L 2 5 7 H , L 2 5 7 Q , L 2 5 7 Y , L 2 6 7  
E , L 2 6 7 F , L 2 6 7 R , L 2 6 7 S , M 0 5 0 Y , N 0 2 5 H , N 0 2 5 P , N 0  
2 5 S , N 0 5 6 D , N 0 6 1 A , N 0 6 1 C , N 0 6 1 D , N 0 6 1 G , N 0 6 1 H ,  
N 0 6 1 I , N 0 6 1 L , N 0 6 1 Q , N 0 6 1 R , N 0 6 1 V , N 0 6 1 W , N 0 6 2  
A , N 0 6 2 S , N 0 6 2 V , N 0 7 6 A , N 0 7 6 E , N 0 7 6 L , N 0 7 6 M , N 0  
7 6 Q , N 0 7 6 S , N 0 7 6 T , N 0 7 6 W , N 0 7 8 G , N 0 7 8 H , N 0 7 8 K ,  
N 0 7 8 P , N 0 7 8 Q , N 0 7 8 T , N 1 0 1 D , N 1 1 8 A , N 1 1 8 T , N 1 8 4  
E , N 1 8 4 H , N 1 8 4 I , N 2 1 2 A , N 2 1 2 D , N 2 1 2 E , N 2 1 8 C , N 2 30  
1 8 D , N 2 1 8 E , N 2 1 8 M , N 2 1 8 R , N 2 1 8 V , N 2 4 0 W , N 2 4 3 A ,  
N 2 4 3 G , N 2 4 3 P , N 2 4 3 S , N 2 5 2 D , N 2 5 2 E , N 2 5 2 L , N 2 5 2  
T , N 2 5 2 V , N 2 6 9 S , P 0 0 5 A , P 0 0 5 D , P 0 0 5 M , P 0 0 5 Q , P 0  
1 4 A , P 0 1 4 D , P 0 1 4 F , P 0 1 4 M , P 0 1 4 V , P 0 4 0 H , P 0 4 0 R ,  
P 0 4 0 W , P 0 4 0 Y , P 0 8 6 A , P 1 2 9 T , P 1 7 2 E , P 1 7 2 G , P 1 7 2  
R , P 1 9 4 E , P 2 0 1 A , P 2 0 1 G , P 2 1 0 E , P 2 1 0 V , Q 0 0 2 E , Q 0  
0 2 G , Q 0 1 0 D , Q 0 1 0 F , Q 0 1 0 H , Q 0 1 0 I , Q 0 1 0 L , Q 0 1 0 S ,  
Q 0 1 9 E , Q 0 1 9 H , Q 0 1 9 N , Q 0 5 9 A , Q 0 5 9 L , Q 0 5 9 R , Q 0 5 9  
S , Q 0 5 9 T , Q 1 8 5 D , Q 1 8 5 E , Q 2 0 6 D , Q 2 0 6 S , Q 2 0 6 V , Q 2  
1 7 G , Q 2 4 5 D , Q 2 4 5 E , Q 2 4 5 K , Q 2 4 5 M , Q 2 4 5 R , Q 2 7 1 A , 40  
Q 2 7 1 F , Q 2 7 1 P , Q 2 7 1 Y , Q 2 7 5 D , Q 2 7 5 H , Q 2 7 5 I , Q 2 7 5  
L , Q 2 7 5 S , Q 2 7 5 W , R 1 8 6 H , R 1 8 6 L , R 1 8 6 V , R 1 8 6 W , S 0  
0 3 D , S 0 0 3 E , S 0 0 3 M , S 0 0 3 P , S 0 0 3 V , S 0 0 9 A , S 0 0 9 E ,  
S 0 0 9 G , S 0 0 9 I , S 0 0 9 K , S 0 0 9 M , S 0 0 9 P , S 0 0 9 W , S 0 1 8  
A , S 0 1 8 G , S 0 1 8 I , S 0 1 8 L , S 0 1 8 P , S 0 1 8 R , S 0 1 8 V , S 0  
1 8 W , S 0 3 7 A , S 0 3 7 D , S 0 3 7 Q , S 0 3 7 R , S 0 3 7 Y , S 0 3 8 D ,  
S 0 3 8 H , S 0 3 8 K , S 0 3 8 M , S 0 3 8 R , S 0 3 8 T , S 0 6 3 A , S 0 6 3  
G , S 0 6 3 K , S 0 6 3 M , S 0 6 3 R , S 0 8 7 A , S 0 8 7 D , S 0 8 7 F , S 0  
8 7 G , S 0 8 7 Q , S 0 8 7 T , S 0 8 9 A , S 0 8 9 C , S 0 8 9 H , S 0 8 9 I ,  
S 0 8 9 K , S 0 8 9 L , S 0 8 9 Q , S 0 8 9 R , S 0 8 9 T , S 0 8 9 Y , S 1 3 0 50

D, S 1 3 0 E, S 1 4 5 A, S 1 4 5 H, S 1 4 5 L, S 1 5 9 G, S 1 6 1 E, S 1 6 1 L, S 1 6 1 M, S 1 6 1 W, S 1 6 2 A, S 1 6 2 C, S 1 6 2 E, S 1 6 2 W, S 1 6 3 P, S 1 7 3 T, S 1 8 2 A, S 1 8 2 C, S 1 8 2 E, S 1 8 2 H, S 1 8 2 R, S 1 8 2 T, S 1 8 3 C, S 1 8 3 D, S 1 8 3 G, S 1 8 3 H, S 1 8 8 C, S 1 8 8 D, S 1 8 8 E, S 1 8 8 L, S 1 9 0 T, S 1 9 1 A, S 2 0 4 Y, S 2 2 4 C, S 2 3 6 A, S 2 4 8 C, S 2 4 8 D, S 2 4 8 G, S 2 4 8 I, S 2 4 8 N, S 2 4 8 Q, S 2 4 8 R, S 2 4 8 V, S 2 4 9 C, S 2 4 9 H, S 2 4 9 L, S 2 4 9 Q, S 2 6 0 A, S 2 6 0 C, S 2 6 0 E, S 2 6 0 P, S 2 6 0 Q, S 2 6 0 R, S 2 6 0 T, T 0 2 2 L, T 0 2 2 N, T 0 2 2 R, T 0 5 5 C, T 0 5 5 D, T 0 5 5 G, T 0 5 5 I, T 0 5 5 L, T 0 5 5 N, T 0 5 5 Q, T 0 5 5 S, T 0 5 5 V, T 0 5 5 Y, T 0 7 1 A, T 0 7 1 S, T 1 5 8 G, T 1 5 8 H, T 1 5 8 L, T 1 5 8 P, T 1 5 8 Q, T 1 5 8 R, T 1 5 8 V, T 1 5 8 Y, T 1 6 4 N, T 1 6 4 S, T 2 4 4 A, T 2 4 4 D, T 2 4 4 H, T 2 4 4 Q, T 2 4 4 S, T 2 5 3 Q, T 2 5 3 R, T 2 5 3 Y, T 2 5 4 A, T 2 5 4 G, T 2 5 5 A, T 2 5 5 D, T 2 5 5 E, V 0 0 4 E, V 0 0 4 G, V 0 0 4 R, V 0 0 8 C, V 0 2 6 A, V 0 2 8 L, V 0 3 0 I, V 0 4 4 C, V 0 4 5 D, V 0 4 5 E, V 0 4 5 H, V 0 4 5 M, V 0 4 5 Q, V 0 4 5 Y, V 0 7 2 L, V 0 8 1 L, V 0 8 1 S, V 0 8 4 A, V 0 8 4 I, V 0 8 4 M, V 0 8 4 T, V 1 4 3 C, V 1 4 7 C, V 1 4 7 Q, V 1 4 9 L, V 1 6 5 L, V 1 8 0 M, V 1 9 2 F, V 1 9 2 G, V 1 9 2 Q, V 1 9 8 I, V 1 9 8 M, V 2 0 3 C, V 2 0 3 E, V 2 0 3 H, V 2 0 3 I, V 2 0 3 Q, V 2 0 3 R, V 2 0 3 T, V 2 0 3 W, V 2 7 0 A, V 2 7 0 L, V 2 7 0 T, W 2 4 1 F, W 2 4 1 M, Y 0 0 6 C, Y 0 0 6 D, Y 0 0 6 E, Y 0 0 6 I, Y 0 0 6 M, Y 0 0 6 R, Y 0 0 6 S, Y 0 0 6 V, Y 0 0 6 W, Y 0 2 1 C, Y 0 2 1 D, Y 0 2 1 V, Y 0 9 1 W, Y 1 6 7 F, Y 2 1 4 V, Y 2 6 2 A, Y 2 6 2 C, Y 2 6 2 I, Y 2 6 2 M, Y 2 6 2 R, Y 2 6 2 T, Y 2 6 2 V, 及び Y 2 6 2 W, からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換を含む BPN' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q アミノ酸配列 (配列番号 6) は、pH 8 及び 16 での洗剤組成物 4 の卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v 3 6 と比較して約 1.0 の PI 値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号 2 の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN' (配列番号 2) と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN' よりも PI 値が大きい。本発明は、本卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' (配列番号 2) と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、BPN' - v 3 と比較して約 1.0 の PI 値を有する、並びに / あるいは、BPN' - v 3 6 と比較して約 1.0 の PI 値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号 2 又は配列番号 6 の配列に対して少なくとも 60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 又は 99% の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも 1、2、3、4、5、6 又はそれ以上のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号 2 の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような 1 つの変異体を含む組成物 (クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも 1 つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【 0 4 5 6 】

以下の BPN' - v 3 6 変異体: A 0 0 1 E, A 0 1 5 C, A 0 1 5 E, A 0 4 8 C, A 0 4 8 E, A 0 7 3 T, A 0 8 5 C, A 0 8 5 G, A 0 8 8 I, A 0 8 8 M, A 1 1 4 G, A 1 3 7 R, A 1 8 7 L, A 1 8 7 N, A 1 8 7 P, A 1 8 7 W, A 2 1 6 C, A 2 3 0 S, A 2 7 3 D, A 2 7 3 H, A 2 7 3 T, D 0 3 6 N, D 0 9 9 N, D 2 5 9 H, E 1 5 6 C, E 1 5 6 G, E 1 5 6 H, E 1 5 6 Q, F 1 8 9 H, F 1 8 9 R, F 1 8 9 S, F 1 8 9 T, F 2 6 1 C, F 2 6 1 D, F 2 6 1 E, G 0 5 3 E, G 0 5 3 M, G 0 5 3 Q, G 1 3 1 C, G 1 3 1 D, G 1 5 7 N, G 1 6 0 V, G 2 1 5 C, G 2 1 5 L,

10

20

30

40

50

G 2 5 8 A , H 0 3 9 A , I 0 1 1 L , I 0 7 9 E , I 2 6 8 M , K 0 1 2 A , K 0 1 2 G , K 0 1 2 H , K 0 1 2 N , K 0 2 7 N , K 0 4 3 C , K 0 4 3 D , K 0 4 3 G , K 0 4 3 L , K 0 4 3 W , K 1 3 6 G , K 1 4 1 G , K 1 4 1 L , K 1 4 1 M , K 1 4 1 N , K 1 4 1 R , K 1 7 0 C , K 1 7 0 Q , K 2 1 3 V , K 2 5 6 D , K 2 6 5 G , K 2 6 5 N , K 2 6 5 Q , K 2 6 5 S , L 0 8 2 A , L 0 8 2 F , L 0 8 2 H , L 0 8 2 R , L 0 8 2 S , L 0 9 0 M , L 2 3 3 S , L 2 3 5 V , L 2 5 7 E , L 2 5 7 G , L 2 5 7 R , L 2 5 7 W , M 2 2 2 S , N 0 2 5 R , N 0 6 2 H , N 0 6 2 T , N 0 7 6 D , N 0 7 6 P , N 0 7 8 D , N 0 7 8 E , N 0 7 8 F , N 0 7 8 R , N 0 7 8 V , N 2 6 9 H , N 2 6 9 Q , P 0 1 4 K , P 0 5 7 A , P 0 8 6 F , P 2 0 1 T , Q 0 0 2 D , Q 0 0 2 I , Q 0 0 2 P , Q 0 0 2 V , Q 0 1 9 L , Q 0 1 9 P , Q 0 5 9 C , Q 0 5 9 D , Q 0 5 9 E , Q 1 8 5 W , Q 2 7 1 C , Q 2 7 1 D , Q 2 7 1 E , Q 2 7 1 L , Q 2 7 1 W , Q 2 7 5 G , R 1 8 6 M , S 0 0 9 C , S 0 0 9 L , S 0 1 8 D , S 0 3 7 E , S 0 3 7 H , S 0 3 7 K , S 0 3 7 L , S 0 3 7 P , S 0 3 8 P , S 0 6 3 C , S 0 6 3 D , S 0 6 3 F , S 0 6 3 L , S 0 6 3 Y , S 0 8 7 L , S 0 8 7 N , S 0 8 7 R , S 0 8 7 Y , S 0 8 9 D , S 0 8 9 F , S 0 8 9 G , S 0 8 9 W , S 1 0 5 T , S 1 2 5 A , S 1 3 0 C , S 1 5 9 D , S 1 5 9 P , S 1 6 3 A , S 1 8 2 P , S 1 8 3 P , S 1 9 0 A , S 1 9 0 G , S 2 0 4 E , S 2 2 4 G , S 2 4 8 E , S 2 4 8 H , S 2 4 9 E , S 2 6 0 V , S 2 6 0 Y , T 0 5 5 M , T 0 5 5 R , T 0 5 5 W , T 1 5 8 D , T 1 5 8 E , T 1 6 4 G , T 1 6 4 K , T 1 6 4 Q , T 2 2 0 A , T 2 4 2 G , T 2 5 3 E , T 2 5 5 C , T 2 5 5 G , V 0 0 4 D , V 0 4 4 L , V 0 4 4 P , V 0 4 5 C , V 0 4 5 G , V 0 4 5 L , V 0 4 5 N , V 0 4 5 R , V 0 4 5 V , V 0 8 1 A , V 0 8 1 G , V 0 8 1 H , V 0 8 4 S , V 1 4 7 A , V 2 0 3 D , V 2 0 3 G , V 2 7 0 C , V 2 7 0 P , V 2 7 0 S , W 2 4 1 L , Y 1 0 4 T , Y 2 1 4 Q , Y 2 6 2 D , Y 2 6 2 E , Y 2 6 2 G , Y 2 6 2 H , Y 2 6 2 L , Y 2 6 2 N , Y 2 6 3 G , 及び Y 2 6 3 W , からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換を含む B P N ' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q アミノ酸配列 (配列番号 6) は、pH 8 及び 16 での洗剤組成物 4 の卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、B P N ' - v 3 6 と比較して約 0 . 9 の P I 値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号 2 の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、本卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、B P N ' (配列番号 2) と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに / あるいは、B P N ' - v 3 6 と比較して約 0 . 9 の P I 値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号 2 又は配列番号 6 の配列に対して少なくとも 6 0 %、7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも 1、2、3、4、5、6 又はそれ以上のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号 2 の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような 1 つの変異体を含む組成物 (クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも 1 つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【 0 4 5 7 】

以下の B P N ' - v 3 6 変異体 : A 0 0 1 C , A 1 4 2 C , A 1 8 7 C , A 2 1 6 H , A 2 7 3 Q , A 2 7 4 H , D 0 3 6 Q , D 0 3 6 S , D 0 9 9 S , D 1 9 7 T , E 1 5 6 L , F 1 8 9 A , F 1 8 9 L , G 0 5 3 L , G 0 5 3 R , G 1 5 7 P , G 1 7 8 A , G 2 5 8 P , H 0 3 9 S , H 2 3 8 Y , K 0 1 2 C , K 0 1 2 E , K 0 1 2 L , K 0 1 2 W , K 1 3 6 E , K 2 6 5 Y , L 0 7 5 G , L 0 7 5 V , L 0 8 2 E , L 1 2 6 W , L 2 5 7 D , L 2 5 7 P , M 0 5 0 L , M 2 2 2 A , M 2 2 2 F , M 2 2 2 L , N 0 5 6 S , N 0 6 2 C , N 0 6 2 L , N 0 6 2 Y , N 2 6 9 C , P 0 5 7 W , Q 0 0 2 K , Q 0 0 2 L , Q 2 1 7 C , Q 2 4 5 A , Q 2 4 5 H , S 0 1 8 C , S 0 3 8 Y , S 0 4 9 C , S 0 8 7 C , S 0 8 7 K , S 1 4 5 D , S 1 9 1 G , T 0 2 2 P , T 0 5 5 E , T 1 6 4 A , T 1

10

20

30

40

50

64R, V045K, V051H, V081R, V143G, V148L, V180S, V203S, V270G, Y214H, A187F, A273P, F189G, G046D, G146A, G157T, I031F, I175L, K012F, K027T, L042F, L233E, L233G, M222T, N062R, N184P, P005V, P005W, P129V, P239N, P239T, Q010W, Q059W, Q275A, V004T, V165C, A128H, A230G, D041C, H067T, K027S, K043R, L090T, N062Q, N117G, P225G, P225S, P239G, P239H, Q002R, S089E, V044A, V045I, A001P, A273R, D041N, D099A, D099H, D099Q, F058G, I111M, L042C, N118L, P239A, S049N, S089P, S173V, T242P, V044T, 及びV045T, からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含むBPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Qアミノ酸配列(配列番号6)は、pH 8及び16での洗剤組成物4の卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'-v36と比較して約0.5以上0.9未満のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、本卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN'-v36と比較して0.5以上0.9未満のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、変異体は、配列番号2又は配列番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1、2、3、4、5、6又はそれ以上のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

10

20

## 【0458】

(実施例8)

親BPN'-v36に基づく更なるコンビナトリアル変異体のクリーニング性能DNA 2.0により、親BPN'-v36(BPN'-S24G-S53G-S78N-S101N-G128A-Y217Q)に基づく更なるコンビナトリアル変異体が作成され、提供された。これらの変異体を16及びpH 8での洗剤組成物4のBMI微小標本アッセイ、16及びpH 7での洗剤組成物4のBMI微小標本アッセイ、16及びpH 8での洗剤組成物4の卵微小標本アッセイ、並びに16及びpH 8での洗剤組成物4の植物微小標本アッセイで、クリーニング性能について試験した。TCAアッセイを用いてタンパク質含量を測定し、AAPFアッセイを用いてプロテアーゼ活性についてアッセイした。実施例1に記載のようにすべてのアッセイを実施し、BPN'-v36(PI値1.0を有する)と比較して性能指数を算出した。

30

## 【0459】

以下のBPN'-v36変異体:A088T-L257G, A116T-A128S, N061S-N109G-A128S-N243V-S260P, S009T-N109G-A128S-K141R-N243V, S009T-S018T-Y021N-N109G-A128S-K141R, 及びS162G-K256R, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Qアミノ酸配列(配列番号6)は、pH 8及び16での洗剤組成物4のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'-v36と比較して1.0超、少なくとも1.1、少なくとも1.2、少なくとも1.3、少なくとも1.4、少なくとも1.5、少なくとも1.6、少なくとも1.7、少なくとも1.8、少なくとも1.9、少なくとも2、1.0超~約10、1.0超~約8、又は1

40

50



． 0 超～約 5 の P I 値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号 2 の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、B P N '、B P N ' - v 3、及び B P N ' - v 3 6 と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、B P N '、B P N ' - v 3 及び B P N ' - v 3 6 よりも P I 値が大きい。本発明は、本 B M I 微小標本クリーニングアッセイにおいて、B P N '、B P N ' - v 3 及び B P N ' - v 3 6 と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、B P N ' - v 3 と比較して 1 . 0 超～約 5 の P I 値を有する、並びに / あるいは、B P N ' - v 3 6 と比較して 1 . 0 超～約 5 の P I 値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号 2 又は配列番号 6 の配列に対して少なくとも 6 0 %、7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 % 又は 9 8 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも 1 組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号 2 の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。

【 0 4 6 0 】

以下の B P N ' - v 3 6 変異体：A 0 8 8 T，A 0 8 8 T - A 1 1 6 T，A 0 8 8 T - G 1 3 1 H，A 0 8 8 T - K 2 5 6 R，A 0 8 8 T - N 1 0 9 G，A 0 8 8 T - N 2 4 3 V，A 0 8 8 T - Q 1 0 3 H，A 0 8 8 T - S 1 6 2 G，A 0 8 8 T - S 2 4 8 N，A 0 8 8 T - S 2 4 9 A，A 0 8 8 T - T 1 5 8 S，A 1 1 6 T，A 1 1 6 T - G 1 3 1 H，A 1 1 6 T - K 2 5 6 R，A 1 1 6 T - L 2 5 7 G，A 1 1 6 T - N 2 4 3 V，A 1 1 6 T - S 1 6 2 G，A 1 1 6 T - S 2 4 8 N，A 1 1 6 T - S 2 4 9 A，A 1 1 6 T - T 1 5 8 S，A 1 2 8 S - K 2 5 6 R，A 1 2 8 S - L 2 5 7 G，A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R，A 1 2 8 S - S 1 6 2 G，A 1 2 8 S - S 2 4 8 N，A 1 2 8 S - S 2 4 9 A，A 1 2 8 S - T 1 5 8 S，G 0 2 4 E - A 1 1 6 T，G 0 2 4 E - K 2 5 6 R，G 0 2 4 E - L 2 5 7 G，G 0 2 4 E - N 1 0 9 G，G 0 2 4 E - N 2 4 3 V，G 0 2 4 E - T 1 5 8 S，G 1 3 1 H，G 1 3 1 H - K 2 5 6 R，G 1 3 1 H - L 2 5 7 G，G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R，G 1 3 1 H - S 1 6 2 G，G 1 3 1 H - S 2 4 8 N，G 1 3 1 H - S 2 4 9 A，G 1 3 1 H - T 1 5 8 S，K 0 4 3 Y - A 0 8 8 T，K 0 4 3 Y - K 2 5 6 R，K 0 4 3 Y - N 2 4 3 V，K 2 5 6 R，K 2 5 6 R - L 2 5 7 G，L 2 5 7 G，N 0 6 1 G - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V，N 0 6 1 P - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V，N 0 6 1 P - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V，N 0 6 1 S - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 6 0 P，N 0 6 1 S - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - S 2 6 0 P，N 0 6 1 S - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 6 0 P，N 0 6 1 S - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V，N 0 7 6 D - K 2 5 6 R，N 0 7 6 D - L 2 5 7 G，N 0 7 6 D - N 1 0 9 G，N 0 7 6 D - T 1 5 8 S，N 1 0 9 A - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R，N 1 0 9 G，N 1 0 9 G - A 1 1 6 T，N 1 0 9 G - A 1 2 8 S，N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R，N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R，N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 A，N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 A - K 2 5 6 R，N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N，N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R，N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G，N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 1 6 2 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R，N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R，N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R，N 1 0 9 G - G 1 3 1 H，N 1 0 9 G - K 2 5 6 R，N 1 0 9 G - L 2 5 7 G，N 1 0 9 G - N 2 1 8 S，N 1 0 9 G - N 2 4 3 P - S 2 4 8 A - K 2 5 6 R，N 1 0 9 G - N 2 4 3 P - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R，N 1 0 9 G - N 2 4 3 V，N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R，N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 A - K 2 5 6 R，N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N，N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R，N 1 0 9 G - S 1 6 2 G，N 1 0 9 G - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R，N 1 0 9 G - S 2 4 9 A，N 1 0 9 G - T 1 5 8 S，N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R，N 1 0 9 S - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R，N 2 1 8 S - N 2

10

20

30

40

50

4 3 V , N 2 4 3 V , N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 2 4 3 V - S 2 4 9 A , P 0 4 0 A - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , Q 1 0 3 H - A 1 1 6 T , Q 1 0 3 H - A 1 2 8 S , Q 1 0 3 H - G 1 3 1 H , Q 1 0 3 H - K 2 5 6 R , Q 1 0 3 H - L 2 5 7 G , Q 1 0 3 H - N 1 0 9 G , Q 1 0 3 H - N 2 1 8 S , Q 1 0 3 H - N 2 4 3 V , Q 1 0 3 H - S 1 6 2 G , Q 1 0 3 H - S 2 4 8 N , Q 1 0 3 H - S 2 4 9 A , Q 1 0 3 H - T 1 5 8 S , S 0 0 9 T - A 1 2 8 S - K 1 4 1 R - N 2 4 3 V , S 0 0 9 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - K 1 4 1 R , S 0 0 9 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - K 1 4 1 R - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 0 0 9 T - S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - A 1 2 8 S - K 1 4 1 R - N 2 4 3 V , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - N 0 6 1 S - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 6 0 P , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - N 0 6 1 S - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 6 0 P , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 P - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T - N 2 4 3 V , S 0 3 3 T - Q 1 0 3 H , S 0 3 3 T - T 1 5 8 S , S 0 6 3 G , S 0 6 3 G - A 0 8 8 T , S 0 6 3 G - A 1 2 8 S , S 0 6 3 G - K 2 5 6 R , S 0 6 3 G - L 2 5 7 G , S 0 6 3 G - N 0 7 6 D , S 0 6 3 G - N 1 0 9 G , S 0 6 3 G - Q 1 0 3 H , S 0 6 3 G - S 1 6 2 G , S 0 6 3 G - S 2 4 8 N , S 0 6 3 G - T 1 5 8 S , S 1 6 2 G , S 1 6 2 G - L 2 5 7 G , S 1 6 2 G - N 2 4 3 V , S 1 6 2 G - S 2 4 8 N , S 2 4 8 N , S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , S 2 4 9 A , T 1 5 8 S , T 1 5 8 S - L 2 5 7 G , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , T 1 5 8 S - N 2 4 3 V , T 1 5 8 S - S 2 4 8 N , 及び T 1 5 8 S - S 2 4 9 A , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Qアミノ酸配列(配列番号6)は、pH 8及び16での洗剤組成物4のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v 3 6と比較して約1.0のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'よりもPI値が大きい。本発明は、本BMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、BPN' - v 3と比較して約1.0のPI値を有する、並びに、BPN' - v 3 6と比較して約1.0のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は、配列番号2又は配列番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0461】

以下のBPN' - v 3 6変異体: A 0 0 1 E - A 0 8 8 T , A 0 0 1 E - A 1 1 6 T , A 0 0 1 E - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V , A 0 0 1 E - G 1 3 1 H - G 1 6 9 A - N 2 4 3 V , A 0 0 1 E - K 2 5 6 R , A 0 0 1 E - N 1 0 9 G , A 0 0 1 E - N 2 4 3 V , A 0 0 1 E - S 0 3 3 T , A 0 0 1 E - S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - N 2 1 8 S , A 0 0 1 E - S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V , A 0 0 1 E - S 1 6 2 G , A 0 0 1 E - T 1 5 8 S , A 0 8 8 T - A 1 2 8 S , A 0 8 8 T - G 1 6 9 A , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - Q 2 0 6 D , A 1 1 6 T - G 1 6 9 A , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S , A 1 1 6 T - Q 2 0 6 D , A 1 2 8 S , A 1 2 8 S - G 1 3 1 H , A 1 2 8 S - G 1 6 9 A , A 1 2 8 S - N 2 1 8 S , A 1 2 8 S - N 2 4 3 V , A 1 2 8 S - Q 2 0 6 D , G 0

10

20

30

40

50

2 4 E , G 0 2 4 E - A 0 8 8 T , G 0 2 4 E - A 1 2 8 S , G 0 2 4 E - G 1 3 1 H ,  
 G 0 2 4 E - K 0 4 3 Y , G 0 2 4 E - N 2 1 8 S , G 0 2 4 E - Q 1 0 3 H , G 0 2 4  
 E - S 0 3 3 T , G 0 2 4 E - S 0 6 3 G , G 0 2 4 E - S 1 6 2 G , G 0 2 4 E - S 2  
 4 8 N , G 0 2 4 E - S 2 4 9 A , G 1 3 1 H - G 1 6 9 A , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S ,  
 G 1 3 1 H - N 2 4 3 V , G 1 3 1 H - Q 2 0 6 D , G 1 6 9 A , G 1 6 9 A - K 2 5 6  
 R , G 1 6 9 A - L 2 5 7 G , G 1 6 9 A - N 2 1 8 S , G 1 6 9 A - N 2 4 3 V , G 1  
 6 9 A - Q 2 0 6 D , G 1 6 9 A - S 2 4 8 N , G 1 6 9 A - S 2 4 9 A , K 0 4 3 Y ,  
 K 0 4 3 Y - A 1 1 6 T , K 0 4 3 Y - A 1 2 8 S , K 0 4 3 Y - G 1 3 1 H , K 0 4 3  
 Y - G 1 6 9 A , K 0 4 3 Y - L 2 5 7 G , K 0 4 3 Y - N 1 0 9 G , K 0 4 3 Y - N 2  
 1 8 S , K 0 4 3 Y - Q 1 0 3 H , K 0 4 3 Y - S 0 6 3 G , K 0 4 3 Y - S 1 6 2 G ,  
 K 0 4 3 Y - S 2 4 8 N , K 0 4 3 Y - S 2 4 9 A , K 0 4 3 Y - T 1 5 8 S , N 0 7 6  
 D , N 0 7 6 D - A 0 8 8 T , N 0 7 6 D - A 1 2 8 S , N 0 7 6 D - G 1 3 1 H , N 0  
 7 6 D - N 2 1 8 S , N 0 7 6 D - N 2 4 3 V , N 0 7 6 D - Q 1 0 3 H , N 0 7 6 D -  
 S 1 6 2 G , N 0 7 6 D - S 2 4 8 N , N 0 7 6 D - S 2 4 9 A , N 1 0 9 G - G 1 6 9  
 A , N 1 0 9 G - Q 2 0 6 D , N 1 0 9 G - S 2 4 8 N , N 2 1 8 S , N 2 1 8 S - K 2  
 5 6 R , N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , N 2 1 8 S - S 2 4 9 A ,  
 P 0 4 0 E - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H , Q 1 0 3 H , Q 1 0 3 H - G 1 6 9  
 A , Q 2 0 6 D , Q 2 0 6 D - K 2 5 6 R , Q 2 0 6 D - L 2 5 7 G , Q 2 0 6 D - N 2  
 1 8 S , Q 2 0 6 D - N 2 4 3 V , Q 2 0 6 D - S 2 4 8 N , Q 2 0 6 D - S 2 4 9 A ,  
 S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8  
 N - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T , S 0 3 3 T - A 0 8 8 T , S 0 3 3 T - A 1 1 6 T , S 0  
 3 3 T - A 1 2 8 S , S 0 3 3 T - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - N 2 4 3 P , S 0 3 3 T -  
 G 1 3 1 H , S 0 3 3 T - K 0 4 3 Y , S 0 3 3 T - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T - L 2 5 7  
 G , S 0 3 3 T - N 0 7 6 D , S 0 3 3 T - N 0 7 6 D - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S , S 0  
 3 3 T - N 0 7 6 D - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N -  
 K 2 5 6 R , S 0 3 3 T - N 1 0 9 G , S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3  
 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T - N 2 1 8 S , S 0 3 3 T - P 0 4 0 E - Q 1  
 0 3 H - N 1 0 9 G , S 0 3 3 T - Q 1 0 3 H - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H , S 0 3 3 T -  
 Q 2 0 6 D , S 0 3 3 T - S 0 6 3 G , S 0 3 3 T - S 1 6 2 G , S 0 3 3 T - S 2 4 8  
 N , S 0 3 3 T - S 2 4 9 A , S 0 6 3 G - A 1 1 6 T , S 0 6 3 G - G 1 3 1 H , S 0  
 6 3 G - G 1 6 9 A , S 0 6 3 G - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H , S 0 6 3 G -  
 N 2 1 8 S , S 0 6 3 G - N 2 4 3 V , S 0 6 3 G - Q 2 0 6 D , S 0 6 3 G - S 2 4 9  
 A , S 1 6 2 G - G 1 6 9 A , S 1 6 2 G - N 2 1 8 S , S 1 6 2 G - Q 2 0 6 D , S 1  
 6 2 G - S 2 4 9 A , S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 2 4 8 N - S 2 4 9 A , S 2 4 9 A -  
 K 2 5 6 R , S 2 4 9 A - L 2 5 7 G , T 1 5 8 S - G 1 6 9 A , T 1 5 8 S - K 2 5 6  
 R , T 1 5 8 S - Q 2 0 6 D , 及び T 1 5 8 S - S 1 6 2 G , からなる群から選択される  
 少なくとも 1 組のアミノ酸置換を含む B P N ' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N -  
 S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q アミノ酸配列 ( 配列番号 6 ) は、pH 8 及び 16  
 での洗剤組成物 4 の B M I 微小標本クリーニングアッセイにおいて、B P N ' - v 3 6  
 と比較して約 0 . 9 の P I 値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位  
 置は配列番号 2 の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタン  
 パク質分解活性を有する。本発明は、本 B M I 微小標本クリーニングアッセイにおいて、  
 B P N ' ( 配列番号 2 ) と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに / ある  
 いは、B P N ' - v 3 6 と比較して約 0 . 9 の P I 値を有する、プロテアーゼ変異体を含  
 み、この変異体は配列番号 2 又は配列番号 6 の配列に対して少なくとも 6 0 %、7 0 %、  
 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、  
 9 8 % 又は 9 9 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくと  
 も 1 組の酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号 2 の配列のアミノ酸  
 位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載される  
 ような、少なくともこのような 1 つの変異体を含む組成物 ( クリーニング組成物が挙げら

10

20

30

40

50

れるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0462】

以下のBPN' - v36変異体：A001E, A001E - A128S, A001E - G024E, A001E - G131H, A001E - G169A, A001E - L257G, A001E - N218S, A001E - Q103H, A001E - S063G, A001E - S248N, A001E - S249A, G024E - N076D, K043Y - N076D, K043Y - Q206D, N076D - A116T, N076D - G169A, N076D - Q206D, Q103H - Q206D, S033T - G169A, S033T - S063G - Q103H - N109Q - A128S - G131H - G169A - N243P, S033T - S063G - Q103H - N109Q - A128S - G131H - G169A - N243V, A001E - K043Y, A001E - N076D, A001E - N076D - N109G - A128S, A001E - Q206D, 及びG024E - Q206D, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN' - S024G - S053G - S078N - S101N - G128A - Y217Qアミノ酸配列(配列番号6)は、pH 8及び16での洗剤組成物4のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v36と比較して0.5以上0.9未満のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。

10

【0463】

本発明は、本BMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN' - v36と比較して0.5以上0.9未満のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、変異体は、配列番号2又は配列番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組の酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

20

30

【0464】

以下のBPN' - v36変異体：A116T, A088T - N243V, G024E - A116T, K043Y, N076D - A116T, N218S - S248N, S033T - N243V, S033T - S063G, S248N - L257G, A001E - S249A, A088T - A116T, A088T - A128S, A088T - G131H, A088T - L257G, A088T - N109G, A088T - S248N, A088T - S249A, A116T - N243V, A116T - T158S, A128S, A128S - K256R, A128S - L257G, A128S - N243V, A128S - S248N, A128S - T158S, G024E - A088T, G024E - A128S, G024E - G131H, G024E - K256R, G024E - L257G, G024E - N218S, G024E - N243V, G024E - S162G, G024E - S249A, G024E - T158S, G131H, G131H - K256R, G131H - S249A, K043Y - A088T, K043Y - A116T, K256R, N076D - K256R, N109G, N109G - A116T, N109G - A128S, N109G - A128S - N243V - K256R, N109G - A128S - N243V - S248A, N109G - G131H, N109G - K256R, N109G - L257G, N109G - N218S, N109G - N243V, N109G - S248N, N218S - L257G, N243V, N243V - K256R, N243V - L257G, N243V - S248N, N243V - S249A, Q103H - A128S, Q103H - G131H, Q103H - K256R, Q103H - L257G, Q103H -

40

50

N 2 4 3 V , Q 1 0 3 H - S 2 4 8 N , Q 1 0 3 H - S 2 4 9 A , Q 1 0 3 H - T 1 5 8 S , Q 2 0 6 D - N 2 4 3 V , S 0 3 3 T - A 1 2 8 S , S 0 3 3 T - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T - N 0 7 6 D , S 0 3 3 T - N 2 1 8 S , S 0 3 3 T - S 2 4 8 N , S 0 3 3 T - T 1 5 8 S , S 0 6 3 G - A 1 2 8 S , S 0 6 3 G - K 2 5 6 R , S 0 6 3 G - N 2 4 3 V , S 0 6 3 G - S 1 6 2 G , S 0 6 3 G - T 1 5 8 S , S 1 6 2 G - K 2 5 6 R , S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 2 4 9 A , T 1 5 8 S - N 2 4 3 V , 及び T 1 5 8 S - S 2 4 9 A , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含む B P N ' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q アミノ酸配列 (配列番号 6) は、pH 7 及び 16 での洗剤組成物 4 の B M I 微小標本クリーニングアッセイにおいて、B P N ' - v 3 6 と比較して 1.0 超、少なくとも 1.1、少なくとも 1.2、少なくとも 1.3、少なくとも 1.4、少なくとも 1.5、少なくとも 1.6、少なくとも 1.7、少なくとも 1.8、少なくとも 1.9、少なくとも 2、1.0 超 ~ 約 10、1.0 超 ~ 約 8、又は 1.0 超 ~ 約 5 の P I 値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号 2 の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、B P N '、B P N ' - v 3、及び B P N ' - v 3 6 と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、B P N '、B P N ' - v 3 及び B P N ' - v 3 6 よりも P I 値が大きい。本発明は、本 B M I 微小標本クリーニングアッセイにおいて、B P N ' (配列番号 2) と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、B P N '、B P N ' - v 3 及び B P N ' - v 3 6 と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、B P N ' - v 3 と比較して 1.0 超 ~ 5 の P I 値を有する、並びに / あるいは、B P N ' - v 3 6 と比較して 1.0 超 ~ 約 5 の P I 値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号 2 又は配列番号 6 の配列に対して少なくとも 60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 又は 99% の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも 1 組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号 2 の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような 1 つの変異体を含む組成物 (クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも 1 つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

#### 【 0 4 6 5 】

以下の B P N ' - v 3 6 変異体 : A 0 0 1 E - A 1 2 8 S , A 0 0 1 E - G 1 3 1 H , A 0 0 1 E - K 2 5 6 R , A 0 0 1 E - N 2 1 8 S , A 0 0 1 E - N 2 4 3 V , A 0 0 1 E - S 0 3 3 T , A 0 0 1 E - S 0 6 3 G , A 0 0 1 E - S 1 6 2 G , A 0 8 8 T , A 0 8 8 T - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - Q 1 0 3 H , A 0 8 8 T - S 1 6 2 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S , A 1 1 6 T - A 1 2 8 S , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H , A 1 1 6 T - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - S 1 6 2 G , A 1 1 6 T - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - S 2 4 9 A , A 1 2 8 S - G 1 6 9 A , A 1 2 8 S - N 2 1 8 S , A 1 2 8 S - S 1 6 2 G , A 1 2 8 S - S 2 4 9 A , G 0 2 4 E , G 0 2 4 E - N 1 0 9 G , G 0 2 4 E - Q 1 0 3 H , G 0 2 4 E - S 0 3 3 T , G 0 2 4 E - S 0 6 3 G , G 0 2 4 E - S 2 4 8 N , G 1 3 1 H - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - N 2 4 3 V , G 1 3 1 H - S 1 6 2 G , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S , G 1 6 9 A , G 1 6 9 A - L 2 5 7 G , G 1 6 9 A - S 2 4 8 N , K 0 4 3 Y - A 1 2 8 S , K 0 4 3 Y - G 1 3 1 H , K 0 4 3 Y - K 2 5 6 R , K 0 4 3 Y - L 2 5 7 G , K 0 4 3 Y - N 1 0 9 G , K 0 4 3 Y - N 2 4 3 V , K 0 4 3 Y - Q 1 0 3 H , K 0 4 3 Y - S 0 6 3 G , K 0 4 3 Y - S 1 6 2 G , K 0 4 3 Y - S 2 4 8 N , K 0 4 3 Y - S 2 4 9 A , K 0 4 3 Y - T 1 5 8 S , K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , L 2 5 7 G , N 0 6 1 G - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V , N 0 6 1 S - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 6 0 P , N 0 6 1 S - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 6 0 P , N 0 6 1 S - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 6 0 P , N 0 7 6 D - A 0 8 8 T , N 0 7 6 D - A 1 2 8 S , N 0 7 6 D - G 1 6 9 A , N 0 7 6 D - N 2 1 8 S , N 0 7 6 D - N 2 4 3 V , N 0 7 6 D - S 1 6 2 G , N 0 7 6 D - S 2 4 8 N , N 0 7 6

10

20

30

40

50

D - T 1 5 8 S , N 1 0 9 A - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 A - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 1 6 2 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - Q 2 0 6 D , N 1 0 9 G - S 1 6 2 G , N 1 0 9 G - S 2 4 9 A , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S , N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 S - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 2 1 8 S , N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , P 0 4 0 A - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , Q 1 0 3 H , Q 1 0 3 H - A 1 1 6 T , Q 1 0 3 H - G 1 6 9 A , Q 1 0 3 H - N 1 0 9 G , Q 1 0 3 H - N 2 1 8 S , Q 1 0 3 H - S 1 6 2 G , S 0 0 9 T - A 1 2 8 S - K 1 4 1 R - N 2 4 3 V , S 0 0 9 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - K 1 4 1 R , S 0 0 9 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - K 1 4 1 R - N 2 4 3 V , S 0 0 9 T - S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - K 1 4 1 R , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T - A 0 8 8 T , S 0 3 3 T - A 1 1 6 T , S 0 3 3 T - G 1 3 1 H , S 0 3 3 T - K 0 4 3 Y , S 0 3 3 T - L 2 5 7 G , S 0 3 3 T - N 1 0 9 G , S 0 3 3 T - Q 1 0 3 H , S 0 3 3 T - Q 2 0 6 D , S 0 3 3 T - S 1 6 2 G , S 0 3 3 T - S 2 4 9 A , S 0 6 3 G , S 0 6 3 G - A 0 8 8 T , S 0 6 3 G - A 1 1 6 T , S 0 6 3 G - L 2 5 7 G , S 0 6 3 G - N 0 7 6 D , S 0 6 3 G - N 1 0 9 G , S 0 6 3 G - N 2 1 8 S , S 0 6 3 G - Q 1 0 3 H , S 0 6 3 G - S 2 4 8 N , S 0 6 3 G - S 2 4 9 A , S 1 6 2 G , S 1 6 2 G - G 1 6 9 A , S 1 6 2 G - L 2 5 7 G , S 1 6 2 G - N 2 1 8 S , S 1 6 2 G - N 2 4 3 V , S 1 6 2 G - S 2 4 8 N , S 1 6 2 G - S 2 4 9 A , S 2 4 8 N , S 2 4 8 N - S 2 4 9 A , S 2 4 9 A - K 2 5 6 R , S 2 4 9 A - L 2 5 7 G , T 1 5 8 S , T 1 5 8 S - G 1 6 9 A , T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , T 1 5 8 S - L 2 5 7 G , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , 及び T 1 5 8 S - S 2 4 8 N , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含む B P N ' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q アミノ酸配列 (配列番号 6) は、pH 7 及び 16 での洗剤組成物 4 の B M I 微小標本クリーニングアッセイにおいて、B P N ' - v 3 6 と比較して約 1 . 0 の P I 値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号 2 の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、B P N ' プロテアーゼ (配列番号 2) と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、B P N ' よりも P I 値が大きい。本発明は、本 B M I 微小標本クリーニングアッセイにおいて、B P N ' (配列番号 2) と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、B P N ' - v 3 と比較して 1 . 0 の P I 値を有する、並びに、B P N ' - v 3 6 と比較して約 1 . 0 の P I 値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は、配列番号 2 又は配列番号 6 の配列に対して少なくとも 6 0 %、7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも 1 組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号 2 の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような 1 つの変異体を含む組成物 (クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも 1 つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【 0 4 6 6 】

以下の B P N ' - v 3 6 変異体 : A 0 0 1 E , A 0 0 1 E - A 0 8 8 T , A 0 0 1 E - A 1 1 6 T , A 0 0 1 E - G 1 6 9 A , A 0 0 1 E - L 2 5 7 G , A 0 0 1 E - N 1 0 9 G , A 0 0 1 E - S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V , A 0 0 1 E - T 1 5 8 S , A 0 8 8 T - G 1 6 9 A , A 0 8 8 T - Q 2 0 6 D , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S , A 1 2 8 S -

10

20

30

40

50

G 1 3 1 H , A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 2 8 S - Q 2 0 6 D , G 0 2 4 E - K 0 4 3 Y , G 0 2 4 E - N 0 7 6 D , G 0 2 4 E - Q 2 0 6 D , G 1 3 1 H - G 1 6 9 A , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S , G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , G 1 3 1 H - Q 2 0 6 D , G 1 3 1 H - S 2 4 8 N , G 1 6 9 A - K 2 5 6 R , G 1 6 9 A - N 2 1 8 S , G 1 6 9 A - N 2 4 3 V , G 1 6 9 A - Q 2 0 6 D , K 0 4 3 Y - N 0 7 6 D , K 0 4 3 Y - N 2 1 8 S , N 0 6 1 P - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V , N 0 6 1 P - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V , N 0 6 1 S - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - S 2 6 0 P , N 0 6 1 S - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V , N 0 7 6 D , N 0 7 6 D - G 1 3 1 H , N 0 7 6 D - L 2 5 7 G , N 0 7 6 D - N 1 0 9 G , N 0 7 6 D - Q 1 0 3 H , N 0 7 6 D - S 2 4 9 A , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - N 2 4 3 P - S 2 4 8 A - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - N 2 4 3 P - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 A - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 2 1 8 S - S 2 4 9 A , N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , Q 1 0 3 H - Q 2 0 6 D , Q 2 0 6 D , Q 2 0 6 D - K 2 5 6 R , Q 2 0 6 D - N 2 1 8 S , Q 2 0 6 D - S 2 4 8 N , Q 2 0 6 D - S 2 4 9 A , S 0 0 9 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - K 1 4 1 R - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 0 0 9 T - S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - A 1 2 8 S - K 1 4 1 R - N 2 4 3 V , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 6 0 P , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - N 0 6 1 S - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 6 0 P , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T , S 0 3 3 T - G 1 6 9 A , S 0 3 3 T - N 0 7 6 D - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S , S 0 3 3 T - N 0 7 6 D - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 P - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 0 6 3 G - G 1 3 1 H , S 0 6 3 G - G 1 6 9 A , S 1 6 2 G - Q 2 0 6 D , 及び T 1 5 8 S - S 1 6 2 G , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含む BPN' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q アミノ酸配列 (配列番号6) は、pH 7 及び 16 での洗剤組成物4のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v 3 6 と比較して約0.9のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、本BMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN' - v 3 6 と比較して約0.9のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、変異体は、配列番号2又は配列番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組の酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物 (クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

## 【0467】

以下のBPN' - v 3 6 変異体：A 0 0 1 E - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V , A 0 0 1 E - G 0 2 4 E , A 0 0 1 E - G 1 3 1 H - G 1 6 9 A - N 2 4 3 V , A 0 0 1 E - Q 1 0 3 H , A 0 0 1 E - S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - N 2 1 8 S , A 0 0 1 E - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - G 1 6 9 A , A 1 1 6 T - Q 2 0 6 D , G 1 6 9 A - S 2 4 9 A , K 0 4 3 Y - G 1 6 9 A , N 1 0 9 G - G 1 6 9 A , P 0 4 0 E - N 1 0 9 G - A 1 2 8

S - G 1 3 1 H , Q 2 0 6 D - L 2 5 7 G , S 0 3 3 T - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - N 2 4 3 P , S 0 3 3 T - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V , S 0 3 3 T - P 0 4 0 E - Q 1 0 3 H - N 1 0 9 G , S 0 3 3 T - Q 1 0 3 H - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H , S 0 6 3 G - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H , S 0 6 3 G - Q 2 0 6 D , T 1 5 8 S - Q 2 0 6 D , A 0 0 1 E - K 0 4 3 Y , A 0 0 1 E - N 0 7 6 D , A 0 0 1 E - Q 2 0 6 D , S 0 3 3 T - S 0 6 3 G - Q 1 0 3 H - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - G 1 6 9 A - N 2 4 3 P , S 0 3 3 T - S 0 6 3 G - Q 1 0 3 H - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - G 1 6 9 A - N 2 4 3 V , A 0 0 1 E - N 0 7 6 D - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S , K 0 4 3 Y - Q 2 0 6 D , 及び N 0 7 6 D - Q 2 0 6 D , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Qアミノ酸配列(配列番号6)は、pH 7及び16での洗剤組成物4のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v 3 6と比較して0.5以上0.9未満のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、本アッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、並びにノあるいは、BPN' - v 3 6と比較して0.5以上0.9未満のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、変異体は、配列番号2又は配列番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組の酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

#### 【0468】

以下のBPN' - v 3 6変異体：A 0 8 8 T - L 2 5 7 G , G 0 2 4 E - K 2 5 6 R , G 0 2 4 E - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T , N 1 0 9 G - L 2 5 7 G , N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T - N 1 0 9 G , S 0 3 3 T - T 1 5 8 S , S 0 6 3 G - L 2 5 7 G , A 0 0 1 E - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 2 8 S , A 0 8 8 T - G 1 6 9 A , A 0 8 8 T - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S , A 1 1 6 T , A 1 1 6 T - A 1 2 8 S , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H , A 1 1 6 T - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S , A 1 1 6 T - S 1 6 2 G , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S , A 1 2 8 S , A 1 2 8 S - G 1 6 9 A , A 1 2 8 S - K 2 5 6 R , A 1 2 8 S - L 2 5 7 G , A 1 2 8 S - N 2 1 8 S , G 0 2 4 E , G 0 2 4 E - A 1 2 8 S , G 0 2 4 E - G 1 3 1 H , G 0 2 4 E - N 1 0 9 G , G 0 2 4 E - N 2 4 3 V , G 0 2 4 E - S 0 3 3 T , G 0 2 4 E - S 0 6 3 G , G 0 2 4 E - S 2 4 8 N , G 0 2 4 E - S 2 4 9 A , G 0 2 4 E - T 1 5 8 S , G 1 3 1 H , G 1 3 1 H - G 1 6 9 A , G 1 3 1 H - K 2 5 6 R , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S , G 1 3 1 H - S 2 4 9 A , G 1 6 9 A , G 1 6 9 A - L 2 5 7 G , G 1 6 9 A - N 2 4 3 V , K 0 4 3 Y - A 0 8 8 T , K 0 4 3 Y - N 1 0 9 G , K 2 5 6 R , K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 0 6 1 G - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V , N 0 7 6 D - N 1 0 9 G , N 1 0 9 G , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H , N 1 0 9 G - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - N 2 1 8 S , N 1 0 9 G - S 1 6 2 G , N 1 0 9 G - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - S 2 4 9 A , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S , N 2 1 8 S , N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , N 2 4 3 V , N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 2 4 3 V - S 2 4 9 A , P 0 4 0 A - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , Q 1 0 3 H - K 2 5 6 R , Q 1 0 3 H - L 2 5 7 G , Q 1 0 3 H - N 1 0 9 G , S 0 0 9 T - S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - K 1 4 1 R , S 0 3 3 T - A 0 8 8 T , S 0 3 3 T - A 1 1 6 T , S 0 3 3 T - A 1 2 8 S , S 0 3 3 T - G 1 3 1 H , S 0 3 3 T - K 0 4 3 Y ,

10

20

30

40

50



S 0 3 3 T - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T - L 2 5 7 G , S 0 3 3 T - N 0 7 6 D , S 0 3 3 T - N 2 1 8 S , S 0 3 3 T - N 2 4 3 V , S 0 3 3 T - Q 1 0 3 H , S 0 3 3 T - S 0 6 3 G , S 0 3 3 T - S 1 6 2 G , S 0 3 3 T - S 2 4 8 N , S 0 3 3 T - S 2 4 9 A , S 0 6 3 G , S 0 6 3 G - A 0 8 8 T , S 0 6 3 G - A 1 1 6 T , S 0 6 3 G - A 1 2 8 S , S 0 6 3 G - G 1 3 1 H , S 0 6 3 G - K 2 5 6 R , S 0 6 3 G - N 1 0 9 G , S 0 6 3 G - N 2 1 8 S , S 0 6 3 G - N 2 4 3 V , S 0 6 3 G - S 2 4 8 N , S 0 6 3 G - S 2 4 9 A , S 0 6 3 G - T 1 5 8 S , S 1 6 2 G - K 2 5 6 R , S 1 6 2 G - N 2 1 8 S , S 1 6 2 G - N 2 4 3 V , S 1 6 2 G - S 2 4 8 N , S 1 6 2 G - S 2 4 9 A , S 2 4 8 N , S 2 4 9 A , S 2 4 9 A - L 2 5 7 G , T 1 5 8 S , T 1 5 8 S - L 2 5 7 G , 及び T 1 5 8 S - N 2 4 3 V , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含む B P N ' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q アミノ酸配列 (配列番号 6) は、pH 8 及び 16 での洗剤組成物 4 の卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、B P N ' - v 3 6 と比較して 1.0 超、少なくとも 1.1、少なくとも 1.2、少なくとも 1.3、少なくとも 1.4、少なくとも 1.5、少なくとも 1.6、少なくとも 1.7、少なくとも 1.8、少なくとも 1.9、少なくとも 2、1.0 超 ~ 約 10、1.0 超 ~ 約 8、又は 1.0 超 ~ 約 5 の P I 値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号 2 の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、B P N '、B P N ' - v 3、及び B P N ' - v 3 6 と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、B P N '、B P N ' - v 3 及び B P N ' - v 3 6 よりも P I 値が大きい。本発明は、本卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、B P N ' (配列番号 2) と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、B P N '、B P N ' - v 3 及び B P N ' - v 3 6 と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、B P N ' - v 3 と比較して 1.0 超 ~ 5 の P I 値を有する、並びに / あるいは、B P N ' - v 3 6 と比較して 1.0 超 ~ 約 5 の P I 値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号 2 又は配列番号 6 の配列に対して少なくとも 60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 又は 99% の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも 1 組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号 2 の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような 1 つの変異体を含む組成物 (クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも 1 つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

#### 【 0 4 6 9 】

以下の B P N ' - v 3 6 変異体 : A 0 0 1 E , A 0 0 1 E - A 1 1 6 T , A 0 0 1 E - G 1 3 1 H , A 0 0 1 E - G 1 6 9 A , A 0 0 1 E - K 2 5 6 R , A 0 0 1 E - N 1 0 9 G , A 0 0 1 E - S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V , A 0 0 1 E - S 0 6 3 G , A 0 0 1 E - S 2 4 8 N , A 0 0 1 E - S 2 4 9 A , A 0 0 1 E - T 1 5 8 S , A 0 8 8 T , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H , A 0 8 8 T - Q 1 0 3 H , A 0 8 8 T - Q 2 0 6 D , A 0 8 8 T - S 1 6 2 G , A 0 8 8 T - S 2 4 9 A , A 1 1 6 T - G 1 6 9 A , A 1 1 6 T - N 2 4 3 V , A 1 1 6 T - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - S 2 4 9 A , A 1 2 8 S - G 1 3 1 H , A 1 2 8 S - N 2 4 3 V , A 1 2 8 S - S 1 6 2 G , A 1 2 8 S - S 2 4 8 N , A 1 2 8 S - S 2 4 9 A , A 1 2 8 S - T 1 5 8 S , G 0 2 4 E - A 0 8 8 T , G 0 2 4 E - A 1 1 6 T , G 0 2 4 E - K 0 4 3 Y , G 0 2 4 E - N 0 7 6 D , G 0 2 4 E - N 2 1 8 S , G 0 2 4 E - Q 1 0 3 H , G 0 2 4 E - S 1 6 2 G , G 1 3 1 H - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - N 2 4 3 V , G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , G 1 3 1 H - S 1 6 2 G , G 1 3 1 H - S 2 4 8 N , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S , G 1 6 9 A - K 2 5 6 R , G 1 6 9 A - N 2 1 8 S , G 1 6 9 A - Q 2 0 6 D , G 1 6 9 A - S 2 4 8 N , G 1 6 9 A - S 2 4 9 A , K 0 4 3 Y , K 0 4 3 Y - A 1 1 6 T , K 0 4 3 Y - A 1 2 8 S , K 0 4 3 Y - G 1 6 9 A , K 0 4 3 Y - K 2 5 6 R , K 0 4 3 Y - L 2 5 7 G , K 0 4 3 Y - N 0 7 6 D , K 0 4 3 Y - N 2 1 8 S , K 0 4 3 Y - N 2 4 3 V , K 0 4 3

10

20

30

40

50

Y - S 0 6 3 G , K 0 4 3 Y - S 2 4 8 N , K 0 4 3 Y - S 2 4 9 A , K 0 4 3 Y - T 1  
 5 8 S , L 2 5 7 G , N 0 6 1 P - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V , N 0 6 1 P -  
 N 1 0 9 G - N 2 4 3 V , N 0 6 1 S - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 6 0 P , N 0 6 1  
 S - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - S 2 6 0 P , N 0  
 6 1 S - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 6 0 P , N 0 6 1 S - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V ,  
 N 0 7 6 D , N 0 7 6 D - A 0 8 8 T , N 0 7 6 D - A 1 1 6 T , N 0 7 6 D - G 1 3 1  
 H , N 0 7 6 D - G 1 6 9 A , N 0 7 6 D - K 2 5 6 R , N 0 7 6 D - L 2 5 7 G , N 0  
 7 6 D - N 2 1 8 S , N 0 7 6 D - N 2 4 3 V , N 0 7 6 D - Q 1 0 3 H , N 0 7 6 D -  
 S 2 4 9 A , N 0 7 6 D - T 1 5 8 S , N 1 0 9 A - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6  
 R , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V -  
 S 2 4 8 A , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 A - K 2 5 6 R , N 1 0 9  
 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2  
 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R -  
 L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 1 6 2 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6  
 R , N 1 0 9 G - G 1 6 9 A , N 1 0 9 G - N 2 4 3 P - S 2 4 8 A - K 2 5 6 R , N 1  
 0 9 G - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 A - K 2 5 6 R ,  
 N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6  
 R , N 1 0 9 G - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - K 2  
 5 6 R , N 1 0 9 S - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 2 1 8 S - N 2 4 3 V ,  
 N 2 1 8 S - S 2 4 9 A , Q 1 0 3 H , Q 1 0 3 H - A 1 1 6 T , Q 1 0 3 H - A 1 2 8  
 S , Q 1 0 3 H - G 1 3 1 H , Q 1 0 3 H - G 1 6 9 A , Q 1 0 3 H - N 2 1 8 S , Q 1  
 0 3 H - N 2 4 3 V , Q 1 0 3 H - S 1 6 2 G , Q 1 0 3 H - S 2 4 8 N , Q 1 0 3 H -  
 S 2 4 9 A , Q 1 0 3 H - T 1 5 8 S , Q 2 0 6 D , Q 2 0 6 D - L 2 5 7 G , Q 2 0 6  
 D - N 2 1 8 S , S 0 0 9 T - A 1 2 8 S - K 1 4 1 R - N 2 4 3 V , S 0 0 9 T - N 1  
 0 9 G - A 1 2 8 S - K 1 4 1 R , S 0 0 9 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - K 1 4 1 R -  
 N 2 4 3 V , S 0 0 9 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - K 1 4 1 R - N 2 4 3 V - S 2 4 8  
 N - K 2 5 6 R , S 0 0 9 T - S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - A 1 2 8 S - K 1 4 1 R - N 2  
 4 3 V , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N -  
 N 1 0 9 G - A 1 2 8 S , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3  
 V , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2  
 5 6 R , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V -  
 S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T , S 0 3 3 T - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - N 2 4 3  
 V , S 0 3 3 T - G 1 6 9 A , S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 P - S 2  
 4 8 N - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N -  
 K 2 5 6 R , S 0 3 3 T - Q 1 0 3 H - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H , S 0 3 3 T - Q 2 0 6  
 D , S 0 3 3 T - S 0 6 3 G - Q 1 0 3 H - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - G 1  
 6 9 A - N 2 4 3 V , S 0 6 3 G - G 1 6 9 A , S 0 6 3 G - N 0 7 6 D , S 0 6 3 G -  
 N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H , S 0 6 3 G - Q 1 0 3 H , S 0 6 3 G - S 1 6 2  
 G , S 1 6 2 G , S 1 6 2 G - G 1 6 9 A , S 1 6 2 G - L 2 5 7 G , S 2 4 8 N - K 2  
 5 6 R , S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , S 2 4 8 N - S 2 4 9 A , S 2 4 9 A - K 2 5 6 R ,  
 T 1 5 8 S - G 1 6 9 A , T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , T 1 5 8  
 S - S 1 6 2 G , T 1 5 8 S - S 2 4 8 N , 及び T 1 5 8 S - S 2 4 9 A , からなる群か  
 ら選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G -  
 S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Qアミノ酸配列(配列番号6)は、pH  
 8及び16での洗剤組成物4の卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'  
 - v 3 6と比較して約1.0のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のア  
 ミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異  
 体は、本アッセイにおいて、BPN'プロテアーゼ(配列番号2)と比較して向上したタン  
 パク質分解活性を有し、BPN'よりもPI値が大きい。本発明は、本卵微小標本クリ

10

20

30

40

50

ーニングアッセイにおいて、BPN' (配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、BPN' - v3と比較して約1.0のPI値を有する、並びに、BPN' - v36と比較して1.0のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は、配列番号2又は配列番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

10

## 【0470】

以下のBPN' - v36変異体：A001E - A088T, A001E - A128S, A001E - A128S - G131H - N243V, A001E - G024E, A001E - G024E - S204E - Q206D, A001E - G131H - G169A - N243V, A001E - K043Y, A001E - N076D, A001E - N076D - N109G - A128S, A001E - N218S, A001E - N243V, A001E - Q103H, A001E - Q206D, A001E - S033T, A001E - S033T - N109G - N218S, A001E - S162G, A116T - Q206D, A128S - N243V - S248N - K256R, A128S - Q206D, G024E - Q206D, G131H - Q206D, K043Y - G131H, K043Y - Q103H, K043Y - Q206D, K043Y - S162G, N061S - N109G - A128S - N243V - S260P, N076D - A128S, N076D - Q206D, N076D - S162G, N076D - S248N, N109G - A128S - S248N - K256R, N109G - A128S - T158S - N243V - S248N - K256R, N109G - N243P - S248N - K256R, N109G - Q206D, N243V - S248N - K256R, P040E - N109G - A128S - G131H, Q103H - Q206D, Q206D - K256R, Q206D - N243V, Q206D - S248N, Q206D - S249A, S018T - Y021N - N061S - A128S - N243V - S260P, S018T - Y021N - N061S - N109G - A128S - S260P, S033T - A128S - G131H - N243P, S033T - N076D - A128S - N218S, S033T - N076D - N109G - A128S - N218S - N243V - S248N - K256R, S033T - P040E - Q103H - N109G, S033T - S063G - Q103H - N109Q - A128S - G131H - G169A - N243P, S063G - Q206D, S162G - Q206D, 及びT158S - Q206D, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN' - S024G - S053G - S078N - S101N - G128A - Y217Qアミノ酸配列(配列番号6)は、pH 8及び16での洗剤組成物4の卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v36と比較して0.5以上0.9未満のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、本アッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN' - v36と比較して0.5以上0.9未満のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、変異体は、配列番号2又は配列番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組の酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのよ

20

30

40

50

うな変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0471】

以下のBPN' - v36変異体：T158S - L257G, K256R, L257G, S033T - N109G, S162G - K256R, S162G - L257G, G024E - K256R, G024E - L257G, G024E - S033T, N109G - A116T, N218S - L257G, S033T - A088T, S033T - A116T, S033T - N243V, S033T - Q103H, S162G - N218S, S162G - N243V, T158S, T158S - N218S, T158S - N243V, A088T, A088T - G169A, A088T - K256R, A088T - L257G, A088T - S162G, A088T - T158S, A116T - K256R, A116T - L257G, A116T - N243V, A128S - L257G, A128S - N218S, A128S - N243V, A128S - S248N, G024E - A116T, G024E - A128S, G024E - G131H, G024E - N243V, G024E - S248N, G024E - S249A, G024E - T158S, G131H - N243V, G131H - T158S, G169A - N218S, G169A - N243V, G169A - S248N, K256R - L257G, N109G - A128S, N109G - G131H, N109G - N218S, N109G - N243V, N109G - S249A, N218S, N218S - K256R, N218S - N243V, N218S - S249A, N243V, N243V - K256R, N243V - L257G, N243V - S248N, Q103H - N109G, Q103H - N218S, S033T - A128S, S033T - L257G, S033T - N218S, S033T - S162G, S033T - S248N, S033T - T158S, S063G - K256R, S063G - L257G, S162G, S162G - G169A, S162G - S248N, S248N, S248N - K256R, S248N - L257G, S249A, T158S - S162G, 及びT158S - S248N, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN' - S024G - S053G - S078N - S101N - G128A - Y217Qアミノ酸配列(配列番号6)は、pH 8及び16での洗剤組成物4の植物微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v36と比較して1.0超、少なくとも1.1、少なくとも1.2、少なくとも1.3、少なくとも1.4、少なくとも1.5、少なくとも1.6、少なくとも1.7、少なくとも1.8、少なくとも1.9、少なくとも2.1.0超~約10、1.0超~約8、又は1.0超~約5のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'、BPN' - v3、及びBPN' - v36と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'、BPN' - v3及びBPN' - v36よりもPI値が大きい。本発明は、本BMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、BPN'、BPN' - v3及びBPN' - v36と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、BPN' - v3と比較して1.0超~約5のPI値を有する、並びに/あるいは、BPN' - v36と比較して1.0超~約5のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号2又は配列番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0472】

以下のBPN' - v36変異体：A001E - A088T, A001E - A116T, A088T - A128S, A088T - N243V, A088T - Q103H, A088

10

20

30

40

50

T - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - S 2 4 9 A , A 1 1 6 T , A 1 1 6 T - G 1 6 9 A , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S , A 1 1 6 T - S 1 6 2 G , A 1 1 6 T - S 2 4 9 A , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S , A 1 2 8 S - G 1 6 9 A , A 1 2 8 S - K 2 5 6 R , A 1 2 8 S - S 1 6 2 G , A 1 2 8 S - S 2 4 9 A , A 1 2 8 S - T 1 5 8 S , G 0 2 4 E - A 0 8 8 T , G 0 2 4 E - K 0 4 3 Y , G 0 2 4 E - N 2 1 8 S , G 0 2 4 E - Q 1 0 3 H , G 0 2 4 E - S 0 6 3 G , G 0 2 4 E - S 1 6 2 G , G 1 3 1 H - G 1 6 9 A , G 1 3 1 H - K 2 5 6 R , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S , G 1 3 1 H - S 1 6 2 G , G 1 3 1 H - S 2 4 8 N , G 1 3 1 H - S 2 4 9 A , G 1 6 9 A , G 1 6 9 A - L 2 5 7 G , G 1 6 9 A - S 2 4 9 A , N 0 7 6 D , N 0 7 6 D - K 2 5 6 R , N 0 7 6 D - L 2 5 7 G , N 0 7 6 D - S 1 6 2 G , N 0 7 6 D - S 2 4 9 A , N 1 0 9 G - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - S 2 4 8 N , N 2 4 3 V - S 2 4 9 A , Q 1 0 3 H - A 1 1 6 T , Q 1 0 3 H - G 1 6 9 A , Q 1 0 3 H - K 2 5 6 R , Q 1 0 3 H - L 2 5 7 G , Q 1 0 3 H - N 2 4 3 V , Q 1 0 3 H - S 1 6 2 G , S 0 3 3 T - G 1 3 1 H , S 0 3 3 T - G 1 6 9 A , S 0 3 3 T - K 0 4 3 Y , S 0 3 3 T - N 0 7 6 D , S 0 3 3 T - Q 2 0 6 D , S 0 6 3 G , S 0 6 3 G - A 1 1 6 T , S 0 6 3 G - A 1 2 8 S , S 0 6 3 G - N 2 4 3 V , S 0 6 3 G - S 1 6 2 G , S 0 6 3 G - S 2 4 8 N , S 0 6 3 G - S 2 4 9 A , S 0 6 3 G - T 1 5 8 S , S 2 4 9 A - L 2 5 7 G , T 1 5 8 S - G 1 6 9 A , 及び T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Qアミノ酸配列(配列番号6)は、pH 8及び16での洗剤組成物4の植物微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v 3 6と比較して約1.0のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'よりもPI値が大きい。本発明は、本BMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、BPN' - v 3と比較して1.0のPI値を有する、並びに、BPN' - v 3 6と比較して約1.0のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は、配列番号2又は配列番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0473】

以下のBPN' - v 3 6変異体：A 0 0 1 E - G 1 6 9 A , A 0 0 1 E - K 2 5 6 R , A 0 0 1 E - N 1 0 9 G , A 0 0 1 E - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S , A 1 1 6 T - A 1 2 8 S , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H , A 1 1 6 T - S 2 4 8 N , A 1 2 8 S , A 1 2 8 S - G 1 3 1 H , G 0 2 4 E , G 0 2 4 E - N 1 0 9 G , G 1 3 1 H , G 1 3 1 H - L 2 5 7 G , G 1 6 9 A - K 2 5 6 R , G 1 6 9 A - Q 2 0 6 D , K 0 4 3 Y , K 0 4 3 Y - A 0 8 8 T , K 0 4 3 Y - L 2 5 7 G , K 0 4 3 Y - N 1 0 9 G , N 0 7 6 D - A 0 8 8 T , N 0 7 6 D - G 1 3 1 H , N 0 7 6 D - G 1 6 9 A , N 0 7 6 D - N 2 4 3 V , N 0 7 6 D - T 1 5 8 S , N 1 0 9 G , N 1 0 9 G - S 1 6 2 G , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S , N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , Q 1 0 3 H - A 1 2 8 S , Q 1 0 3 H - S 2 4 8 N , Q 1 0 3 H - S 2 4 9 A , Q 1 0 3 H - T 1 5 8 S , Q 2 0 6 D - K 2 5 6 R , Q 2 0 6 D - L 2 5 7 G , Q 2 0 6 D - N 2 1 8 S , Q 2 0 6 D - N 2 4 3 V , Q 2 0 6 D - S 2 4 8 N , S 0 3 3 T , S 0 3 3 T - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T - S 0 6 3 G , S 0 3 3 T - S 2 4 9 A , S 0 6 3 G - A 0 8 8 T , S 0 6 3 G - G 1 3 1 H , S 0 6 3 G - G 1 6 9 A , S 0 6 3

10

20

30

40

50

G - N 1 0 9 G , S 1 6 2 G - Q 2 0 6 D , S 1 6 2 G - S 2 4 9 A , S 2 4 8 N - S 2 4 9 A , S 2 4 9 A - K 2 5 6 R , T 1 5 8 S - Q 2 0 6 D , T 1 5 8 S - S 2 4 9 A , A 0 0 1 E - L 2 5 7 G , A 0 0 1 E - N 2 4 3 V , A 0 0 1 E - Q 1 0 3 H , A 0 0 1 E - S 0 6 3 G , A 0 0 1 E - S 1 6 2 G , A 0 0 1 E - T 1 5 8 S , G 0 2 4 E - N 0 7 6 D , G 1 3 1 H - Q 2 0 6 D , K 0 4 3 Y - A 1 1 6 T , K 0 4 3 Y - G 1 6 9 A , K 0 4 3 Y - K 2 5 6 R , K 0 4 3 Y - N 0 7 6 D , K 0 4 3 Y - S 0 6 3 G , K 0 4 3 Y - S 1 6 2 G , K 0 4 3 Y - S 2 4 8 N , K 0 4 3 Y - S 2 4 9 A , K 0 4 3 Y - T 1 5 8 S , N 0 7 6 D - A 1 1 6 T , N 0 7 6 D - A 1 2 8 S , N 0 7 6 D - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - G 1 6 9 A , Q 1 0 3 H , Q 1 0 3 H - G 1 3 1 H , Q 2 0 6 D - S 2 4 9 A , S 0 6 3 G - N 0 7 6 D , S 0 6 3 G - N 2 1 8 S , S 0 6 3 G - Q 1 0 3 H , A 0 0 1 E - A 1 2 8 S , A 0 0 1 E - G 0 2 4 E , A 0 0 1 E - G 1 3 1 H , A 0 0 1 E - N 0 7 6 D , A 0 0 1 E - Q 2 0 6 D , A 0 0 1 E - S 0 3 3 T , A 0 0 1 E - S 2 4 8 N , A 0 0 1 E - S 2 4 9 A , A 0 8 8 T - Q 2 0 6 D , A 1 1 6 T - Q 2 0 6 D , A 1 2 8 S - Q 2 0 6 D , G 0 2 4 E - Q 2 0 6 D , K 0 4 3 Y - A 1 2 8 S , K 0 4 3 Y - G 1 3 1 H , K 0 4 3 Y - N 2 1 8 S , K 0 4 3 Y - Q 1 0 3 H , N 0 7 6 D - N 1 0 9 G , N 0 7 6 D - N 2 1 8 S , N 0 7 6 D - Q 1 0 3 H , N 1 0 9 G - Q 2 0 6 D , Q 1 0 3 H - Q 2 0 6 D , Q 2 0 6 D , A 0 0 1 E , A 0 0 1 E - K 0 4 3 Y , K 0 4 3 Y - N 2 4 3 V , 及び S 0 6 3 G - Q 2 0 6 D , N 0 7 6 D - Q 2 0 6 D , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含む BPN' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q アミノ酸配列 (配列番号6) は、pH 8 及び 16 での洗剤組成物4の植物微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v 3 6 と比較して0.5以上0.9未満のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、本植物微小標本クリーニングアッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN' - v 3 6 と比較して0.5以上0.9未満のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、変異体は、配列番号2又は配列番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組の酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物 (クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

#### 【0474】

以下のBPN' - v 3 6 変異体: S 0 3 3 T - N 0 7 6 D - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S , A 0 0 1 E - S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - N 2 1 8 S , S 0 3 3 T - N 2 1 8 S , S 0 3 3 T - S 0 6 3 G - Q 1 0 3 H - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - G 1 6 9 A - N 2 4 3 V , A 1 2 8 S - G 1 6 9 A , S 0 3 3 T - S 0 6 3 G - Q 1 0 3 H - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - G 1 6 9 A - N 2 4 3 P , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - N 2 4 3 P , P 0 4 0 E - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H , S 0 3 3 T - A 1 2 8 S , S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - G 1 6 9 A , S 0 6 3 G - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H , G 1 6 9 A , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V , A 1 2 8 S - N 2 1 8 S , A 0 0 1 E - G 1 6 9 A , A 0 8 8 T - G 1 6 9 A , G 1 6 9 A - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - N 2 1 8 S , S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 P - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , G 1 6 9 A - K 2 5 6 R , N 0 7 6 D - G 1 6 9 A , A 0 0 1 E - G 1 3 1 H - G 1 6 9 A - N 2 4 3 V , G 1 6 9 A - S 2 4 9 A , S 0 3 3 T - N 1 0 9 G , G 1

10

20

30

40

50

6 9 A - S 2 4 8 N , K 0 4 3 Y - G 1 6 9 A , K 0 4 3 Y - N 2 1 8 S , N 2 1 8 S -  
L 2 5 7 G , N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 0 6 3 G - G 1 6 9 A , A 0 0 1 E - A 1 2 8  
S - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V , A 0 0 1 E - S 0 3 3 T - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V , A 0  
8 8 T - N 2 1 8 S , G 0 2 4 E - N 2 1 8 S , G 0 2 4 E - S 0 3 3 T , G 1 6 9 A -  
Q 2 0 6 D , N 0 7 6 D - N 2 1 8 S , S 0 3 3 T - L 2 5 7 G , S 1 6 2 G - G 1 6 9  
A , A 0 0 1 E - N 2 1 8 S , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S , G 1 6 9 A - N 2 4 3 V , N 2  
1 8 S , P 0 4 0 A - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R ,  
S 0 3 3 T - N 0 7 6 D , A 0 0 1 E - S 0 3 3 T , A 1 2 8 S - G 1 3 1 H , N 2 1 8  
S - S 2 4 8 N , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S , S 0 3 3 T - K 0  
4 3 Y , S 0 3 3 T - N 2 4 3 V , S 0 3 3 T - Q 2 0 6 D , S 0 6 3 G - N 2 1 8 S ,  
S 1 6 2 G - N 2 1 8 S , T 1 5 8 S - G 1 6 9 A , A 1 1 6 T - G 1 6 9 A , G 1 3 1  
H - G 1 6 9 A , N 0 6 1 S - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 6 0 P , N 1 0 9 G - A 1  
2 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 A ,  
N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 A - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 2 8  
S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , S 0  
0 9 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - K 1 4 1 R , S 0 0 9 T - S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N -  
N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - K 1 4 1 R , S 0 3 3 T - A 0 8 8 T , S 0 3 3 T - S 0 6 3  
G , S 0 3 3 T - S 1 6 2 G , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , A 0 0 1 E - N 0 7 6 D - N 1  
0 9 G - A 1 2 8 S , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R ,  
N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 0 0 9 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8  
S - K 1 4 1 R - N 2 4 3 V , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - N 0 6 1 S - N 1 0 9 G - A 1  
2 8 S - S 2 6 0 P , S 0 3 3 T - A 1 1 6 T , S 0 3 3 T - S 2 4 8 N , S 0 3 3 T -  
S 2 4 9 A , S 0 3 3 T - T 1 5 8 S , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S , N 1 0 9 A - A 1 2 8  
S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 1  
6 2 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - T 1 5 8 S -  
N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 2 1 8 S - S 2 4 9 A , Q 2 0 6 D - N 2 1 8  
S , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V , S 0 1 8 T - Y 0  
2 1 N - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T -  
K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - A 1 2 8 S , N 0 6 1 S - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3  
V - S 2 6 0 P , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , S 0 0 9 T - N 1  
0 9 G - A 1 2 8 S - K 1 4 1 R - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , G 0 2 4 E -  
A 1 2 8 S , N 0 6 1 S - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6  
R - S 2 6 0 P , N 1 0 9 S - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , S 0 3 3 T , S 0  
3 3 T - G 1 3 1 H , A 0 0 1 E - A 1 2 8 S , A 1 2 8 S , A 1 2 8 S - L 2 5 7 G ,  
A 1 2 8 S - Q 2 0 6 D , N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , S 0 0 9  
T - A 1 2 8 S - K 1 4 1 R - N 2 4 3 V , S 0 0 9 T - S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - A 1  
2 8 S - K 1 4 1 R - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - A 1 2 8 S , A 1 2 8 S - K 2 5 6 R ,  
A 1 2 8 S - N 2 4 3 V , N 0 6 1 P - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V , N 0 6 1 S - A 1 2 8  
S - N 2 4 3 V - S 2 6 0 P , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V , A 1  
2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 2 8 S - S 2 4 8 N , A 1 2 8 S -  
S 2 4 9 A , N 0 7 6 D - A 1 2 8 S , S 0 6 3 G - A 1 2 8 S , A 1 2 8 S - S 1 6 2  
G , A 1 2 8 S - T 1 5 8 S , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N - N 0 6 1 S - A 1 2 8 S - N 2  
4 3 V - S 2 6 0 P , S 0 3 3 T - Q 1 0 3 H - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H , N 0 6 1 S -  
N 1 0 9 G - N 2 4 3 V , K 0 4 3 Y - A 1 2 8 S , N 0 6 1 P - N 1 0 9 G - G 1 3 1  
H - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - L 2 5 7 G , A 0 0 1 E - G 0 2 4 E - S 2 0 4 E - Q 2  
0 6 D , A 0 0 1 E - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G , G 0 2 4 E - N 1 0 9 G ,  
K 0 4 3 Y - N 1 0 9 G , N 0 6 1 G - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V , N 0 7 6 D - N 1 0 9  
G , N 1 0 9 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T , N 1 0 9 G - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - N 2  
4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 A - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G -  
Q 2 0 6 D , S 0 6 3 G - N 1 0 9 G , A 0 0 1 E - A 1 1 6 T , A 0 0 1 E - N 1 0 9

10

20

30

40

50

G, A001E - Q206D, A088T - A116T, A088T - N243V, A116T - L257G, G024E - A116T, G024E - L257G, G024E - N243V, G024E - Q206D, N109G - G131H, N109G - N243V, N109G - S162G, N109G - S248N, N109G - S248N - K256R, N109G - S249A, N109G - T158S, N243V - L257G, A001E - A088T, A001E - G024E, A001E - K256R, A001E - N076D, A001E - N243V, A088T, A088T - L257G, A088T - Q206D, A116T, A116T - K256R, A116T - N243V, G024E - A088T, G024E - K043Y, G024E - K256R, G024E - N076D, G024E - S162G, G024E - S248N, K043Y - A088T, K043Y - A116T, K043Y - L257G, K043Y - N243V, K043Y - Q206D, K256R - L257G, N076D - A116T, N076D - L257G, N076D - N243V, N076D - Q206D, N109G - N243V - S248N, N109G - N243V - S248N - K256R, N243V - K256R, Q206D, Q206D - L257G, Q206D - N243V, Q206D - S248N, S063G - K256R, S063G - L257G, T158S - L257G, A001E, A001E - K043Y, A001E - S162G, A001E - S248N, A001E - S249A, A001E - T158S, A088T - K256R, A088T - S162G, A088T - S248N, A088T - S249A, A116T - Q206D, A116T - S248N, A116T - S249A, G024E, G024E - G131H, G024E - S249A, G024E - T158S, G131H, G131H - K256R, G131H - L257G, K043Y - K256R, K043Y - N076D, K256R, L257G, N076D - A088T, N076D - K256R, N076D - S162G, N076D - S248N, N076D - S249A, N109G - N243P - S248A - K256R, N109G - N243P - S248N - K256R, N243V, Q206D - K256R, S033T - P040E - Q103H - N109G, S063G, S063G - A116T, S063G - Q206D, S162G - K256R, S162G - L257G, S162G - N243V, S162G - Q206D, S162G - S248N, S248N, S248N - L257G, S249A, S249A - L257G, T158S, T158S - N243V, 及び T158S - Q206D, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含む BPN' - S024G - S053G - S078N - S101N - G128A - Y217Q アミノ酸配列(配列番号6)は、AAPFタンパク質分解アッセイにおいて、BPN' - v36と比較して1.0超、少なくとも1.1、少なくとも1.2、少なくとも1.3、少なくとも1.4、少なくとも1.5、少なくとも1.6、少なくとも1.7、少なくとも1.8、少なくとも1.9、少なくとも2、1.0超~約10、1.0超~約8、又は1.0超~約5のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'、BPN' - v3、及びBPN' - v36と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'、BPN' - v3及びBPN' - v36よりもPI値

が大きい。本発明は、本アッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、BPN'、BPN' - v3及びBPN' - v36と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、BPN' - v3と比較して1.0超~5のPI値を有する、並びに/又は、BPN' - v36と比較して1.0超~約5のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号2又は配列番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書

の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組



成物（クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない）、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0475】

以下のBPN' - v36変異体：A001E - G131H, A001E - S063G, A088T - G131H, A088T - T158S, A116T - G131H, A116T - S162G, A116T - T158S, G024E - S063G, G131H - N243V, G131H - N243V - K256R, G131H - Q206D, G131H - S249A, K043Y, K043Y - S063G, K043Y - S248N, K043Y - S249A, K043Y - T158S, N076D, N076D - G131H, N076D - T158S, N243V - S248N, N243V - S248N - K256R, N243V - S249A, Q103H - G169A, Q206D - S249A, S063G - N076D, S063G - N243V, S063G - S162G, S063G - S249A, S063G - T158S, S162G, S162G - S249A, S248N - K256R, S248N - S249A, S249A - K256R, T158S - K256R, T158S - S248N, 及びT158S - S249A, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN' - S024G - S053G - S078N - S101N - G128A - Y217Qアミノ酸配列（配列番号6）は、AAPFタンパク質分解アッセイにおいて、BPN' - v36と比較して約1.0のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'（配列番号2）と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'よりもPI値が大きい。本発明は、本アッセイにおいて、BPN'（配列番号2）と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、BPN' - v3と比較して約1.0のPI値を有する、並びに、BPN' - v36と比較して1.0のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は、配列番号2又は配列番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物（クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない）、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0476】

以下のBPN' - v36変異体：G131H - S162G, G131H - S248N, G131H - T158S, K043Y - G131H, K043Y - S162G, S063G - A088T, S063G - G131H, S063G - S248N, T158S - S162G, Q103H - N218S, S033T - Q103H, 及びQ103H - A128S, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN' - S024G - S053G - S078N - S101N - G128A - Y217Qアミノ酸配列（配列番号6）は、AAPFタンパク質分解アッセイにおいて、BPN' - v36と比較して約0.9のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、本タンパク質分解アッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN' - v36と比較して約0.9のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、変異体は、配列番号2又は配列番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組の酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物（クリーニング組成物が

10

20

30

40

50

挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0477】

BMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、タンパク質分解アッセイを有する、BPN'と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、又はBPN'(配列番号2)よりもPI値が大きい、スブチリシンプロテアーゼ変異体も提供され、この変異体は、配列番号2又は配列番号6に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ここで、変異体は、X001E, X009T, X018T, X021N, X024G, X033T, X040A, X043Y, X061G/P/S, X063G, X076D, X088T, X103H, X109A/G/Q/S, X116T, X128S, X131H, X141R, X158S, X162G, X169A, X204E, X206D, X218S, X243P/V, X248A/N, X249A, X256R, X257G, 及びX260P, からなる群から選択される少なくとも1つの置換を含み、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされ、選択的に、変異体はA001E, S009T, S018T, Y021N, S024G, S033T, P040A, K043Y, N061G/P/S, S063G, N076D, A088T, Q103H, N109A/G/Q/S, A116T, G128S, G131H, K141R, T158S, S162G, G169A, S204E, Q206D, N218S, N243P/V, S248A/N, S249A, K256R, L257G, 及びS260P, からなる群から選択される少なくとも1つの置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくとも1つのこのようなプロテアーゼ変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられる)、並びに、少なくとも1つのこのようなプロテアーゼ変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0478】

(実施例9)

親BPN'-v36に基づくコンビナトリアルライブラリからの変異体の構築及び変異体のクリーニング性能

BPN'-v36親分子に基づくBPN'コンビナトリアルライブラリはDNA2.0により作成されたものであり、ライゲーション反応物として供給された。枯草菌(B subtilis)を効率的に形質転換させるため、形質転換前にライゲーション反応混合物中のDNAを増幅させ、形質転換体を実施例2に記載のように増殖させた。16及びpH8での洗剤組成物4のBMI微小標本アッセイ、並びに16及びpH8での洗剤組成物4の卵微小標本アッセイを用いて、変異体をクリーニング性能について試験した。タンパク質含量はTCAアッセイを用いて測定した。実施例1に記載のようにアッセイを実施し、BPN'-v36(すなわち、BPN'-S24G-S53G-S78N-S101N-G128A-Y217Q)(PI値1.0を有する)と比較して性能指数を算出した。

【0479】

以下のBPN'-v36変異体: A088T-A116T-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-N243V-L257G, A088T-T158S-N218S-K256R, A088T-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-A153S-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-L257G, A114S-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-T158S-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-S248N-L257G, A088T-A116T-T158S, A088T-N109G-A116T-G131H-L257G, A088T-N109G-A116

T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2  
4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T -  
N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8  
S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - L 2  
5 7 G , Y 0 0 6 H - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T -  
G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1  
H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2  
4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V -  
K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7  
G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - A 1  
1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T -  
T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3  
V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1  
5 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 2 D -  
N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8  
S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1  
1 6 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H -  
V 1 4 8 A - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9  
G - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0  
8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S -  
N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6  
T , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G - N 2 6 9 S , A 1 1 6 T - T 1  
5 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G ,  
N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3  
V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1  
3 1 H - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S -  
K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , S 0 0 3 P - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6  
R , T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2  
4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R -  
L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - V 1 4 7 A - T 1 5 8 S - N 2 1 8  
S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - S 2 4 8 N - L 2  
5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T -  
T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8  
S - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0  
8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - L 2 5 7 G ,  
A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1  
H - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2  
4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V -  
S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1  
H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1  
1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T -  
N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4 3  
V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - S 2  
4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S -  
L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7  
G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2  
5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - W 2 4 1 R - S 2 4 8 N -  
K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9  
G - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2  
4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G ,

10

20

30

40

50

A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8  
S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2  
1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S -  
N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6  
R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - A 2  
7 4 D , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T -  
T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6  
R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1  
3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N -  
L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - T 1 5 8  
S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2  
4 8 N - L 2 5 7 G - Q 2 7 1 R , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R -  
L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , G 1 3 1  
H - S 2 4 8 N , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - I 2 3 4 T - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , G 1  
3 1 H - W 2 4 1 L - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T -  
G 1 3 1 H - A 1 3 7 V - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9  
G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - A 1 5 1 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1  
0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R ,  
N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , N 1 0 9  
G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - A 1  
1 6 T - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G -  
A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - W 2 4 1 R - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 1 6  
T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1  
5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S -  
S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , N 1 0 9  
G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1  
3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G - A 2 7 4 T ,  
N 1 0 9 G - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - T 1 5 8  
S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2  
5 7 G , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , P 0 1 4 L - A 0 1 5 L -  
L 0 1 6 C - H 0 1 7 T - S 0 1 8 L - Q 0 1 9 K - G 0 2 0 A - Y 0 2 1 T - T 0 2 2  
L - G 0 2 3 E , S 0 0 3 F - A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2  
4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , V 0 0 4 A - A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S -  
N 2 1 8 S , V 0 0 4 A - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - K 2 5 6  
R - L 2 5 7 G , V 0 0 4 L - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2  
5 7 G , Y 0 0 6 H - N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 0 1 T -  
A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T , A 0 8 8  
T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2  
1 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N -  
K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8  
N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2  
5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T -  
A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1  
H - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1  
5 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S ,  
A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6  
R - A 2 7 3 T , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2  
4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S -  
S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3  
V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2

10

20

30

40

50

4 8 N , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G ,  
A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - K 2 5 6 R - L 2 5 7  
G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1  
1 6 T - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G ,  
A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8  
T - A 1 1 6 T - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - K 2  
5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T -  
T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8  
S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - N 2 6 9 S , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1  
5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S -  
N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8  
S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1  
5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V -  
L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6  
R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2  
5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T -  
A 1 1 6 T - V 1 4 3 A - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6  
T

10

- V 1 4 7 I - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3  
1 H - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S  
2 4 8 N , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T  
- G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5  
8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A  
0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G  
, A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8  
8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T  
1 5 8 S - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T  
- G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5  
8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N  
2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - I 1 0 7 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T

20

30

- G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 1 0  
9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G  
1 3 1 H - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S  
- L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4  
3 V , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K  
2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S  
- N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1  
8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G  
1 3 1 H - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V  
- L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4

40

8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N , A  
0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T  
- N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0  
9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A  
1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T  
- G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0  
9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 T - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - N  
1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T  
- N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5  
7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S

50



8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N  
2 4 3 V , A 0 8 8 T - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T  
- N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - S 1 4 5 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8  
8 T - T 1 5 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L  
2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G - Q 2 7 1 H  
, A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - V 1 4 3 A - T 1 5 8 S - K 2 5  
6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S , A  
1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R  
, A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4  
8 N - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - I 2 3 4 T - N  
2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V  
- L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5  
6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - V 1 4 3 F - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , A 1 1 6 T - L  
2 5 7 G , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T  
- N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - N 2 4 3 V , A 1 1 6 T - N 2 4  
3 V - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - S  
2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S  
, A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N  
2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T  
- T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5  
6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - V 1 4 9 I - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K  
2 5 6 R - Q 2 7 1 H , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H  
- N 2 4 3 V , G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , G 1 3 1 H - T 1 5  
8 S , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , G 1 3 1 H - T  
1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V  
- S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - K 2 5  
6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , N  
1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G  
, N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0  
9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G  
1 3 1 H - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V  
- S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4  
8 N , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - I 2 6 8 V , N 1 0 9 G - A  
1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R  
, N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5  
7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - A  
1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T  
- N 2 1 8 S , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0  
9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A  
1 1 6 T - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V  
- K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5  
7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T  
1 5 8 S - G 2 1 1 V - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T  
- T 1 5 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1  
8 S , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L  
2  
5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G ,  
N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7  
G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2

10

20

30

40

50

57G, N109G - A116T - T158S - N243V, N109G - A116T - T158S - Q275R, N109G - G131H - A137V - T158S - N218S - S248N, N109G - G131H - N218S - K237N, N109G - G131H - N218S - N243V - K256R - L257G, N109G - G131H - N218S - S248N - K256R, N109G - G131H - N243V - K256R - L257G, N109G - G131H - S145F - N218S - N243V - K256R - L257G, N109G - G131H - S248N - K256R, N109G - G131H - S248N - L257G, N109G - G131H - T158S - K256R, N109G - G131H - T158S - N218S - N243V - K256R, N109G - G131H - T158S - N243V, N109G - G131H - T158S - N243V - K256R - L257G, N109G - G131H - T158S - N243V - L257G, N109G - G131H - T158S - S248N - L257G, N109G - G131H - T158S - S248N - Q271R, N109G - N218S - L257G, N109G - N218S - N243V, N109G - N243V - K256R - L257G, N109G - N243V - S248N - K256R - L257G, N109G - T158S - I268V, N109G - T158S - K256R, N109G - T158S - N218S - N243V - K256R - L257G, N109G - T158S - N243V, N109G - T158S - N243V - K256R - L257G, N109G - T158S - N243V - S248N, N109S - A116T - S248N, N218S, N218S - N243V - S248N - K256R - L257G, N218S - S248N - L257G, N243V, N243V - K256R, N243V - S248N - K256R, N243V - S248N - K256R - L257G, S105P - A116T - T158S - N218S - N243V - S248N - K256R, S248N, T158S - N243V - K256R, 及びT158S - N243V - L257G, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN' - S024G - S053G - S078N - S101N - G128A - Y217Qアミノ酸配列(配列番号6)は、pH 8及び16での洗剤組成物4のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v36と比較して1.0超、少なくとも1.1、少なくとも1.2、少なくとも1.3、少なくとも1.4、少なくとも1.5、少なくとも1.6、少なくとも1.7、少なくとも1.8、少なくとも1.9、少なくとも2、1.0超~約10、1.0超~約8、又は1.0超~約5のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'、BPN' - v3、及びBPN' - v36と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'、BPN' - v3及びBPN' - v36よりもPI値が大きい。本発明は、本アッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、BPN'、BPN' - v3及びBPN' - v36と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、BPN' - v3と比較して1.0超~約5のPI値を有する、並びに/あるいは、BPN' - v36と比較して1.0超~約5のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号2又は配列番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書

の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0480】

以下のBPN' - v36変異体: A088T, A088T - A116T - G131H - L257G, A088T - A116T - G131H - N218S - A274T, A088

10

20

30

40

50











8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - V 1 4 7 A - N 2 1 8 S - N  
2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R  
, A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G - I 2 6 8 V , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - N 2 4  
3 V , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - N  
2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G  
, A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8  
8 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - N  
2 4 3 V - S 2 4 8 N - N 2 6 9 S , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R  
, A 0 8 8 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5  
6 R , A 0 8 8 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 2 4 3 V - S  
2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G  
, A 0 8 8 T - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - S 2 4 8 N - K 2 5  
6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - S 2 4 8 N - L  
2 5 7 G - I 2 6 8 V , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S , A 0 8 8 T  
- T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8  
8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N  
2 4 3 V - K 2 5 6 R - I 2 6 8 V , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V  
- K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4  
8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - T  
1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R  
- L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8  
8 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N  
2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T  
- T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - V 1 4 7 A - K 2 5 6 R , A 0 9  
8 S - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L  
2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H  
- N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - L 2 5  
7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A  
1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T  
- G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4  
8 N - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - A 2 3 1 V - N 2 4 3 V - L  
2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H  
- T 1 5 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1  
8 S - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L  
2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , A 1 1 6 T  
- G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3  
1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H  
- T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3  
1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A  
1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G  
, A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 1  
6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 T - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T  
1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N  
- L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - K 2 5  
6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A  
1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T  
- N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - S 2 4  
8 N , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - S  
2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T

10

20

30

40

50

- S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - L 2 5 7 G - Q 2 7 1 R , A 1 1  
6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N  
2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N  
- K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5  
7 G , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - T  
1  
5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , G 0 2 4 S - G 0 5 3 S -  
N 0 7 8 S - G 0 9 7 A - N 1 0 1 S - A 1 2 8 S , G 1 3 1 H , G 1 3 1 H - N 2 1 8  
S , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2  
5 6 R , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H -  
N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8  
N - K 2 5 6 R , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , G 1  
3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R ,  
G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8  
N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , G 1 3 1 H - T 1  
5 8 S - K 2 5 6 R , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H -  
T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6  
R - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2  
5 7 G , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , G 1 3 1 H -  
T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - T 1 5 8  
S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2  
5 6 R , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , G 1 3 1 H -  
T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - V 1 4 7 I - N 2 1 8 S - S 2 4 8  
N - K 2 5 6 R , I 1 0 7 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2  
1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , I 1 0 7 T - N 1 0 9 G -  
G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G , N 1 0 9  
G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - A 1 4 4 V - T 1  
5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H -  
K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - L 2 5 7 G , N 1 0 9  
G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1  
1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G -  
A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3  
V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2  
4 8 N , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R ,  
N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6  
T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1  
5 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S -  
L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , N 1 0 9  
G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1  
0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G -  
A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6  
R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2  
4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S -  
S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8  
S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2  
4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - V 1 4 7 A - T 1 5 8 S -  
N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - V 1 4 9  
A - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1  
1 6 T - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G -  
A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3

10

20

30

40

50

V - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - I 2  
6 8 V , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R -  
L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7  
G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2  
4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N -  
L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6  
T - T 1 5 8 S , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2  
4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V -  
S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8  
S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 10  
5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G -  
A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8  
N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - K 2 5 6 R , N 1  
0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S -  
K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7  
G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1  
0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G ,  
N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9  
G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2  
4 3 V , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - 20  
N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6  
R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1  
0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G -  
G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8  
S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2  
4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S -  
N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3  
V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2  
1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S -  
N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 30  
S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - I 2 6 8 V , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2  
4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N -  
K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7  
G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1  
5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - K 1 4 1 E - N 2 1 8 S -  
S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - N 2 1 8 S , N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - N 2 4 3  
V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - N 2  
1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - S 2 6 0 F , N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N ,  
N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - K 2 5 6  
R , N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 40  
5 6 R , N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - N 2 4 3 V -  
S 2 4 8 N - L 2 5 7 G - Q 2 7 5 R , N 1 0 9 G - S 1 8 2 F - S 2 0 4 F - S 2 0 7  
L - N 2 1 8 S - S 2 3 6 F - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - S 2 4 8 N - K 2  
5 6 R , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S -  
L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9  
G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2  
1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V -  
K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9  
G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - S 2  
4 8 N - L 2 5 7 G , N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - 50

S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G - Q 2 7 1 R , P 0 5 7 Q - A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , S 0 0 3 P - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , S 0 0 3 P - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , T 1 5 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - A 2 7 2 V , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 3 3 S , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , T 1 5 8 S - N 2 4 3 V , T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - N 2 6 9 D , 及び V 0 0 4 A - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含む B P N ' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q アミノ酸配列 (配列番号6) は、pH 8 及び 16 での洗剤組成物4のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、B P N ' - v 3 6 と比較して約1.0のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、B P N ' (配列番号2) と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、B P N ' よりもPI値が大きい。本発明は、本アッセイにおいて、B P N ' (配列番号2) と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、B P N ' - v 3 と比較して1.0のPI値を有する、並びに、B P N ' - v 3 6 と比較して約1.0のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は、配列番号2又は配列番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

10

20

30

## 【0481】

以下の B P N ' - v 3 6 変異体 : A 0 8 8 T - A 0 9 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G - L 2 6 7 M , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - I 2 6 8 V , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S -

40

50







V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 2  
 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N -  
 K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8  
 T - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0  
 8 8 T - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R ,  
 A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - T 1 5 8  
 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2  
 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N -  
 K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6

10

R  
 - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5  
 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L  
 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S  
 - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4  
 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G - Q  
 2 7 5 K , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V  
 - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - T 1 5  
 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - L  
 2 5 7 G , A 0 8 8 T - V 1 4 7 I - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G

20

, A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4  
 3 V , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A  
 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G  
 , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1  
 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K  
 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N  
 , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - G 1 3  
 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - V 1 3 9 I - N  
 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - K 1 4 1 E - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V

30

- S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - N 2 1  
 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - N 2 1 8 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A  
 1 1 6 T - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R  
 , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1  
 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L  
 2 5 7 G , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T  
 - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , G 0 2 4 S - G 0 5 3 S - N 0 7  
 8 S - G 0 9 7 A - N 1 0 1 S , G 0 5 3 S - A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G  
 1 3 1 H - T 1 5 8 S - G 1 6 9 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G

40

, G 1 3 1 H - K 1 4 1 R - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , G 1 3 1 H - K 2 5  
 6 R , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N  
 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R  
 , G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5  
 7 G , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N  
 2 4 0 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S  
 - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5  
 6 R - L 2 5 7 G - N 2 6 9 S , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , G  
 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N  
 , K 2 5 6 R , K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1

50

8 S - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L  
 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G  
 , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - W 2 4 1 R - N 2 4 3 V - K 2 5

6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A  
 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T  
 - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0  
 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N  
 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N  
 - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5  
 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S  
 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N  
 - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - I 2 3 4 T - N 2 4 3 V - S 2 4  
 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S  
 2 4 8 N , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G  
 - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 3 7 R - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0  
 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - S  
 2 4 8 N , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S  
 - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4  
 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K  
 2 5 6 R , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G  
 , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5  
 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - N  
 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N  
 - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - S 2 4  
 8 N , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N  
 2 4 3 V , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N 2 1 8 S - K 2 5 6 R  
 , N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 2 1  
 8 S - S 2 4 8 N , N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , S  
 0 0 3 P - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N  
 , S 0 0 3 P - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5  
 6 R , S 1 0 5 H - W 1 0 6 G - I 1 0 7 L - I 1 0 8 S - N 1 0 9 A - G 1 1 0 A - I  
 1 1 1 S - E 1 1 2 N - W 1 1 3 G - A 1 1 4 P , S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , T 1 5 8 S  
 , T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5  
 6 R , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 3 3 S - S 2 4 8 N , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L  
 2 5 7 G , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S  
 - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5  
 7 G , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , T 1 5 8 S - N  
 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G  
 , T 1 5 8 S - S 2 4 8 N , 及び V 0 0 4 L - A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N  
 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ  
 酸置換を含む B P N ' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A  
 - Y 2 1 7 Q アミノ酸配列 ( 配列番号 6 ) は、pH 8 及び 16 での洗剤組成物 4 の B  
 M I 微小標本クリーニングアッセイにおいて、B P N ' - v 3 6 と比較して約 0 . 9 の P  
 I 値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号 2 の配列と  
 対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する  
 。本発明は、本アッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、並びに / あるいは、B  
 P N ' - v 3 6 と比較して約 0 . 9 の P I 値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、変異  
 体は、配列番号 2 又は配列番号 6 の配列に対して少なくとも 6 0 %、7 0 %、8 0 %、8  
 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 % 又は 9 8 % の  
 同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも 1 組の酸置換を含  
 み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号 2 の配列のアミノ酸位置と対応させるこ  
 とにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくとも  
 このような 1 つの変異体を含む組成物 ( クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定

10

20

30

40

50

されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0482】

以下のBPN' - v36変異体：A015S - A088T - N109G - G131H - T158S - N218S - S248N, A088T - A098S - G131H - S248N - K256R - L257G, A088T - A116T - G131H - N218S - N243V - K256R - L257G, A088T - A116T - G131H - T158S - L257G, A088T - A116T - G131H - T158S - N218S - L257G, A088T - A116T - G131H - T158S - N218S - N243V - S248N - K256R - L257G, A088T - A116T - G131H - T158S - N218S - N243V - S248N - L257G, A088T - A116T - N218S - L257G, A088T - A116T - T158S - K256R, A088T - A116T - T158S - S248N - K256R - L257G, A088T - G131H - K141E - N218S - N243V - S248N - L257G, A088T - G131H - K256R, A088T - G131H - N218S - N243V - S248N - K256R, A088T - G131H - N218S - N243V - S248N - L257G, A088T - G131H - N218S - S248N - K256R, A088T - G131H - T158S - S248N - K256R, A088T - G131H - T158S - S248N - K256R - L257G, A088T - I107T - N109G - G131H - N218S - S248N - K256R, A088T - N109G - A116T - G131H - D140G - T158S - N218S - N243V - K256R, A088T - N109G - A116T - G131H - N218S - N243V - K256R, A088T - N109G - A116T - G131H - N218S - N243V - S248N - K256R, A088T - N109G - A116T - G131H - T158S - N218S - S248N - L257G, A088T - N109G - A116T - G131H - T158S - N243V - S248N - K256R - I268V, A088T - N109G - A116T - G131H - V149A - N218S - S248N - K256R - L257G, A088T - N109G - A116T - N218S - N243V - S248N - K256R - L257G, A088T - N109G - A116T - T158S - K256R - L257G, A088T - N109G - A116T - T158S - N218S - N243V - L257G, A088T - N109G - D140G - N243V, A088T - N109G - G131H - D140G - T158S - N243V - S248N - K256R, A088T - N109G - G131H - K141E - T158S - N218S - K256R, A088T - N109G - G131H - N218S - S248N, A088T - N109G - G131H - N218S - S248N - K256R - Q271R, A088T - N109G - G131H - N218S - S248N - L257G, A088T - N109G - G131H - T158S - K256R, A088T - N109G - G131H - T158S - N218S - S248N - K256R, A088T - N109G - G131H - V149L - T158S - K256R - L257G, A088T - N109G - T158S - N218S, A088T - N109G - T158S - N218S - K256R - L257G - Q271K, A088T - N109G - T158S - N218S - L257G, A088T - N109G - T158S - S248N - K256R, A088T - N218S - S248N - L257G - Q271R, A088T - T158S - N218S - K256R - L257G, A088T - T158S - N218S - N243V - K256R, A088T - Y104H - A116T - G131H - N218S - N243V, A116T - G131H - K141E - N218S - N243V - S248N - L257G, A116T - G131H - N218S - N243V - S248N - K256R, A116T - G131H - T158S - N218S - S248N - L257G - N269D, A116T - G131H - T158S - N218S - S248N - Q271

10

20

30

40

50

R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - G 1  
5 7 E - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S -  
N 2 1 8 S , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8  
N , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2  
5 7 G , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G ,  
G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - I 2 6 8 V , I 1 0 7 T - N 1 0 9  
G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , L 0 9 0 I - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2  
4 3 V , L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S -  
K 2 5 6 R - L 2 5 7 G - Q 2 7 1 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - W 2 4 1  
R - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - K 1  
4 1 E - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G -  
T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8  
S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2  
5 6 R - L 2 5 7 G , N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , S 0 0 3 P -  
N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - L 2 5 7 G , S 0 0 3 P - S 2 4 8 N - L 2 5 7  
G , T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , V 0 0 4 A - A 0 8 8 T - G 1  
3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , Y 0 0 6 H - N 2 1 8 S -  
N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , Y 1 0 4 H - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8  
N , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2  
5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H -  
T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - I 2 3 4 T - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1  
H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - G 1  
3 1 H - V 1 4 9 L - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G ,  
A 0 8 8 T - I 1 0 7 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - A 2 2 3 G - S 2 4 8  
N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - K 2 1 3 N - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0  
8 8 T - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H -  
A 2 3 2 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1  
H - D 1 4 0 G - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1  
3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T -  
N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8  
N , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2  
4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - M 1 2 4 I - G 1 3 1 H -  
T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6  
T - V 1 4 8 A - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2  
1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N -  
T 2 5 5 K - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 5 7  
G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - Q 2 4 5 K - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0  
8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H -  
N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - W 2 4 1  
R - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1  
5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - V 1 5 0 A - T 1 5 8 S -  
N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , I 1 0 7 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8  
S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - K 1  
4 1 E - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T -  
T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8  
N - K 2 5 6 R , T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0  
8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - G 1 4 6 C , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S ,  
A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8  
T - A 1 3 8 E - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1  
1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 F - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T -

10

20

30

40

50

T 1 5 8 S - V 2 0 3 I - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - D 1 4 0  
 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1  
 5 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S -  
 N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - E 2 5 1 K - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - I 1 0 8  
 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2  
 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - K 1 4 1 E - N 2 1 8 S ,  
 A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - W 2 4 1 R - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , 及び G 0 6 5 D - A 0  
 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , からなる群から選択される少なくとも1  
 組のアミノ酸置換を含む B P N ' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N -  
 G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q アミノ酸配列 ( 配列番号 6 ) は、p H 8 及び 1 6 での洗剤組  
 成物 4 の B M I 微小標本クリーニングアッセイにおいて、B P N ' - v 3 6 と比較して 0  
 . 5 以上 0 . 9 未満の P I 値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位  
 置は配列番号 2 の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタン  
 パク質分解活性を有する。本発明は、本アッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する  
 、並びに / あるいは、B P N ' - v 3 6 と比較して 0 . 5 以上 0 . 9 未満の P I 値を有す  
 る、プロテアーゼ変異体を含み、変異体は、配列番号 2 又は配列番号 6 の配列に対して少  
 なくとも 6 0 %、7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、  
 9 5 %、9 6 %、9 7 % 又は 9 8 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選  
 択される少なくとも 1 組の酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号 2  
 の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により  
 詳細に記載されるような、少なくともこのような 1 つの変異体を含む組成物 ( クリーニ  
 グ組成物が挙げられるが、これに限定されない )、並びに、少なくとも 1 つのこのよう  
 な変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

10

20

#### 【 0 4 8 3 】

以下の B P N ' - v 3 6 変異体 : A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S -  
 N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G - N 2 6 9  
 S , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - K 2 5 6 R , A 0  
 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G ,  
 A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1  
 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - A 2 7 3 T , A 0 8 8 T - A 1  
 1 6 T - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R -  
 L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8  
 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1  
 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R -  
 L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - L 2 5 7  
 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - L 2 5 7 G , A 0  
 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T -  
 N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6  
 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2  
 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T -  
 T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - I 2 6 8 V , A 0 8 8 T - T 1 5 8  
 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2  
 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S -  
 L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4 3  
 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - K 2  
 5 6 R , N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , S 0 0 3 P - N 1 0 9 G -  
 G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T , A 0 8 8 T - A 1 1 6  
 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1  
 3 1 H - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S -  
 N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3

30

40

50





A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - A 1 3 8 V - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3  
V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - L 2 5 7 G , A 0  
8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H -  
N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8  
S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1  
3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G -  
G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1  
H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1  
5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H -  
T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8  
S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - V 1  
4 9 A - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V -  
L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7  
G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0  
8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R -  
L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9  
G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - S 2 4 8 N - K 2  
5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T -  
N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - Q 2 7 5 R , A 0 8 8  
T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2  
4 3 V - K 2 5 6 R - I 2 6 8 V , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V -  
L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7  
G , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - N 2  
4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N ,  
A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8  
T - V 1 4 3 A - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - V 1 4 7 I - N 2 1 8 S - N 2  
4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 4 S - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V -  
S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3  
V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2  
4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R ,  
A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3  
V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 1  
1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - I 2 3 4 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N -  
K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8  
N - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2  
1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N ,  
A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G - Q 2 7 1 R , A 1 1 6  
T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - S 2  
4 8 N - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G ,  
I 1 0 7 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3  
V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - A 1  
3 7 V - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T -  
G 1 3 1 H - A 1 5 1 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6  
T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1  
3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H -  
N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - L 2 5 7  
G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2  
5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S -  
N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - K 2 5 6  
R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1

10

20

30

40

50

0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G ,  
N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9  
G  
- A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - S 2 4  
8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - G 2 1 1 V - N 2 4 3 V - S  
2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , N 1 0 9 G  
- A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1  
6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N  
2 1 8 S - K 2 3 7 N , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G  
, N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1  
8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L  
2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G  
- G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - K 2 5  
6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L  
2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - N 2 1 8 S  
, N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1  
8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , N  
1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S  
- N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 2 4 3 V - L 2 5  
7 G , S 0 0 3 F - A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K  
2 5 6 R - L 2 5 7 G , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 3 3 S , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S  
- N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , V 0 0 4 A - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5  
8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , Y 0 0 6 H - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T  
1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - A 2 7 2 G , A 0 8 8 T  
- A 0 9 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - K 2 5  
6 R - L 2 5 7 G - L 2 6 7 M , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - L 2 5 7 G , A  
0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - A 2 7 4 T , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T  
- G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1  
8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N  
2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S  
- N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1  
8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N  
2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S  
- N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3  
1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N  
2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G  
, A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - A 1 1  
6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - A 2 7 4 V , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G  
1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T  
- G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3  
1 H - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - K  
2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R  
- L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8  
8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G  
1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H  
- T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3  
1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G  
1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H  
- T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3  
1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A

10

20

30

40

50







T - N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2  
4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T -  
N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9  
G - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - N 1  
0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S -  
N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8  
S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2  
4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V -  
S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8  
S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2  
4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V -  
K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8  
T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1  
0 9 G - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G -  
T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - S 2 4 8  
N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - V 1 4 7 A - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2  
5 6 R , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G - I 2 6 8 V , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S -  
N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 2 1 8  
S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - N 2 6 9 S , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2  
5 6 R , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G - Q 2 7 1 R , A 0 8 8 T -  
N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8  
T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2  
5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S -  
K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6  
R , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1  
5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T -  
T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8  
T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2  
4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G - Q 2 7 1 H , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V -  
S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8  
T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - V 1 4 7 A - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1  
3 1 H - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H -  
N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - L 2 5 7  
G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2  
1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N -  
K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6  
T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2  
4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - A 2 3 1 V - N 2 4 3 V -  
L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 1 1 6  
T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1  
3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T -  
G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 1 6  
T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2  
5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T -  
G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8  
S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2  
4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G ,  
A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - V 1 4 3 F - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , A 1 1 6 T - K 2 5 6  
R , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - N 2  
1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N -

10

20

30

40

50



- N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - I 2 6 8 V , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4  
3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N  
1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T  
- T 1 5 8 S , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5  
6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S  
2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S  
- N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1  
8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N  
2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V  
- L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7  
G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - Q 2 7 5 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T  
1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - L 2 5 7 G  
, N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5  
7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N  
1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G  
- G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - S 1 4 5 F - N 2 1  
8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - K  
2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G  
- G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1  
8 S - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , N  
1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G  
- G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0  
9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N  
1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G  
- G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G - A 2 7  
4 T , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N  
1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H  
- T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3  
1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T  
1 5 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G  
, N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5  
6 R , N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - S 2 6 0 F , N 1 0 9 G - N  
2 1 8 S - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - N 2 4 3 V  
- L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4  
8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - S 1 8 2 F - S 2 0 4 F - S 2 0 7 L - N  
2 1 8 S - S 2 3 6 F - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R  
, N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4  
3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L  
2 5 7 G , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V  
- K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - T 1 5  
8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K  
2 5 6 R , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 2 1 8 S , N 2 1 8 S  
- N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 2 4  
3 V - K 2 5 6 R , N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K  
2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G - Q 2 7 1 R , S 0 0 3 P  
- A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 2 4 8 N , T 1 5 8 S - N 2 1  
8 S , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - A 2 7 2 V , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , T  
1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S  
- N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5  
7 G , T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L

10

20

30

40

50



257G, T158S - N243V - S248N - K256R, V004A - N109G - A116T - G131H - S248N - K256R - L257G, 及び Y006H - A116T - G131H - S248N, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含む BPN' - S024G - S053G - S078N - S101N - G128A - Y217Q アミノ酸配列 (配列番号6) は、pH 8 及び 16 での洗剤組成物4の卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v36 と比較して1.0超、少なくとも1.1、少なくとも1.2、少なくとも1.3、少なくとも1.4、少なくとも1.5、少なくとも1.6、少なくとも1.7、少なくとも1.8、少なくとも1.9、少なくとも2.1.0超~約10、1.0超~約8、又は1.0超~約5のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'、BPN' - v3、及びBPN' - v36 と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'、BPN' - v3 及び BPN' - v36 よりもPI値が大きい。本発明は、本アッセイにおいて、BPN' (配列番号2) と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、BPN'、BPN' - v3 及び BPN' - v36 と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、BPN' - v3 と比較して1.0超~約5のPI値を有する、並びに/又は、BPN' - v36 と比較して1.0超~約5のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号2又は配列番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物 (クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0484】

以下の BPN' - v36 変異体: A015S - A088T - N109G - G131H - T158S - N218S - S248N, A088T, A088T - A116T - G131H - N218S - N243V - S248N, A088T - A116T - G131H - N218S - S248N, A088T - A116T - G131H - N218S - S248N - K256R - L257G, A088T - A116T - G131H - N243V, A088T - A116T - G131H - N243V - K256R, A088T - A116T - G131H - N243V - S248N, A088T - A116T - G131H - S248N - K256R, A088T - A116T - G131H - T158S - N218S - N243V - S248N, A088T - A116T - G131H - T158S - N218S - N243V - S248N - K256R, A088T - A116T - G131H - T158S - N218S - N243V - S248N - L257G, A088T - A116T - G131H - T158S - N218S - S248N - K256R, A088T - A116T - G131H - T158S - N243V - S248N, A088T - A116T - G131H - T158S - N243V - S248N - K256R - L257G, A088T - A116T - G131H - T158S - S248N, A088T - A116T - G131H - T158S - S248N - L257G, A088T - A116T - G131H - V147A - T158S - N218S - N243V - S248N - L257G, A088T - A116T - N218S - I268V, A088T - A116T - N218S - L257G, A088T - A116T - N218S - N243V - N2

10

20

30

40

50





N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G - I 2 6 8 V , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - Q 2 7 1 H , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - N 2 6 9 D , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - A 2 7 4 D , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G - N 2 6 9 D , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G - N 2 6 9 D , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - Q 2 7 1 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 T - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - V 1 5 0 A - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - K 1 4 1 E - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - N 2 1 8 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T

10

20

30

40

50

- S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - K 2 5  
6 R , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N  
2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V  
- L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4  
3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K  
2 5 6 R , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G  
, A 1 1 6 T - V 1 4 9 I - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - Q 2 7  
1 H , G 0 2 4 S - G 0 5 3 S - N 0 7 8 S - G 0 9 7 A - N 1 0 1 S , G 0 2 4 S - G  
0 5 3 S - N 0 7 8 S - G 0 9 7 A - N 1 0 1 S - A 1 2 8 S , G 1 3 1 H - K 2 5 6 R  
, G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4  
3 V - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , G  
1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N  
- L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - N 2 4 3 V , G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , G 1 3  
1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R - L  
2 5 7 G , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S  
- K 2 5 6 R , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 0 H - N 2 4 3 V - S 2 4  
8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K  
2 5 6 R , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G  
, G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , G 1 3 1 H - T 1 5  
8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - T  
1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - I 2 6 8 V , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S  
- S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G - N 2 6 9 S , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4  
3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , G  
1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S  
- S 2 4 8 N , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - W 2 4  
1 L - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , I 1 0 7 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N  
2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , I 1 0 7 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H  
- N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - L 2 5 7 G , N 1 0  
9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G  
1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S  
- N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1  
8 S - W 2 4 1 R - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N  
2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N  
- I 2 6 8 V , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , N 1 0  
9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N  
1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R  
- L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4  
8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K  
2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N  
- L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - K 1 4 1 E - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4  
3 V - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N  
2 1 8 S - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N  
, N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1  
6 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - S  
2 4 8 N , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N  
- K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - W 2 4 1 R - N 2 4  
3 V , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - A  
1 1 6 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - K 2 5 6 R  
, N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1  
8 S - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L

10

20

30

40

50

2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R  
 , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - G 1 3  
 1 H - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - G  
 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H  
 - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3  
 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T  
 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H  
 - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0  
 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T  
 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S  
 - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - K 1 4 1 E - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5  
 7 G , N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S  
 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G  
 , N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4  
 8 N - L 2 5 7 G - Q 2 7 5 R , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - I 2 6 8 V , N 1 0 9 G - T  
 1 5 8 S - N 2 1 8 S , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G  
 - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1  
 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 S - A 1 1 6 T - S 2 4 8 N , N 2 1 8 S - K  
 2 5 6 R , N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G  
 , N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , N 2 1 8 S - S 2 4  
 8 N - K 2 5 6 R , N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , S 0 0 3 P - N  
 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G  
 , S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , T 1 5 8 S - K 2 5  
 6 R - L 2 5 7 G , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , T 1 5 8 S - N  
 2 1 8 S - L 2 3 3 S - S 2 4 8 N , T 1 5 8 S - N 2 4 3 V , T 1 5 8 S - N 2 4 3 V  
 - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - N 2 6 9 D , T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5  
 7 G , V 0 0 4 L - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , 及  
 び Y 0 0 6 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , からなる群から選択される少なく  
 とも 1 組のアミノ酸置換を含む B P N ' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0  
 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q アミノ酸配列 ( 配列番号 6 ) は、p H 8 及び 1 6 での  
 洗剤組成物 4 の卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、B P N ' - v 3 6 と比較して  
 約 1 . 0 の P I 値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番  
 号 2 の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイに  
 お

いて、B P N ' ( 配列番号 2 ) と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、B P N '  
 よりも P I 値が大きい。本発明は、本アッセイにおいて、B P N ' ( 配列番号 2 ) と比較  
 して向上したタンパク質分解活性を有する、B P N ' - v 3 と比較して約 1 . 0 の P I 値  
 を有する、並びに、B P N ' - v 3 6 と比較して 1 . 0 の P I 値を有する、プロテアーゼ  
 変異体を含み、この変異体は、配列番号 2 又は配列番号 6 の配列に対して少なくとも 6 0  
 %、7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6  
 %、9 7 % 又は 9 8 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少な  
 くとも 1 組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号 2 の配列  
 のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に  
 記載されるような、少なくともこのような 1 つの変異体を含む組成物 ( クリーニング組成  
 物が挙げられるが、これに限定されない )、並びに、少なくとも 1 つのこのような変異体  
 を用いるクリーニング方法も含まれる。

#### 【 0 4 8 5 】

以下の B P N ' - v 3 6 変異体 : A 0 8 8 T - A 0 9 8 S - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N -  
 K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - K 2 5 6 R , A 0 8 8  
 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1

1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T -  
 G 1 3 1 H - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - K 2 5 6  
 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , A 0  
 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T -  
 G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1  
 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0  
 8 8 T - A 1 1 6 T - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - K 2 5 6 R -  
 L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - Q 2 7 1 R , A 0 8 8  
 T - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1  
 5 8 S , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S -  
 K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7  
 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0  
 8 8 T - G 1 3 1 H , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H -  
 N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3  
 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1  
 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N -  
 K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - I 2 3 4 T - S 2 4 8  
 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2  
 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V -  
 K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8  
 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1  
 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - V 1 4 9 L -  
 T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9  
 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - K 1 4 1 E - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1  
 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - Q 2 7 5 R , A 0 8 8 T -  
 N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 1 0 9  
 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1  
 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T -  
 N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9  
 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0  
 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N -  
 K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8  
 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - V 1 4 9 A - T 1  
 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S -  
 S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4 3  
 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2  
 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T -  
 N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 2 D - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7  
 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 3 7 E - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2  
 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - D 1 4 0 G - N 2 4 3 V ,  
 A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - A 1 5 2 S - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8  
 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - D 1 4 0 G - T 1 5 8 S - N 2  
 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - K 2 5 6 R -  
 L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - N 1 0 9  
 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1  
 5 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S -  
 N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1  
 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - W 2 4 1 R - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1  
 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G -  
 N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2 4 8

10

20

30

40

50

N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1  
5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S -  
N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - Q 2 7 5 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - S 2 4 8  
N , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0  
8 8 T - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S -  
K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - T 1 5 8  
S - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 0  
8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S -  
N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8  
S - Q 2 4 5 K - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2  
4 8 N - L 2 5 7 G - Q 2 7 5 K , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R ,  
A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8  
S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N , A 0  
8 8 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S -  
S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 9 8  
S - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2  
5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - K 1 4 1 E - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N -  
L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - W 2 4 1 R - N 2 4 3 V - S 2 4 8  
N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V , A 1 1 6 T - G 1  
3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H -  
V 1 3 9 I - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - S 2 4 8  
N - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - L 2 5 7 G - Q 2 7 1 R , A 1 1 6 T - T 1  
5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , G 0 5 3 S - A 0 8 8 T -  
N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - G 1 6 9 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8  
N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , G 1 3 1 H - T 1  
5 8 S , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R , K 2 5 6 R , L 0 9 0 I - N 1 0 9 G -  
T 1 5 8 S - N 2 4 3 V , L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H , N 1 0 9  
G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1  
5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T -  
S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 3 7  
R - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N , N 1  
0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V -  
K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - Q 2 7 1  
R , N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - S 2  
4 8 N - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S -  
N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7  
G , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 2  
1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , S 0 0 3 P - N 1 0 9 G -  
A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , S 0 0 3 P - N 1 0 9  
G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - L 2 5 7 G , S 1 0 5 H - W 1 0 6 G - I 1 0 7 L - I 1  
0 8 S - N 1 0 9 A - G 1 1 0 A - I 1 1 1 S - E 1 1 2 N - W 1 1 3 G - A 1 1 4 P ,  
T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8  
N , T 1 5 8 S - S 2 4 8 N , T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , V 0  
0 4 A - A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S , V 0 0 4 A - A 0 8 8 T -  
G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , Y 0 0 6 H - N 1 0 9  
G - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , Y 1 0 4 H - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - S 2  
4 8 N , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G ,  
A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7  
G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2  
5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - G 1 3 1 D - T 1 5 8 S -

10

20

30

40

50



N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - K 2 3 7 R - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - K 2 1 3 N - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - D 1 4 0 G - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - M 1 2 4 I - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - L 2 3 3 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - T 2 5 5 K - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G - I 2 6 8 V , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - V 2 0 3 I - N 2 1 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - Y 1 0 4 H - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , A 1 1 6 T - D 1 4 0 G - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - G 1 5 7 E - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - W 2 4 1 R - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 2 4 3 V , P 0 1 4 L - A 0 1 5 L - L 0 1 6 C - H 0 1 7 T - S 0 1 8 L - Q 0 1 9 K - G 0 2 0 A - Y 0 2 1 T - T 0 2 2 L - G 0 2 3 E , S 0 0 3 P - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , Y 1 0 4 H - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - A 1 3 8 E - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V

10

20

30

40

50

- S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5  
 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K  
 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V  
 - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5  
 8 S - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G - I 2 6 8 V , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G  
 1 3 1 H - W 2 4 1 L - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G  
 - A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0  
 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N  
 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G  
 - G 1 3 1 H - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - N 2 1 8  
 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - S  
 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G  
 , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 1 0  
 9 G - W 2 4 1 R - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L  
 2 5 7 G , A 0 8 8 T - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , A 0 8 8 T  
 - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - T 1 5  
 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , A 1 1 6 T - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 1 1 6 T - N  
 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 1 1 6 T - T 1 5 8 S , G 1 3 1 H - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R  
 , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0  
 9 G - A 1 1 6 T - I 2 3 4 T - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N  
 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T  
 - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H , N 1 0  
 9 G - G 1 3 1 H - A 1 3 7 V - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , N 1 0 9 G - G  
 1 3 1 H - K 1 4 1 E - L 2 5 7 G , N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V  
 - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 0 8  
 8 T - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N  
 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0 9 G  
 - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N , A 0 8 8 T - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8  
 8 T - Y 1 0 4 H - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H - A 1 3 7 E - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - N  
 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , G 0 6 5 D - A 0 8 8 T - G 1 3 1 H - N 2 4 3 V  
 - S 2 4 8 N , Y 1 0 4 H - N 2 1 8 S - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - G 1 3  
 1 H - V 1 5 0 A - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - A 1 1 6 T - T  
 1 5 8 S - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - I 1 0 8 T - N 1 0 9 G - G 1 3 1 H  
 - T 1 5 8 S - N 2 1 8 S - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R - L 2 5 7 G , A 0 8 8 T - N 1 0  
 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - S 2 4 8 N - L 2 5 7 G - Q 2 7 1 P , A 0 8 8 T - N  
 1 0 9 G - A 1 1 6 T - V 1 4 8 A - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , A 0 8 8 T - Y 1 0 4 H  
 - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - A 1 5 3 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - L 2 5  
 7 G - N 2 6 9 D , 及び V 0 0 4 M - A 1 1 6 T - V 1 4 8 A - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V  
 - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を  
 含む B P N ' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1  
 7 Q アミノ酸配列 ( 配列番号 6 ) は、p H 8 及び 1 6 での洗剤組成物 4 の卵微小標本  
 クリーニングアッセイにおいて、B P N ' - v 3 6 と比較して 0 . 5 以上 0 . 9 未満の P  
 I 値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号 2 の配列と  
 対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する  
 。本発明は、本アッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、並びにノあるいは、B  
 P N ' - v 3 6 と比較して 0 . 5 以上 0 . 9 未満の P I 値を有する、プロテアーゼ変異体  
 を含み、変異体は、配列番号 2 又は配列番号 6 の配列に対して少なくとも 6 0 %、7 0 %  
 、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %  
 又は 9 8 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも 1 組  
 の酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号 2 の配列のアミノ酸位置と

10

20

30

40

50

対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物（クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない）、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0486】

pH 8及び16での洗剤組成物4のBMI微小標本又は卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'-v36及び/又はBPN'-v3と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/又は、BPN'-v36と比較して1.0超～約5のPI値を有する、スプチリシンプロテアーゼ変異体も提供され、この変異体は、配列番号2又は配列番号6に対して少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ここで、この変異体は、X001R/T、X002R、X003F/P、X004A/L/M/P、X005S、X006H、X014L、X015L/S、X016C、X017T、X018L、X019K、X020A、X021T、X022L、X023E、X024S、X034S、X053S、X057Q、X065D、X078S、X086L、X088T、X090I、X097A、X098S、X101S、X104H、X105H/P、X106G、X107L/T、X108S/T、X109A/G/S、X110A、X111S、X112N、X113G、X114P/S、X116T、X124I、X128S、X131D/H、X137E/V、X138E/V、X139I、X140G、X141E/R、X143A/F、X144V、X145F/P/T、X146C、X147A/I、X148A、X149A/I/L、X150A、X151S、X152S、X153S、X154A、X155P、X156T、X157E/L、X158M/S、X159E、X160E、X161L、X169S、X182F、X203I、X204F、X207L、X211V、X212D、X213N、X216S、X218S/T、X223G、X231V、X232S、X233S、X234T、X235P、X236F/P、X237N/R、X240H、X241L/R、X243F/V、X245K、X248N、X251K、X255K、X256R、X257G、X260F、X267M、X268V、X269D/S、X271H/K/P/R、X272G/V、X273T、X274D/L/T/V及びX275K/R/Sの群から選択される少なくとも1つの置換を含み、選択的に、A001R/T、Q002R、S003F/P、V004A/L/M/P、P005S、Y006H、P014L、A015L/S、L016C、H017T、S018L、Q019K、G020A、Y021T、T022L、G023E、G024S、G034S、G053S、P057Q、G065D、N078S、P086L、A088T、L090I、G097A、A098S、N101S、Y104H、S105H/P、W106G、I107L/T、I108S/T、N109A/G/S、G110A、I111S、E112N、W113G、A114P/S、A116T、M124I、A128S、G131D/H、A137E/V、A138E/V、V139I、D140G、K141E/R、V143A/F、A144V、S145F/P/T、G146C、V147A/I、V148A、V149A/I/L、V150A、A151S、A152S、A153S、G154A、N155P、E156T、G157E/L、T158M/S、S159E、G160E、S161L、G169S、S182F、V203I、S204F、S207L、G211V、N212D、K213N、A216S、N218S/T、A223G、A231V、A232S、L233S、I234T、L235P、S236F/P、K237N/R、N240H、W241L/R、N243F/V、Q245K、S248N、E251K、T255K、K256R、L257G、S260F、L267M、I268V、N269D/S、Q271H/K/P/R、A272G/V、A273T、A274D/L/T/VQ275K/R/Sの群から選択される少なくとも1つの置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、BPN'（配列番号2）、BPN'-v3及びBPN'-v36と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、本アッ

10

20

30

40

50

セイにおいて、BPN'、BPN' - v3及びBPN' - v36よりもPI値が大きい。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物（クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない）、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

#### 【0487】

（実施例10）

BPN' - v36の更なる変異体の構築及び変異体のクリーニング性能

BPN' - v36（実施例7に記載のもの）の部位評価ライブラリのDNAに、エラープロンプンPCRにより更に変異を誘発させた。Taq DNAポリメラーゼ（Promega）を用い、これらのライブラリをプライマーP4973及びP4950（実施例7に記載のもの）により増幅させた。各PCR増幅反応物には、30 pmolの各プライマー、100 ngのテンプレートDNA（SELSのBPN' - v36）及び様々な量のMnCl<sub>2</sub>を含有させた。PCR反応（20 µL）は、まず始めに95 °Cで2.5分加熱した後、続いて94 °Cで15秒の変性、55 °Cで15秒のアニーリング、及び72 °Cで2分の伸長を30サイクル行った。DNA断片をQIAGEN（登録商標）ゲルバンド精製用キットによりゲル精製し、制限酵素BamHI及びHindIIIで消化し、同じ制限酵素で消化したpHPLT - BPN' partial optベクターとライゲーションさせた。Illustra TempliPhiキットでローリング・サークル型増幅法を用い、ライゲーション混合物を製造元（GE Healthcare）の推奨に従って増幅させることで、枯草菌（*Bacillus subtilis*）に形質転換させるための多量体DNAを生成した。この目的のため、1 µLのライゲーション混合物と5 µLのサンプル緩衝液を混合し、95 °Cで3分間加熱し、氷中で冷却した。次に、5 µLの反応緩衝液及び0.2 µLの酵素を各チューブに加え、続いて30 °Cで10時間にわたってインキュベートした。ローリング・サークル型増幅産物を100倍希釈し、枯草菌（*B. subtilis*）細胞の形質転換に用いた（*aprE*, *nprE*, *amyE* : *xyLRPxyLAcomK-phleo*）。形質転換混合物のアリコートをし、1.6%のスキムミルク及び10 µg/mLのネオマイシンを含有しているLBプレートに蒔き、37 °Cで一晩インキュベートした。

#### 【0488】

約500,000個のクローンをスキムミルクプレートでプレスクリーニングした。ハロー（すなわち、機能的なプロテアーゼが存在していることの指標）を形成したものは非常に少なかった。ハローを生じたコロニーをつつき、10 µg/mLのネオマイシンを含有している150 µLのLB培地に植菌し、配列決定した（Quintara）。プールに複数回生じた、性能効果を提供し得る変異の組み合わせを見つけることで、これらのコロニーの配列を解析した。これらの変異の組み合わせの性能を評価するために、以下に記載するように融合PCRにより、BPN' - v36バックグラウンドに二重変異を導入した。この目的のため、2又は3つの部分的に重複している断片を変異原性プライマーにより増幅させた。各変異を生成するために使用したプライマーの組み合わせを表10 - 1に示し、プライマー配列を表10 - 2に示す。

【表 9】

表10-1. 断片の増幅に使用したプライマー対					
変異体	変異1	変異2	断片1	断片2	断片3
1	A45S	S236Y	P4974, P6645	P6644, P6647	P6646, P4976
2	A45S	S236G	P4974, P6645	P6644, P6649	P6648, P4976
3	I115T	S183T	P4974, P6651	P6650, P6655	P6654, P4976
4	I115V	N184Y	P4974, P6653	P6652, P6657	P6656, P4976
5	I31T	S37P	P4974, P6659	P6658, P4976	
6	I31T	I35L	P4974, P6661	P6660, P4976	
7	I31V	S38W	P4974, P6663	P6662, P4976	
8	N25K	P129R	P4974, P6665	P6664, P6667	P6666, P4976
9	N25K	P129K	P4974, P6665	P6664, P6669	P6668, P4976
10	P14T	S37T	P4974, P6671	P6670, P6673	P6672, P4976
11	P5L	Q217K	P4974, P6679	P6678, P6681	P6680, P4976
12	P5L	Q217G	P4974, P6679	P6678, P6683	P6682, P4976
13	Q10L	S37P	P4974, P6685	P6684, P6675	P6674, P4976
14	Q10R	S37T	P4974, P6687	P6686, P6673	P6672, P4976
15	S37P	T254S	P4974, P6675	P6674, P6689	P6688, P4976
16	N25K	S37P	P4974, P6665	P6664, P6675	P6674, P4976
17	G24A	S37W	P4974, P6691	P6690, P6677	P6676, P4976
18	N25K	P129R	P4974, P6665	P6664, P6667	P6666, P4976
20	S161P	S162L	P4974, P6695	P6694, P4976	
21	S161P	T253A	P4974, P6693	P6692, P6701	P6700, P4976
22	S161P	S260P	P4974, P6693	P6692, P6703	P6702, P4976
23	S162L	D181H	P4974, P6697	P6696, P6711	P6710, P4976
24	S162L	D181G	P4974, P6697	P6696, P6713	P6712, P4976
25	S18F	S162L	P4974, P6715	P6714, P6697	P6696, P4976
26	S18T	S162P	P4974, P6717	P6716, P6699	P6698, P4976
27	S18P	D120N	P4974, P6719	P6718, P6727	P6726, P4976
28	S18Y	K213R	P4974, P6721	P6720, P6729	P6728, P4976
29	S18L	Y21S	P4974, P6731	P6730, P4976	
30	S18T	Y21N	P4974, P6733	P6732, P4976	
31	S9T	K141F	P4974, P6635	P6734, P6737	P6736, P4976
32	S9T	K141R	P4974, P6635	P6734, P6739	P6738, P4976
33	Q19L	S260N	P4974, P6725	P6724, P6705	P6704, P4976
34	Q19L	S260P	P4974, P6725	P6724, P6703	P6702, P4976
35	N61S	S260P	P4974, P6741	P6740, P6703	P6702, P4976
36	N61D	S260I	P4974, P6743	P6742, P6707	P6706, P4976
37	T253A	S260P	P4974, P6701	P6700, P6703	P6702, P4976
38	A134T	S260G	P4974, P6745	P6744, P6709	P6708, P4976
39	A133V	S260N	P4974, P6648	P6746, P6705	P6704, P4976

10

20

30

40

【表 10 - 1】

表10-2. BPN' -v36の二重変異を生成するために使用したプライマー配列		
プライマー名	プライマー配列	配列番号
P6644	CAGATCTTAAAGTCTCTGGAGGGGCTTCTATGGTGC	配列番号64
P6645	CATAGAAGCCCCTCCAGAGACTTTAAGATCTGGATGGCTC	配列番号65
P6646	GCATTGATTCTTTACAAGCACCCGAAGTGGACAAAC	配列番号66
P6647	CAGTTCGGGTGCTTGTAAGAATCAATGCGGCCGCCCA	配列番号67
P6648	GCATTGATTCTTGGTAAGCACCCGAAGTGGACAAAC	配列番号68
P6649	CCAGTTCGGGTGCTTACCAAGAATCAATGCGGCCGCCCA	配列番号69
P6650	CATCGAATGGGCCACAGCGAATAACATGGATGTAATCAAC	配列番号70
P6651	CATCCATGTTATTCGCTGTGGCCATTTCGATGCCGTTGAT	配列番号71
P6652	CATCGAATGGGCCGTAGCGAATAACATGGATGTAATCAAC	配列番号72
P6653	CATCCATGTTATTCGCTACGGCCATTTCGATGCCGTTGAT	配列番号73
P6654	CTGTAGACTCTACAAATCAACGTGCCTCTTTTCCT	配列番号74
P6655	AAAGAGGCACGTTGATTTGTAGAGTCTACAGCGCCACTG	配列番号75
P6656	CTGTAGACTCTTCATACCAACGTGCCTCTTTTCCTCC	配列番号76
P6657	GAAAAAGAGGCACGTTGGTATGAAGAGTCTACAGCGCCCA	配列番号77
P6658	TAGCGGTTACAGACAGCGGTATCGACCCAAGCCATCCAGATCTTAAAGTCG	配列番号78
P6659	ATGGCTTGGTTCGATACCGCTGTCTGTAACCGCTACTTTAACATTGCCTC	配列番号79
P6660	TAAAGTAGCGGTTACAGACAGCGGTTAGACTCGAGCCATCCAGATCTT	配列番号80
P6661	ATGGCTCGAGTCTAAACCGCTGTCTGTAACCGCTACTTTAACATTGCCTC	配列番号81
P6662	GGTTGTAGACAGCGGTATCGACTCGTGGCATCCAGATCTTAAAGTCGCTG	配列番号82
P6663	ATGCCACGAGTCGATACCGCTGTCTACAACCGCTACTTTAACATTGCCTC	配列番号83
P6664	CTACACTGGAGGCAAAGTTAAAGTAGCGGTTATCGACA	配列番号84

10

20

30

## 【表 10 - 2】

(上記表の続き)

表10-2. BPN' -v36の二重変異を生成するために使用したプライマー配列		
P6665	ATAACCGCTACTTTAACTTTGCCTCCAGTGTAGCCTTGAG	配列番号85
P6666	GAGCCTGGGAGCACGTAGCGGCAGTGCGGCACCTAAA	配列番号86
P6667	GTGCCGCACTGCCGCTACGTGCTCCCAGGCTCATGTTGAT	配列番号87
P6668	TGAGCCTGGGAGCAAAGAGCGGCAGTGCGGCACCTAAA	配列番号88
P6669	GTGCCGCACTGCCGCTCTTTGCTCCCAGGCTCATGTTGAT	配列番号89
P6670	ATCACAAATTAAGCCACAGCTCTGCACTCTCAAGGCTAC	配列番号90
P6671	AGAGTGCAAGAGCTGTGGCTTTAATTTGTGATACGCCGTAA	配列番号91
P6672	GACAGCGGTATCGACACAAGCCATCCAGATCTTAAAGTCG	配列番号92
P6673	TAAGATCTGGATGGCTTGTGTCGATACCGCTGTCGATAAC	配列番号93
P6674	GACAGCGGTATCGACCCAAGCCATCCAGATCTTAAAGTCG	配列番号94
P6675	TAAGATCTGGATGGCTTGGGTCGATACCGCTGTCGATAAC	配列番号95
P6676	GACAGCGGTATCGACTGGAGCCATCCAGATCTTAAAGTCG	配列番号96
P6677	TAAGATCTGGATGGCTCCAGTCGATACCGCTGTCGATAAC	配列番号97
P6678	ACGCGCAGTCCGTGTTATACGGCGTATCACAAATTAAGC	配列番号98
P6679	ATTTGTGATACGCCGTATAACACGGACTGCGCGTACGCAT	配列番号99
P6680	ACAAGTATGGTGCGAAAAACGGGACTTCCATGGCCTC	配列番号100
P6681	CATGGAAGTCCCGTTTTTCGCACCATACTGTTCCCTG	配列番号101
P6682	ACAAGTATGGTGCGGGAAACGGGACTTCCATGGCCTC	配列番号102
P6683	CCATGGAAGTCCCGTTTCCCGCACCATACTGTTCCCTG	配列番号103
P6684	CTTACGGCGTATCATTAAATTAAGCCCCTGCTCTGCAC	配列番号104
P6685	GAGCAGGGGCTTTAATTAATGATACGCCGTAAGGCACGGA	配列番号105

10

20

30

## 【 0 4 8 9 】

(上記表の続き)

## 【表 10 - 3】

(上記表の続き)

表10-2. BPN' -v36の二重変異を生成するために使用したプライマー配列		
P6686	CTTACGGCGTATCACGTATTAAGCCCTGCTCTGCAC	配列番号106
P6687	GAGCAGGGGCTTTAATACGTGATACGCCGTAAGGCACGGA	配列番号107
P6688	TTTAGAAAACACCTCTACAAAACCTGGTGATTCTTTCTAC	配列番号108
P6689	TCACCAAGTTTTGTAGAGGTGTTTTCTAAACTGCTGCGGA	配列番号109
P6690	AGGCTACACTGGAGCAAATGTTAAAGTAGCGGTTATCGAC	配列番号110
P6691	GCTACTTTAACATTTGCTCCAGTGTAGCCTTGAGAGTG	配列番号111
P6692	GAGGGAACATCCGGACCATCGAGTACCGTCGGTTATCCA	配列番号112
P6693	ACCGACGGTACTCGATGGTCCGGATGTTCCCTCATTCCCA	配列番号113
P6694	AGGGAACATCCGGACCATTAAGTACCGTCGGTTATCCAGG	配列番号114
P6695	ACCGACGGTACTTAATGGTCCGGATGTTCCCTCATTCCCA	配列番号115
P6696	GAACATCCGGATCATTAAAGTACCGTCGGTTATCCAGGCA	配列番号116
P6697	ATAACCGACGGTACTTAATGATCCGGATGTTCCCTCATTC	配列番号117
P6698	GAACATCCGGATCACCAAGTACCGTCGGTTATCCAGGCA	配列番号118
P6699	ATAACCGACGGTACTTGGTGATCCGGATGTTCCCTCATTC	配列番号119
P6700	GTTTAGAAAACGCAACTACAAAACCTGGTGATTCTTTC	配列番号120
P6701	CACCAAGTTTTGTAGTTGCGTTTTCTAAACTGCTGCGGAC	配列番号121
P6702	CAAAACTTGGTGATCCATTCTACTATGAAAAGGGCTGAT	配列番号122
P6703	TTTCCATAGTAGAATGGATCACCAAGTTTTGTAGTGGTGT	配列番号123
P6704	CAAAACTTGGTGATAACTTCTACTATGAAAAGGGCTGAT	配列番号124
P6705	TTTCCATAGTAGAAGTTATCACCAAGTTTTGTAGTGGTGT	配列番号125
P6706	CAAAACTTGGTGATATCTTCTACTATGAAAAGGGCTGAT	配列番号126

10

20

30

## 【 0 4 9 0 】

(上記表の続き)



## 【表 10 - 4】

(上記表の続き)

表10-2. BPN' -v36の二重変異を生成するために使用したプライマー配列		
P6707	TTTCCATAGTAGAAGATATCACCAAGTTTTGTAGTGGTGT	配列番号127
P6708	CAAAACTTGGTGATGGATTCTACTATGGAAAAGGGCTGAT	配列番号128
P6709	TTTCCATAGTAGAATCCATCACCAAGTTTTGTAGTGGTGT	配列番号129
P6710	GTGGGCGCTGTACACTCTTCAAATCAACGTGCCTCTT	配列番号130
P6711	CACGTTGATTTGAAGAGTGTACAGCGCCCACTGCAATCAC	配列番号131
P6712	GTGGGCGCTGTAGGATCTTCAAATCAACGTGCCTCTT	配列番号132
P6713	CACGTTGATTTGAAGATCCTACAGCGCCCACTGCAATCAC	配列番号133
P6714	CCTGCTCTGCACTTCCAAGGCTACACTGGAGGCAATG	配列番号134
P6715	CTCCAGTGTAGCCTTGAAGTGCAGAGCAGGGGCTTTAAT	配列番号135
P6716	CCTGCTCTGCACACACAAGGCTACACTGGAGGCAATG	配列番号136
P6717	CTCCAGTGTAGCCTTGTGTGTGCAGAGCAGGGGCTTTAAT	配列番号137
P6718	CCTGCTCTGCACCCACAAGGCTACACTGGAGGCAATG	配列番号138
P6719	CTCCAGTGTAGCCTTGTGGGTGCAGAGCAGGGGCTTTAAT	配列番号139
P6720	CCTGCTCTGCACTACCAAGGCTACACTGGAGGCAATG	配列番号140
P6721	CTCCAGTGTAGCCTTGGTAGTGCAGAGCAGGGGCTTTAAT	配列番号141
P6722	CCTGCTCTGCACTTACAAGGCTACACTGGAGGCAATG	配列番号142
P6723	CTCCAGTGTAGCCTTGTAAAGTGCAGAGCAGGGGCTTTAAT	配列番号143
P6724	TGCTCTGCACTCTTTAGGCTACACTGGAGGCAATGTTA	配列番号144
P6725	TTGCCTCCAGTGTAGCCTAAAGAGTGCAGAGCAGGGGCTT	配列番号145
P6726	ATCGCGAATAACATGAACGTAATCAACATGAGCCTGGGA	配列番号146
P6727	CTCATGTTGATTACGTTTCATGTTATTCGCGATGGCCAT	配列番号147

10

20

30

## 【 0 4 9 1 】

(上記表の続き)

## 【表 10 - 5】

(上記表の続き)

表10-2. BPN' -v36の二重変異を生成するために使用したプライマー配列		
P6728	CTTCCAGGGAACCGTTATGGTGCACAAAACGGGACTT	配列番号148
P6729	GTTTTGCGCACCATAACGGTTCCCTGGAAGCGTCGATTG	配列番号149
P6730	CTGCACTTACAAGGCTCTACTGGAGGCAATGTTAAAGTAG	配列番号150
P6731	TAACATTGCCTCCAGTAGAGCCTTGTAAGTGCAGAGCAGGGGCTTTAAT	配列番号151
P6732	GCTCTGCACTTACAAGGCAACACTGGAGGCAATGTTAAAGTAG	配列番号152
P6733	AACATTGCCTCCAGTGTTCCTTGTAAGTGCAGAGCAGGGGCTTTAAT	配列番号153
P6734	CTTACGGCGTAACACAAAATTAAGCCCCTGCTCTG	配列番号154
P6735	AGGGGCTTTAATTTGTGTACGCCGTAAGGCACGGACT	配列番号155
P6736	TTAAAGCAGCAGTTGATTCGCTGTTGCATCTGGTGTCTG	配列番号156
P6737	AGATGCAACAGCGAAATCAACTGCTGCTTTAAGTGCCGCA	配列番号157
P6738	TTAAAGCAGCAGTTGATCGTGCTGTTGCATCTGGTGTCTG	配列番号158
P6739	AGATGCAACAGCAGATCAACTGCTGCTTTAAGTGCCGCA	配列番号159
P6740	AAACCCGTTTCAAGATTCTAATTCTCATGGCACACACGTC	配列番号160
P6741	TGTGCCATGAGAATTAGAATCTTGAACGGGTTTGTTCG	配列番号161
P6742	AAACCCGTTTCAAGATGATAATTCTCATGGCACACACGTC	配列番号162
P6743	TGTGCCATGAGAATTATCATCTTGAACGGGTTTGTTCG	配列番号163
P6744	AAGCGCAGTGCACACTTAAAGCAGCAGTTGATAAAGC	配列番号164
P6745	TCAACTGCTGCTTTAAGTGTGCGCACTGCCGCTTGGTGCTC	配列番号165
P6746	CAAGCGCAGTGTTCGCACTTAAAGCAGCAGTTGATAA	配列番号166
P6747	ACTGCTGCTTTAAGTGAACACTGCCGCTTGGTGCTCCCA	配列番号167

## 【 0 4 9 2 】

(上記表の続き)

各PCR増幅反応には、30 pmolの各プライマー及び100 ngのBPN' - v 36親テンプレートDNA (pHPLT - BPN' - v 36プラスミド、図4を参照されたい)を含有させた。増幅はVent DNAポリメラーゼ (NEB)を用いて実施した。PCR反応 (20 µL)は、まず始めに95 °Cで2.5分加熱した後、続いて94 °Cで15秒の変性、55 °Cで15秒のアニーリング、及び72 °Cで40秒の伸長を30サイクル行った。増幅させた後、5'及び3'遺伝子断片を、QIAGEN (登録商標)ゲルバンド精製用キットによりゲル精製し、混合して (各断片につき50 ng)、プライマーP4973及びP4950を用いて再度PCRで混合及び増幅させて、完全長の遺伝子断片を生成した。伸長工程を72 °Cで2分にわたって実施したことを除き、PCR条件は上記の条件と同様のものであった。完全長のDNA断片をQIAGEN (登録商標)ゲルバンド精製用キットによりゲル精製し、制限酵素BamHI及びHindIIIで消化し、同様の制限酵素で消化したpHPLT - BPN' partial optベクターとライゲーションさせた。Illustra TempliPhiキットでローリング・サークル型増幅法を用い、ライゲーション混合物を製造元 (GE Healthcare)の推奨に

10

20

30

40

50

従って増幅させることで、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) に形質転換させるための多量体 DNA を生成した。この目的のため、1  $\mu$ L のライゲーション混合物と 5  $\mu$ L のサンプル緩衝液を混合し、95 で 3 分間加熱し、氷中で冷却した。次に、5  $\mu$ L の反応緩衝液及び 0.2  $\mu$ L の酵素を各チューブに加え、続いて 30 で 10 時間にわたってインキュベートした。ローリング・サークル型増幅産物を 100 倍希釈し、枯草菌 (*B. subtilis*) 細胞の形質転換に用いた ( *aprE*, *nprE*, *amyE* : : *xy1R P xy1A comK - phleo* )。形質転換混合物のアリコート、1.6% のスキムミルク及び 10  $\mu$ g/mL のネオマイシンを含有している LB プレートに蒔き、37 で一晩インキュベートした。続いて、ハローを生じたコロニーを、10  $\mu$ g/mL のネオマイシンを含有している 150  $\mu$ L の LB 培地に接種した。翌日、培養物は 15% のグリセロールと共に凍結させるか、あるいは実施例 2 に記載されるような生化学的解析のために MDB 培地で増殖させた。

10

## 【0493】

これらの変異体を、16 及び pH 8 での洗剤組成物 4 の BMI 微小標本アッセイ、16 及び pH 7 での洗剤組成物 4 の BMI 微小標本アッセイ、並びに、16 及び pH 8 での洗剤組成物 4 の卵微小標本アッセイを用いて、クリーニング性能について試験した。タンパク質含量は TCA アッセイを用いて測定した。実施例 1 に記載のように全アッセイを実施し、BPN' - v36 (すなわち、BPN' - S24G - S53G - S78N - S101N - G128A - Y217Q) (PI 値 1.0 を有する) と比較して性能指数を算出した。

20

## 【0494】

以下の BPN' - v36 変異体: A133V - S260N, N061S - S260P, P014T - S037T, S009T - K141F, S009T - K141R, S018F - S162L, S018L - Y021S, S018P - D120N, S018T - S162P, S018T - Y021N, S018Y - K213R, S161P - S162L, S161P - S260P, 及び T253A - S260P, からなる群から選択される少なくとも 1 組のアミノ酸置換を含む BPN' - S024G - S053G - S078N - S101N - G128A - Y217Q アミノ酸配列 (配列番号 6) は、pH 8 及び 16 での洗剤組成物 4 の BMI 微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v36 と比較して約 1.0 の PI 値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号 2 の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN' (配列番号 2) と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN' よりも PI 値が大きい。本発明は、本アッセイにおいて、BPN' (配列番号 2) と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、BPN' - v3 と比較して約 1.0 の PI 値を有する、並びに、BPN' - v36 と比較して約 1.0 の PI 値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は、配列番号 2 又は配列番号 6 の配列に対して少なくとも 60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97% 又は 98% の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも 1 組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号 2 の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような 1 つの変異体を含む組成物 (クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも 1 つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

30

40

## 【0495】

以下の BPN' - v36 変異体: A134T - S260G, I115V - N184Y, N025K - S037P, Q010L - S037P, Q019L - S260N, Q019L - S260P, S037P - T254S, 及び S161P - T253A, からなる群から選択される少なくとも 1 組のアミノ酸置換を含む BPN' - S024G - S053G - S078N - S101N - G128A - Y217Q アミノ酸配列 (配列番号 6) は、pH 8 及び 16 での洗剤組成物 4 の BMI 微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v36 と比較して約 1.0 の PI 値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号 2 の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN' (配列番号 2) と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN' よりも PI 値が大きい。本発明は、本アッセイにおいて、BPN' (配列番号 2) と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、BPN' - v3 と比較して約 1.0 の PI 値を有する、並びに、BPN' - v36 と比較して約 1.0 の PI 値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は、配列番号 2 又は配列番号 6 の配列に対して少なくとも 60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97% 又は 98% の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも 1 組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号 2 の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような 1 つの変異体を含む組成物 (クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも 1 つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

50

N' - v 3 6と比較して約0.9のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、本アッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN' - v 3 6と比較して約0.9のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、変異体は、配列番号2又は配列番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組の酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

10

## 【0496】

以下のBPN' - v 3 6変異体：A045S - S236G, G024A - S037W, I031V - S038W, N061D - S260I, Q010R - S037T, I115T - S183T, N025K - P129K, N025K - P129R, A045S - S236Y, 及びS162L - D181H, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN' - S024G - S053G - S078N - S101N - G128A - Y217Qアミノ酸配列(配列番号6)は、pH 8及び16での洗剤組成物4のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v 3 6と比較して0.5以上0.9未満のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、本アッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN' - v 3 6と比較して0.5以上0.9未満のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、変異体は、配列番号2又は配列番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組の酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

20

30

## 【0497】

以下のBPN' - v 3 6変異体：S018F - S162L, S018P - D120N, P014T - S037T, S009T - K141R, 及びS161P - S162L, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN' - S024G - S053G - S078N - S101N - G128A - Y217Qアミノ酸配列(配列番号6)は、pH 7及び16での洗剤組成物4のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v 3 6と比較して1.0超、少なくとも1.1、少なくとも1.2、少なくとも1.3、少なくとも1.4、少なくとも1.5、少なくとも1.6、少なくとも1.7、少なくとも1.8、少なくとも1.9、少なくとも2、1.0超~約10、1.0超~約8、又は1.0超~約5のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'、BPN' - v 3、及びBPN' - v 3 6と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'、BPN' - v 3及びBPN' - v 3 6よりもPI値が大きい。本発明は、本アッセイにおいて、BPN' (配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、BPN'、BPN' - v 3及びBPN' - v 3 6と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、BPN' - v 3と比較して1.0超~約5のPI値を有する、並びに/あるいは、BPN' - v 3 6と比較して1.0超~約5のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号2又は配列

40

50

番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0498】

以下のBPN'-v36変異体：N061S-S260P, Q010L-S037P, S009T-K141F, S018L-Y021S, S018T-S162P, S018T-Y021N, S018Y-K213R, S037P-T254S, S161P-S260P, S161P-T253A, 及びT253A-S260P, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Qアミノ酸配列(配列番号6)は、pH 7及び16での洗剤組成物4のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'-v36と比較して約1.0のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'よりもPI値が大きい。本発明は、本アッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、BPN'-v3と比較して約1.0のPI値を有する、並びに、BPN'-v36と比較して約1.0のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は、配列番号2又は配列番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0499】

以下のBPN'変異体：A133V-S260N, A134T-S260G, I115T-S183T, I115V-N184Y, N061D-S260I, Q019L-S260N, 及びQ019L-S260P, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'アミノ酸配列(配列番号2)は、pH 7及び16での洗剤組成物4のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'-v3と比較して約0.9のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、本アッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、BPN'-v3と比較して約0.9のPI値を有する、並びに、あるいは、BPN'と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は、配列番号2又は配列番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列、並びに上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0500】

以下のBPN'-v36変異体：A045S-S236G, G024A-S037W,

10

20

30

40

50

Q 0 1 0 R - S 0 3 7 T , A 0 4 5 S - S 2 3 6 Y , I 0 3 1 V - S 0 3 8 W , N 0 2 5 K - S 0 3 7 P , S 1 6 2 L - D 1 8 1 H , 及び N 0 2 5 K - P 1 2 9 R , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含む B P N ' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q アミノ酸配列 ( 配列番号 6 ) は、pH 7 及び 1 6 での洗剤組成物 4 の B M I 微小標本クリーニングアッセイにおいて、B P N ' - v 3 6 と比較して 0 . 5 以上 0 . 9 未満の P I 値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号 2 の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、本アッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、並びに / あるいは、B P N ' - v 3 6 と比較して 0 . 5 以上 0 . 9 未満の P I 値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、変異体は、配列番号 2 又は配列番号 6 の配列に対して少なくとも 6 0 % 、 7 0 % 、 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 又は 9 8 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組の酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号 2 の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物 ( クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない ) 、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

#### 【 0 5 0 1 】

以下の B P N ' - v 3 6 変異体 : I 0 3 1 V - S 0 3 8 W , P 0 1 4 T - S 0 3 7 T , S 0 1 8 F - S 1 6 2 L , S 0 1 8 P - D 1 2 0 N , 及び S 1 6 2 L - D 1 8 1 H , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含む B P N ' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q アミノ酸配列 ( 配列番号 6 ) は、pH 8 及び 1 6 での洗剤組成物 4 の卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、B P N ' - v 3 と比較して 1 . 0 超、少なくとも 1 . 1 、少なくとも 1 . 2 、少なくとも 1 . 3 、少なくとも 1 . 4 、少なくとも 1 . 5 、少なくとも 1 . 6 、少なくとも 1 . 7 、少なくとも 1 . 8 、少なくとも 1 . 9 、少なくとも 2 . 1 0 超 ~ 約 1 0 、 1 . 0 超 ~ 約 8 、又は 1 . 0 超 ~ 約 5 の P I 値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号 2 の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、B P N ' 、 B P N ' - v 3 、及び B P N ' - v 3 6 と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、B P N ' 、 B P N ' - v 3 及び B P N ' - v 3 6 よりも P I 値が大きい。本発明は、本アッセイにおいて、B P N ' ( 配列番号 2 ) と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、B P N ' 、 B P N ' - v 3 及び B P N ' - v 3 6 と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、B P N ' - v 3 と比較して 1 . 0 超 ~ 約 5 の P I 値を有する、並びに / あるいは、B P N ' - v 3 6 と比較して 1 . 0 超 ~ 約 5 の P I 値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号 2 又は配列番号 6 の配列に対して少なくとも 6 0 % 、 7 0 % 、 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 又は 9 8 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号 2 の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物 ( クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない ) 、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

#### 【 0 5 0 2 】

以下の B P N ' - v 3 6 変異体 : A 1 3 3 V - S 2 6 0 N , A 1 3 4 T - S 2 6 0 G , G 0 2 4 A - S 0 3 7 W , I 1 1 5 V - N 1 8 4 Y , N 0 2 5 K - P 1 2 9 K , N 0 2 5 K - P 1 2 9 R , N 0 6 1 D - S 2 6 0 I , Q 0 1 9 L - S 2 6 0 P , S 0 0 9 T - K 1 4 1 F , S 0 0 9 T - K 1 4 1 R , S 0 1 8 L - Y 0 2 1 S , S 0 1 8 T - S 1 6 2 P , S 0 1 8 T - Y 0 2 1 N , S 0 1 8 Y - K 2 1 3 R , S 1 6 1 P - S 1 6 2 L , S 1 6 1 P - T 2 5 3 A , 及び T 2 5 3 A - S 2 6 0 P , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含む B P N ' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N -

10

20

30

40

50

G128A-Y217Qアミノ酸配列(配列番号6)は、pH 8及び16での洗剤組成物4の卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'-v36と比較して約1.0のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'よりもPI値が大きい。本発明は、本アッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、BPN'-v3と比較して約1.0のPI値を有する、並びに/あるいは、BPN'-v36と比較して約1.0のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は、配列番号2又は配列番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

10

## 【0503】

以下のBPN'-v36変異体：A045S-S236G, A045S-S236Y, I115T-S183T, N025K-S037P, N061S-S260P, Q010L-S037P, Q010R-S037T, Q019L-S260N, S037P-T254S, 及びS161P-S260P, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Qアミノ酸配列(配列番号6)は、pH 8及び16での洗剤組成物4の卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'-v36と比較して0.8以上0.9以下のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、本アッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN'-v36と比較して0.8以上0.9以下のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、変異体は、配列番号2又は配列番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組の酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

20

30

## 【0504】

pH 8及び16での洗剤組成物4のBMI若しくは卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'-v36と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN'-v36と比較して1.0超~約5のPI値を有する、スブチリシンプロテアーゼ変異体も提供され、この変異体は、配列番号2又は配列番号6に対して少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ここで、この変異体は、X009T, X010L/R, X014T, X018F/L/P/T/Y, X019L, X021N/S, X024A, X025K, X031V, X037P/T/W, X038W, X045S, X061D/S, X115T/V, X120N, X129K/R, X133V, X134T, X141F/R, X161P, X162L/P, X181H, X183T, X184Y, X213R, X236G/Y, X253A, X254S, 及びX260G/I/N/Pの群から選択される少なくとも1つの置換を含む少なくとも1つの置換を含み、選択的に、S009T, Q010L/R, P014T, S018F/L/P/T/Y

40

50

、Q019L、Y021N/S、G024A、N025K、I031V、S037P/T/W、S038W、A045S、N061D/S、I115T/V、D120N、P129K/R、A133V、A134T、K141F/R、S161P、S162L/P、D181H、S183T、N184Y、K213R、S236G/Y、T253A、T254S、及びS260G/I/N/Pの群から選択される少なくとも1つの置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、BPN' (配列番号2)、BPN' - v3及びBPN' - v36と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、本アッセイにおいて、BPN'、BPN' - v3及びBPN' - v36よりもPI値が大きい。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくともこのような1つの変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのような変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

10

## 【0505】

(実施例11)

## 1. コンビナトリアルライブラリFS1~FS3の生成

BPN' 発現カセットを含有しているpHPLT-BPN' - v3プラスミドをクローニング用テンプレートDNA(親プラスミド)として使用した。3つの別個のコンビナトリアルライブラリ(FS1、FS2、及びFS3)はDNA2.0により合成され、個々のライゲーション反応物として供給された。ライブラリ及び導入可能な置換を表11-1に示す。野生型残基又は表11-1に記載の各部位での置換のいずれかが導入できるようにライブラリを設計した。

20

## 【0506】

枯草菌(*B. subtilis*)を効率的に形質転換させるために、Illustra Templiphiキット(GE Healthcare)を用いるローリング・サークル型増幅(RCA)により、ライゲーション反応物からDNAを増幅させた。反応は製造元のプロトコルに従い実施した。1マイクロリットルの、10倍希釈した増幅DNAを使用して、コンピテント枯草菌(*B. subtilis*)細胞(*aprE*, *nprE*, *amyE*::*xy1Rpxy1AcomK-phleo*)50 $\mu$ Lを形質転換させた。形質転換混合物を37 $^{\circ}$ Cにて1時間にわたって振盪した。形質転換混合物の10マイクロリットルアリコート(10 $\mu$ g/mLのネオマイシン(Teknova)を添加したスキムミルク(1.6%)Luria寒天プレートに蒔いた。

30

## 【0507】

形質転換体をつつき、10 $\mu$ g/mLのネオマイシンを添加した125~150 $\mu$ Lのルリアブロス培地を含有しているマイクロタイタープレートに植菌した。マイクロタイタープレートにEnzyScreen lid(EnzyScreen)を用い、プレートを37 $^{\circ}$ C、70~80%湿度にて、250~300rpmで振盪させながら一晚増殖させた。10 $\mu$ g/mLのネオマイシンを添加した190 $\mu$ LのMBD培地(MOPS系合成培地)を含有している新しいマイクロタイタープレートに、一晚培養プレートから7~10マイクロリットルを使用して接種した。NH<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>、FeSO<sub>4</sub>、及びCaCl<sub>2</sub>を基本培地から除外したこと、3mMのK<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>を用いたこと、並びに、60mMの尿素、及び、210g/Lのグルコースと350g/Lマルトデキストリンとから作製した100mLの溶液を含有させたこと、を除き、MBD培地は本質的に当該技術分野において既知であるように調製した(Neidhardt et al., *J. Bacteriol.* 119:736~747 [1974]を参照されたい)。微量栄養素は、400mgのFeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、100mgのMnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O、100mgのZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、50mgのCuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、100mgのCoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O、100mgのNaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O、100mgのNa<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O、10mLの1MのCaCl<sub>2</sub>及び10mLの0.5Mのクエン酸ナトリウムを1リットル中に含有している、100X原液として調製した。タンパク質発現を測定するために、EnzyScreen lids(EnzyScreen)を用いて、MBD培地を含有している

40

50



マイクロタイタープレートで、37℃、70～80%湿度にて、250～300rpmで、60～70時間にわたって増殖させた。翌日、培養物をマイクロフィルタプレート(0.22μm、Millipore)で濾過し、得られた濾液を生化学的解析に使用した。

【表11】

	FS1	FS2	FS3
1	G102A	A97G	N61E
2	S130P	A128G	P129E
3	T55P	N123G	K213L
4	V203Y	G102A	S145D
5	N61P	L126V	Q275E
6	S101N	G100N	P40E
7	S53G	N62Q	S159K
8	S78N	M124I	S24R
9	S87T-A88L-S89G	N61P	A144K
10	S24G-N25G	S130P	N240K
11	L75S-N76Y	P129S	P239R

10

【0508】

2. BPN' 安定性を改善するための変異体の生産

BPN' 安定性を改善するために、どちらもGene Oracleにより合成された分子pHPLT-BPN'G97A-G128A-Y217Q-S87D又はpHPLT-BPN'G97A-G128A-Y217Q-P40E、あるいはGeneArtにより合成された親分子pHPLT-BPN'G97A-G128A-Y217Q-S78N及びpHPLT-partial opt FNA(バチルス・アミロリケファシエンス(B. amyloliquefaciens)スプチリシンBPN'-Y217L)のいずれかを用いて変異体を構築した。

20

【0509】

表11-2及び11-3に列挙されている情報は、本明細書で提供される変異体を構築するのに使用された親分子、導入された変異、及びプライマーを要約するものである。

【表 1 2】

表11-2: BPN' の安定な変異体を作成するのに使用したプライマー配列		
プライマー	プライマー配列5' ~ 3'	配列番号:
p31	/5PHOS/CGGCGTTAAACAATAACATTGGCGTGCTTGGTGTAG	169
p32	/5PHOS/ACCAAGCACGCCAATGTTATTGTTTAAACGCCGCAACC	170
p25	/5PHOS/GTATCGACTCGAGCCATGAAGATCTTAAAGTCGCTGGAG	171
p26	/5PHOS/CAGCGACTTTAAGATCTTCATGGCTCGAGTCGATACCG	172
p33	/5PHOS/TTGGTGTAGCCCCGGATGCTTCGCTCTACGCCGTTAAAG	173
p34	/5PHOS/CGTAGAGCGAAGCATCCGGGGCTACACCAAGCACG	174
p29	/5PHOS/GAACGGTTGCGGCGTTAGATAATTCTATTGGCGTGCTTG	175
p30	/5PHOS/AGCACGCCAATAGAATTATCTAACGCCGCAACCGTTC	176
p27	/5PHOS/AACGGTTGCGGCGTTAGATAATAACATTGGCGTGCTTGGTGTAG	177
p28	/5PHOS/ACACCAAGCACGCCAATGTTATTATCTAACGCCGCAACCGTTCCTG	178
p7	/5PHOS/CGGCGTTAAACAATAATATTGGCGTGCTTGG	179
p8	/5PHOS/CCAAGCACGCCAATATTATTGTTTAAACGCCG	180
p21	/5PHOS/GGTGTAGCCCCGGATGCTTCGCTCTACG	181
p22	/5PHOS/CGTAGAGCGAAGCATCCGGGGCTACACC	182
p11	/5PHOS/GTATCGACTCGAGCCATGAAGATCTTAAAG	183
p12	/5PHOS/CTTTAAGATCTTCATGGCTCGAGTCGATAC	184
p13	/5PHOS/CGCTTCCAGGGAACAACATATGGTGCCTA	185
p14	/5PHOS/TACGCACCATAGTTGTTCCCTGGAAGCG	186
p15	/5PHOS/CACTCTCAAGGCTACGTTGGATCAAATGTTA	187
p16	/5PHOS/TAACATTTGATCCAACGTAGCCTTGAGAGTG	188
p17	/5PHOS/TGGCGTTTCTATTGAATCGACGCTCCAG	189
p18	/5PHOS/CTGGAAGCGTCGATTCAATAGAAACGCCA	190

10

20

30

【表 1 3】

表11-3: 使用したテンプレート、接種した変異体、及び安定性の改善した変異体を生成するのに使用したプライマー			
	親分子(テンプレート)	導入する変異	使用したプライマー
1	pHPLT-BPN' G97A-G128A-Y217Q-S87D	S78N	p31, p32
2	pHPLT-BPN' G97A-G128A-Y217Q-S78N	P40E	p25, p26
3	pHPLT-BPN' G97A-G128A-Y217Q-P40E	S87D	p33, p34
4	pHPLT-BPN' G97A-G128A-Y217Q-S78N	P40E, S87D	p25, p33
5	pHPLT-BPN' G97A-G128A-Y217Q-S87D	N76D	p29, p30
6	pHPLT-BPN' G97A-G128A-Y217Q-S87D	N76D, S78N	p27, p28
7	pHPLT-partial opt FNA	S78N	p7, p8
8	pHPLT-partial opt FNA	S87D	p21, p22
9	pHPLT-partial opt FNA	P40E	p11, p12
10	pHPLT-partial opt FNA	K213N	p13, p14
11	pHPLT-partial opt FNA	T22V	p15, p16
12	pHPLT-partial opt FNA	Q206E	p17, p18
13	pHPLT-partial opt FNA	P40E, S87D, S78N	p11, p21, p7

40

【0 5 1 0】

10 ppmのネオマイシンを含有している1.6%のスキムミルクプレートに、プラス

50

ミドを発現する枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 株を画線し、37 で一晩増殖させた。プレートから単独のコロニーを、10 ppmのネオマイシンを含有している5 mLのルリアブロスで、37 で250 rpmで振盪させながら一晩増殖させた。1マイクロリットルのReady Lyse lysosome (Epicentre)を添加した、QIAGEN (登録商標)ミニプレップキットプロトコルを用い、細胞の溶解を助けるために緩衝液P1で、37 で15分間プラスミドを単離した。DNA配列が正しいものであることを確認するために、加工前にプラスミドを配列決定した。NEBのDamメチラーゼキットを用いて、プラスミドを、77.5 µLの水+10 µLの10X緩衝液+0.25 µLのSAM+2 µLのDAMメチラーゼ+10 µLのミニプレップDNA (約150 ng/µL)を含有させた反応液中で、37 で一晩メチル化した。DNA Clean and Concentratorキット (Zymo)を用いて、あるいはQIAGEN (登録商標)PCR精製キットにより、メチル化したプラスミドDNAを精製した。2.5 µLの5X緩衝液+0.75 µLのQuik Solution+0.5 µLのプライマー1 (25 µM)+0.5 µLのプライマー2 (25 µM)+1.5 µLのdNTP+1 µLの酵素ブレンド+16.25 µLのH<sub>2</sub>O+2 µLのDNAを含有させた反応混合液で、各DNAテンプレートに対してQUIKCHANGE (登録商標)の多部位変異誘発反応を行った。使用したPCRプログラムは以下の通りであった：95 で1分、(95 で1分、53 で1分、65 で10分)×29サイクル、65 で10分、4 で保持。すべての反応で、MJ Research PTC-200 Peltier thermal cyclerを用いてPCRを実施した。1 µLのDpnIをQUIKCHANGE (登録商標)変異誘発キットに加え、37 で一晩置くことでPCRサンプルから親DNAを除去した。形質転換頻度を増加させるために、製造元のプロトコルに従ってIllustra TempliPhiキットを用い、ローリング・サークル型増幅 (RCA)させることで、DpnI消化した反応物を増幅させた。枯草菌 (*B. subtilis*) 細胞 (aprE, nprE, amyE::xyLRPxyLAcomK-phleo) を、各1 µLのRCA反応物で形質転換し、形質転換させた細胞を、10 ppmのネオマイシンを含有しているLA+1.6%スキムミルクプレートに蒔き、37 で一晩インキュベートした。一晩増殖物からコロニーを選択し、「puReTaq Ready-To-Go PCR Beads」(Amersham)を用いて配列決定するためにコロニーPCRを実施した。PCR及び配列決定に使用したプライマーは、pHPLT F1 (配列番号54)及びpHPLT seq R1 (配列番号55)であった。適切な配列を有するコロニーを凍結した。尿素を含有しているMOPS系培地を用い、37 で68時間にわたり、96ウェルマイクロタイタープレートで枯草菌 (*B. subtilis*) 形質転換体を増殖させることで、BPN'変異体タンパク質を生産させた。

#### 【0511】

##### 3. 異なる5種の親プラスミドからのBPN'変異体の生産

表11-4に示される、合計5種の異なるテンプレート：BPN'-v3 (G97A-G128A-Y217Q)、BPN'-v4 (G97A-N123G-Y217Q)、BPN'変異体8、(S87D-G97A-N109D-G128A-S188D-S248R-Y217Q)、BPN'変異体16 (S87D-G97A-N109D-G128A-S188D-Y217Q)及びBPN'変異体21 (S87R-G97A-N109R-G128A-S188R-Y217Q-S248R)を用い、BPN'変異体を構築した。BPN'-v4及びBPN'-v3の生成は、このような説明についての参照により本案件に組み込まれる、PCT出願番号PCT/US09/46066 (国際公開第09/149144号) (2009年6月3日出願)に記載されている。BPN'変異体8、16、21はGene Oracleにより合成されたものであり、親プラスミドとして用い、更なる変異体を作成した。以下に記載するような融合PCRを用いて作成した2種の変異体 (変異体5及び33)を除き、すべての変異体はQUIKCHANGE (登録商標)変異誘発キットを用いて生成した。変異体を生成するためのプライマー (表11-5に記載)はIntegrated DNA Technologiesにより合成され

10

20

30

40

50

た。導入された変異（太字で示されるもの）、並びに使用されたプライマー及びテンプレートを表11-4に示す。

【表14】

表11-4: 導入された変異(太字)及びBPN'変異体を生成するために使用された親プラスミド			
変異体	構築された変異体	親プラスミド	使用したプライマー
1	G97A-N123C-Y217Q	G97A-N123G-Y217Q	N123C f, N123C r
2	N76D-G97A-G128A-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	N76D f, N76D r
3	G97A-N109D-G128A-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	N109D f1, N109D r
4	G97A-G128A-S188D-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	S188D f, S188D r
5	G97A-G128A-S248D-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	pHPLT F1, S248Dforfus, pHPLT R1, S248 Drevfus
6	G97A-G128A-S188D-S248R-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	S188D f, S248R f1
7	G97A-N109D-G128A-S188D-S248R-Y217Q	S87D-G97A-N109D-G128A-S188D-S248R-Y217Q	D87S f, D87S r
8	S87D-G97A-N109D-G128A-S188D-S248R-Y217Q	Gene Oracleにより合成	Gene Oracleにより合成
9	S87R-G97A-G128A-S188D-S248D-Y217Q	S87D-G97A-N109D-G128A-S188D-Y217Q	S87Rf, S248D f1, D109N f
10	S87R-G97A-N109D-G128A-S188D-Y217Q	S87D-G97A-N109D-G128A-S188D-S248R-Y217Q	R248Sfor, R248Srev
11	G97A-N109D-G128A-S188R-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	N109D f2, S188R f
12	S87R-G97A-N109D-G128A-S188D-Y217Q-S248R	S87D-G97A-N109D-G128A-S188D-S248R-Y217Q	S87R f, S87R r
13	G97A-N109D-G128A-Y217Q-S248R	G97A-G128A-Y217Q	N109D f2, S248R f2
14	S87D-G97A-G128A-Y217Q-S248R	G97A-G128A-Y217Q	S87D f, S248R f1
15	S87D-G97A-N109D-G128A-S188D-Y217Q-S248D	S87D-G97A-N109D-G128A-S188D-Y217Q	S248D f1, S248D r
16	S87D-G97A-N109D-G128A-S188D-Y217Q	Gene Oracleにより合成	Gene Oracleにより合成
17	G97A-N109D-G128A-Y217Q-S248D	G97A-G128A-Y217Q	N109D f2, S248D f2
18	S87R-G97A-G128A-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	S87R f, S87R r
19	S87R-G97A-G128A-Y217Q-S248R	G97A-G128A-Y217Q	S87R f, S248R f1
20	S87R-G97A-G128A-S188R-Y217Q-S248R	S87R-G97A-N109R-G128A-S188R-Y217Q-S248R	D109N f, D109N r
21	S87R-G97A-N109R-G128A-S188R-Y217Q-S248R	Gene Oracleにより合成	Gene Oracleにより合成
22	G97A-G102A-G128A-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	G102A f, G102A r
23	G97A-G128A-S130P-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	S130P f, S130P r
24	G97A-S101N-G128A-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	S101N f, S101N r
25	G97A-G100N-G128A-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	G100N f, G100N r
26	N61P-G97A-G128A-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	N61P f, N61P r
27	G97A-G128A-A187D-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	A187D f, A187D r
28	G97A-G128A-F189D-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	f189D f, f189D r
29	G97A-G128A-A137V-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	A137V f, A137V r
30	S63T-G97A-G128A-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	S63T f, S63T r
31	G97A-Q103N-G128A-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	Q103N f, Q103N r
32	N62D-G97A-G128A-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	N62D f, N62D r
33	G97A-G100E-G128A-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	G100E Fsf, pHPLT F1, G100 EFsf, pHPLT R1

## 【0512】

QUIKCHANGE（登録商標）変異誘発によるBPN'変異体の生産  
 BPN'-v3、BPN'-v4、BPN'変異体8、BPN'変異体16、及びBPN'変異体21を発現するプラスミドを含有している枯草菌（*Bacillus subtilis*）株を、10ppmのネオマイシンを含有している1.6%のスキムミルクプレートに画線し、37で一晚増殖させた。プレートから単独のコロニーを、10ppmのネオマイシンを含有している5mLのルリアブロスで、37で250rpmで振盪させながら一晚増殖させた。BPN'-v3、BPN'-v4、BPN'変異体8、BPN'変異体16、及びBPN'変異体21を発現しているプラスミドを、1マイクロリットルのReady Lyselysozymeを添加しかつ37で15分にわたってインキュベートする細胞溶解は行わずに、QIAGEN（登録商標）ミニプレップキットプロトコルを用い単離した。NEBのDamメチラーゼキットを用いて、プラスミドを、77.75μLのH<sub>2</sub>O+10μLの10X緩衝液+0.25μLのSAM+2μLのDAMメチラーゼ+10μLのミニプレップDNAを含有させた反応液中で、37で一晚メチル化した。メチル化したDNAを、QIAGEN（登録商標）PCR精製キットを用い精製した。表11-4に列挙した変異体14、18、及び19を、QUIKCHANGE LIGHTNING（商標）Multi Site-Directed Mutagenesis Kit（Stratagene）を用い、2.5μLの5X緩衝液+0.75μLのQuik溶液+0.5μLのプライマー1（25μM）+0.5μLのプライマー2（25μM）+1.5μLのdNTP+1μLの酵素ブレンド+16.25μLのH<sub>2</sub>O+2μLのDNAを含有させた反応混合液で生成した。使用したPCRプログラムは以下の通りであ

た：95 で2分、(95 で20秒、55 で30秒、64 で2分30秒)×29サイクル、64 で5分、4 で保持。

【0513】

残りの変異体は、QUIKCHANGE (登録商標) Multi Site-Directed Mutagenesis Kitを用いて、2.5 μLの5X緩衝液+0.75 μLのQuik溶液+0.5 μLのプライマー1(25 μM)+0.5 μLのプライマー2(25 μM)+1.5 μLのdNTP+1 μLの酵素ブレンド+16.25 μLのH2O+2 μLのDNAを含有させた反応混合液で生成した。使用したPCRプログラムは以下の通りであった：95 で1分、(95 で1分、53 で1分、65 で10分)×29サイクル、65 で10分、4 で保持。すべての反応で、MJ Research PTC-200 Peltier thermal cyclerを用いてPCRを実施した。Quik-Change反応に使用したプライマーを表11-5に提供する。

10

【表15-1】

表11-5: Quik-Change反応に使用したプライマー		
プライマー名	プライマー配列(5'~3')	配列番号:
N76Df	/5PHOS/GAACGGTTGCGGCGTTAGATAAATCTATTGGCGTGCTTG	191
N76Dr	/5PHOS/AGCACGCCAATAGAATTATCTAACGCCGCAACCGTTC	192
S87Df	/5PHOS/TTGGTGTAGCCCCGGATGCTTCGCTCTACGCCGTTAAAG	193
S87Dr	/5PHOS/CGTAGAGCGAAGCATCCGGGGCTACACCAAGCACG	194
G102Af	/5PHOS/GCAGCAGACGGATCAGCACAACTACTCATGGATTAT	195
G102Ar	/5PHOS/ATAATCCATGAGTATTGTGCTGATCCGTCTGCTGC	196
S130Pf	/5PHOS/CAACATGAGCCTGGGAGCACCACCGGGCAGTGCGGCACTTAAAGC	197
S130Pr	/5PHOS/GCTTTAAGTGCCGCACTGCCCGGTGGTCTCCAGGCTCATGTTG	198
S101Nf	/5PHOS/GTTCTTGACAGCAGACGGAAATGGCCAATACTCATGGATT	199
S101Nr	/5PHOS/AATCCATGAGTATTGGCCATTTCCGTCTGCTGCAAGAAC	200
G100Nf	/5PHOS/TTAAAGTTCTTGACAGCAGACAATTCAGGCCAATACTCATGGA	201
G100Nr	/5PHOS/TCCATGAGTATTGGCCTGAATTGTCTGCTGCAAGAACTTTAA	202
N61Pf	/5PHOS/CCGTTTCAAGATCCGAATTCTCATGGCACACACGTC	203
N61Pr	/5PHOS/TGCCATGAGAATTCGGATCTTGAAACGGGTTTGTTCG	204
A187Df	/5PHOS/TTCAAATCAACGTGATTCTTTTTCTCCGTGGGACCGGAG	205
A187Dr	/5PHOS/ACGGAGGAAAAAGAATCACGTTGATTTGAAGAGTCTACAG	206
F189Df	/5PHOS/CAAATCAACGTGCCTCTGATTCCTCCGTGGGACCGGAG	207
F189Dr	/5PHOS/CTCCGGTCCCACGGAGGAATCAGAGGCACGTTGATTTG	208

20

30

40

## 【表 15 - 2】

(上記表の続き)

表11-5: Quik-Change反応に使用したプライマー		
プライマー名	プライマー配列 (5' ~ 3')	配列番号:
A137Vf	/5PHOS/AGCGGCAGTGCGGCACCTAAAGTTGCAGTTGATAAAGCTGTTGC	209
A137Vr	/5PHOS/GCAACAGCTTTATCAACTGCAACTTTAAGTGCCGCACTGCCGCT	210
S63Tf	/5PHOS/TCAAGATAACAATACACATGGCACACACGTGCGAGGAAC	211
S63Tr	/5PHOS/ACGTGTGTGCCATGTGTATTGTTATCTTGAACGGGTTTG	212
Q103Nf	/5PHOS/AGACGGATCAGGCAATTACTCATGGATTATCAACGGCATC	213
Q103Nr	/5PHOS/TAATCCATGAGTAATTGCCTGATCCGCTGCTGCAAG	214
N62Df	/5PHOS/ACCCGTTTCAAGATAACGATTCTCATGGCACACACGTC	215
N62Dr	/5PHOS/GACGTGTGTGCCATGAGAATCGTTATCTTGAAACGGGT	216
N109Df1	/5PHOS/CAATACTCATGGATTATCGATGGCATCGAATGGGCCA	217
N109Dr	/5PHOS/TGGCCATTTCGATGCCATCGATAATCCATGAGTATTG	218
S188Df	/5PHOS/CTCTTCAAATCAACGTGCCGATTTTTCTCCGTGGGACC	219
S188Dr	/5PHOS/GGTCCCACGGAGGAAAAATCGGCACGTTGATTTGAAGAG	220
S248R f1	/5PHOS/CAAACACTCAAGTCCGCGAAGTTTAGAAAACACCAC	221
S87Rf	/5PHOS/GTGCTTGGTGTAGCCCCGAGAGCTTCGCTCTACGCCGT	222
S87Rr	/5PHOS/ACGGCGTAGAGCGAAGCTCTCGGGGCTACACCAAGCAC	223
S248D f1	/5PHOS/CAAACACTCAAGTCCGCGATAGTTTAGAAAACACCAC	224
S248Dr	/5PHOS/GTGGTGTTTTCTAAACTATCGCGGACTTGAGTGTGTTG	225
D87Sf	/5PHOS/GTGCTTGGTGTAGCCCCGCTCGCTTCGCTCTACGCCGT	226

10

20

## 【0514】

(上記表の続き)

30

## 【表 15 - 3】

(上記表の続き)

表11-5: Quik-Change反応に使用したプライマー		
プライマー名	プライマー配列(5'~3')	配列番号:
D87Sr	/5PHOS/ACGGCGTAGAGCGAAGCAGACGGGGCTACACCAAGCAC	227
D109Nf	/5PHOS/CAATACTCATGGATTATCAACGGCATCGAATGGGCCA	228
D109Nr	/5PHOS/TGGCCATTTCGATGCCGTTGATAATCCATGAGTATTG	229
N109D f2	/5PHOS/ACTCATGGATTATCGATGGCATCGAATGGGCCATCGC	230
S248R f2	/5PHOS/CACTCAAGTCCGCAGAAGTTTAGAAAACACCACTAC	231
S248D f2	/5PHOS/CACTCAAGTCCGCATAGTTTAGAAAACACCACTAC	232
S188Rf	/5PHOS/CAAATCAACGTGCCAGATTTTCTCCGTGGACCGGAG	233
QC FUSION_For1	AAAGGGGAGGAAAATCGTGAACA	234
QC FUSION_ReV1	GTTCTAAATCGTGTTCCTTG	235
S248D forfus	GAAGTGGACAAACACTCAAGTCCGCATAGTTTAGAAAACACCACTAC	236
S248DreVfus	GACTTGAGTGTTCAGTTCGGGTGCTTAGAAAG	237
R248Sfor	/5PHOS/CAAACACTCAAGTCCGCAGCAGTTTAGAAAACACCAC	238
R248SreV	/5PHOS/GTGGTGTTCCTAAACTGCTGCGGACTTGAGTGTTC	239
G100E_Fsfor	ACGCCGTTAAAGTTCCTGCAGCAGACGAATCAGGCCAATACTCATGGAT	240
G100E_FsreV	TGCTGCAAGAACTTTAACGGCGTAGAGCGAAGCAGA	241
N123Cf	/5PHOS/ACATGGATGTAATCTGCATGAGCCTGGGAGGACCAAG	242
N123Cr	/5PHOS/TCCTCCCAGGCTCATGCAGATTACATCCATGTTATTCG	243
pHpLT R1	/5PHOS/GTTATGAGTTAGTTCAAATTCG	244

## 【0515】

(上記表の続き)

1  $\mu$ LのDpnIをQuik-Change反応物に加え、37  $^{\circ}$ Cで一晩置くことでPCRサンプルから親DNAを除去した。製造元のプロトコルに従ってIllustra TempliPhiキットを用い、ローリング・サークル型増幅(RCA)させることで、DpnI消化した反応物1  $\mu$ Lを増幅させた。枯草菌(*B. subtilis*)細胞( aprE, nprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo)を、各1  $\mu$ LのRCA反応物で形質転換し、形質転換させた細胞を、10 ppmのネオマイシンを含有しているLA+1.6%スキムミルクプレートに蒔き、37  $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。一晩増殖物からコロニーを選択し、「pURETaq Ready-To-Go PCR Beads」(Amersham)を用いてコロニーPCRを実施した。使用したPCRプライマーはpHPLT F1(配列番号54)及びpHPLT seq R1(配列番号55)であった。適切な配列を有するコロニーを凍結した。尿素を含有しているMOPS系培地を用い、37  $^{\circ}$ Cで68時間にわたり、96ウェルマイクロタイタープレートで枯草菌(*B. subtilis*)形質転換体を増殖させることで、BPN'変異体を発現させた。

## 【0516】

融合PCRによるBPN'変異体の生産

テンプレートpHPLT-BPN'-v3から増幅させた断片で融合PCRを用い、変異体5及び33を生成した。これらの変異体を生成するために使用したPCRプライマーは表11-5に包含される。変異体5に関しては、BPN'遺伝子の5'断片は、順方向

プライマー pHPLT F1 (配列番号54)、及び逆方向プライマー S248D revfus を用いて増幅させた。BPN' 遺伝子の3'断片は、所望の変異を含有している順方向プライマー S248D forfus 及び逆方向プライマー pHPLT R1 を用いて増幅させた。20bpの重複配列を含有している2種の生成物は、1µLの各断片と、融合プライマー QC FUSION\_\_For1 及び QC FUSION\_\_Rev1 を最終的なPCR反応で組み合わせることで融合させた。PCR反応は、すべて Hercules II PCRキット (Stratagene) の標準条件を用いて実施した。PCRミックスには、1µLのDNAポリメラーゼ、1µLのプラスミドDNA (又は融合用断片DNA)、0.5µLのdNTP、1.25µLの25µMの順方向プライマー、1.25µLの25µMの逆方向プライマー、10µLの5X緩衝液、35µLのH<sub>2</sub>Oを含有させた。使用したPCRプログラムは以下の通りであった：95 で2分、(95 で30秒、55 で30秒、72 で「X」秒) × 29サイクル、72 で1分、4保持 (「X」は増幅させるDNAの1kBつき15秒)。

10

## 【0517】

変異体33に関しては、BPN' 遺伝子の5'断片は、テンプレート pHPLT - BPN' - v3、並びにプライマー pHPLT F1 (配列番号54) 及び EG100E\_\_Fsrev を用いて増幅させた。プライマー G100E\_\_Fsfor 及び pHPLT R1 を用い、変異を含有させた3'断片を増幅させた。20bpの重複配列を含有している2種の生成物は、1µLの各断片と、融合プライマー QC FUSION\_\_For1 及び QC FUSION\_\_Rev1 を最終的なPCR反応で組み合わせることで融合させた。PCR条件は上記のものと同様であった。

20

## 【0518】

QIAGEN (登録商標) PCR精製カラムを用い、供給元により提供された条件で2種の融合生成物を精製し、BglI 及び HindIII 酵素を用い一晩消化した。同じ酵素を用い、プラスミド pHPLT - BPN' partial opt を消化し、ベクターのバンドをゲルから抽出し、製造元の推奨に従い QIAGEN (登録商標) ゲル精製カラムで精製した。制限酵素ミックスには10µLの精製DNA、5µLのRoche Buffer B、0.5µLのHindIII、0.5µLのBglI、34µLのH<sub>2</sub>Oを含有させ、反応は37 で8時間にわたって、続いて65 で20分にわたって実施した。QIAGEN (登録商標) PCR精製カラムを用い消化物を精製し、及び Mighy Mix Ligase キット (Tekara) を用い、切断したベクター骨格と16で一晩ライゲーションさせた。インキュベーション後、1µLのライゲーションミックスを Illustra TempliPhi キットを用いて増幅させた。

30

## 【0519】

増幅反応に関して、1µLのライゲーション反応ミックスを、TempliPhi キットの5µLのサンプル緩衝液と混合し、95 で3分加熱してDNAを変性させた。反応物を氷中に置き、2分冷却し、次いで簡単にスピンドウンさせた。5マイクロリットルの反応緩衝液、及び TempliPhi キットの0.2µLのphi29ポリメラーゼを加え、反応物をMJ Research PCR machine で30 で4時間にわたってインキュベートした。phi29酵素は、PCR装置中で、65 で10分にわたってインキュベートすることにより、反応液中で熱失活させた。枯草菌 (Bacillus subtilis) 細胞 (aprE, nprE, amyE :: xy1RPxy1AcomK - phleo) を1µLの反応混合物を用いて形質転換させ、形質転換体を、10ppmのネオマイシンを含有している1.6%のスキムミルクプレート上で37で一晩増殖させた。形質転換体を選択してコロニーPCRを実施し、「pureTaq Ready-To-Go PCR Beads」 (Amersham) 並びにプライマー pHPLT F1 (配列番号54) 及び pHPLT seqR1 (配列番号55) を用いて配列決定した。

40

## 【0520】

4. ライブラリ RCL4 - RCL7 からの BPN' 変異体の生産  
RCL4 ライブラリ

50



「RCL4」は、BPN'-v3をコードしている(BPN"-G97A-G128A-Y217Q)遺伝子の、3つの隣接するコドンと同時にランダム化させる融合PCRにより作成された、部位飽和ライブラリ群を指す。各ライブラリ中で、3つの変異コドンに対応するアミノ酸位置は表11-6に提供される。それぞれ3つの縮重コドンを含むしている、2種の部分的に重複している相補的な変異原性プライマーを使用して、以下表11-6に示されるように各ライブラリ内に変異を導入した。各プライマー中で、対象とする各縮重コドンの最初の2つのヌクレオチド(NNX、N=A、C、T、又はGであり、及びXは変化していないヌクレオチドである)のみを変異させた(表11-6)。

#### 【0521】

各ライブラリを生成するために、共通の3'側の遺伝子に隣接するプライマー(P4976、CCTCTCGGTTATGAGTTAGTTC、(配列番号61))及び変異原性プライマー、あるいは共通の5'側の遺伝子に隣接するプライマー(P4974、GCCTCACATTTGTGCCACCTA、(配列番号60))及び表11-6で各ライブラリについて示される変異原性プライマーを用いて、2種類のPCR反応を実施した。これらのPCR反応は、2種のPCR断片を生成した。一方は変異BPN'-v3遺伝子の5'側半分(5'遺伝子断片)をコードするものであり、他方は変異BPN'-v3遺伝子の3'側半分(3'遺伝子断片)をコードするものである。各PCR増幅反応には、30 pmolの各プライマー及び100 ngのBPN'-v3親テンプレートDNA(pHPLT-BPN'-v3プラスミド、図1を参照されたい)を含むさせた。増幅はvent DNAポリメラーゼ(NEB)を用いて実施した。PCR反応(20 µL)は、まず始めに95 °Cで2.5分加熱した後、続いて94 °Cで15秒の変性、55 °Cで15秒のアニーリング、及び72 °Cで40秒の伸長を30サイクル行った。増幅させた後、5'及び3'遺伝子断片を、QIAGEN(登録商標)ゲルバンド精製用キットによりゲル精製し、混合して(各断片につき50 ng)、プライマーP4973(AAAGGATCCTAATCGGCGCTTTTC、配列番号62)及びP4950(CTTGTCCTCCAAGCTTAAATAAAA、配列番号63)を用いて再度PCRで増幅させて、完全長の遺伝子断片を生成した。伸長工程を72 °Cで2分にわたって実施したことを除き、PCR条件は上記の条件と同様のものであった。完全長のDNA断片をQIAGEN(登録商標)ゲルバンド精製用キットによりゲル精製し、制限酵素BamHI及びHindIIIで消化し、同様の制限酵素で消化したpHPLT-BPN' partial optベクターとライゲーションさせた。Illustra TempliPhiキットでローリング・サークル型増幅法を用い、ライゲーション混合物を製造元(GE Healthcare)の推奨に従って増幅させることで、枯草菌(*Bacillus subtilis*)に形質転換させるための多量体DNAを生成した。この目的のため、1 µLのライゲーション混合物と5 µLのサンプル緩衝液を混合し、95 °Cで3分間加熱し、氷中で冷却した。次に、5 µLの反応緩衝液及び0.2 µLの酵素を各チューブに加え、続いて30 °Cで10時間にわたってインキュベートした。ローリング・サークル型増幅産物を100倍希釈し、枯草菌(*B. subtilis*)細胞の形質転換に用いた(*aprE*, *nprE*, *amyE* :: *xy1RPy1AcOmK-phleo*)。形質転換混合物のアリコートをし、1.6%のスキムミルク及び10 µg/mLのネオマイシンを含むしているLBプレートに蒔き、37 °Cで一晩インキュベートした。続いて、ハローを生じたコロニーを、10 µg/mLのネオマイシンを含むしている120 µLのLB培地に接種した。

10

20

30

40

【表 16 - 1】

ライブラリ#	BPN' -v3中で 変異させた残基	遺伝子 断片	共通の隣接する プライマー名	変異原性 プライマー名	変異原性プライマー配列	配列番号:
1	5~7	3'	P4976	P5119	TACGCGCAGTCCGTGNNNCCNCGTATCACAATAATTAAGCCCTG	245
		5'	P4974	P5120	TTTAATTTGTGATACGNNNGNANNACGGACTGCGCGTACGCAT	246
2	11~13	3'	P4976	P5121	TACGGCGTATCACAANNNTNANNCCCTGCTCTGCACTCTCAAG	247
		5'	P4974	P5122	AGAGTGCAGAGCAGGGNNNTNANNNTTGTGATACGCGGTAAGGCAC	248
3	20~22	3'	P4976	P5123	GCTCTGCACCTCAANNCCNCNNTGGATCAAAATGTTAAAGTAGCGGT	249
		5'	P4974	P5124	TTTAACATTGATCCANNNGNNGNNTTGTGAGATGCAGAGCAGGGGCTT	250
4	21~23	3'	P4976	P5125	CTGCACTCTCAAGGCNCCNNTNATCAAATGTTAAAGTAGCGGTTATC	251
		5'	P4974	P5126	TACTTTAACATTGATNANNNGNNGCCTTGAGAGTGCAGAGCAG	252
5	22~24	3'	P4976	P5127	CACCTCAAGGCTACNNTNANNAAAATGTTAAAGTAGCGGTTATCGA	253
		5'	P4974	P5128	CGCTACTTTAACAATTTNNTNANNNGTAGCCTTGAGAGTGCAGAG	254
6	23~25	3'	P4976	P5129	TCTCAAGGCTACACTNANNANNNTGTTAAAGTAGCGGTTATCGACA	255
		5'	P4974	P5130	AACCGCTACTTTAACANNNTNNTNAGTGTAGCCTTGAGAGTGCAG	256
7	24~26	3'	P4976	P5131	CAAGGCTACACTGGANNANNTNNTAAAGTAGCGGTTATCGACAGC	257
		5'	P4974	P5132	GATAACCGCTACTTTANNANNNTTCCAGGTGAGCCTTGAGAGTG	258
8	25~27	3'	P4976	P5133	GGCTACACTGGATCANNTNNTNAGTAGCGGTTATCGACAGCGGT	259
		5'	P4974	P5134	GTCGATAACCGCTACTNANNANNNTGATCCAGTGTAGCCTTGAGA	260
9	26~28	3'	P4976	P5135	TACACTGGATCAAAATNNTNANNAGCGGTTATCGACAGCGGAT	261
		5'	P4974	P5136	GCTGTGATAACCGCTNNTNANNATTTGATCCAGTGTAGCCTTGA	262
10	27~29	3'	P4976	P5137	ACTGGATCAAAATGTNANNANNNGTTTATCGACAGCGGTTATCGAC	263
		5'	P4974	P5138	ACCGCTGTGATAACCCNNTNNTNAAACATTTGATCCAGTGTAGCCT	264
11	28~30	3'	P4976	P5139	GGATCAAATGTTAAANNANNNGNNTATCGACAGCGGTTATCGACTC	265
		5'	P4974	P5140	GATACCGCTGTGATANNCCNNTNNTTTAAACATTTGATCCAGTGTAGC	266
12	29~31	3'	P4976	P5141	TCAAATGTTAAAGTANNGNNTNCCAGCAGCGGTTATCGACTCGAGCCAT	267
		5'	P4974	P5142	GTCGATAACCGCTGTCGNANNCNNTACTTTAAACATTTGATCCAGTGA	268
13	30~32	3'	P4976	P5143	AATGTTAAAGTAGCGNNTNCCNCAGCGGTTATCGACTCGAGCCAT	269
		5'	P4974	P5144	CGAGTCGATAACCGCTGNNGNANNCCGCTACTTTAAACATTTGATCCAG	270
14	31~33	3'	P4976	P5145	GTTAAAGTAGCGGTTNCCNCNCCGCGGTTATCGACTCGAGCCATCCA	271
		5'	P4974	P5146	GCTCGAGTCGATACCNNNGNNAACCGCTACTTTAAACATTTGATC	272
15	32~34	3'	P4976	P5147	AAAGTAGCGGTTATCNCNCCNNTATCGACTCGAGCCATCCAGAT	273
		5'	P4974	P5148	ATGGCTCGAGTCGATANNNGNNGNATAACCGCTACTTTAAACATTTG	274
16	33~35	3'	P4976	P5149	GTAGCGGTTATCGACNCCNNTNCCGACTCGAGCCATCCAGATCT	275
		5'	P4974	P5150	TGGATGGCTCGAGTCGNANNGNNGTGTGATAACCGCTACTTTAAACA	276
17	34~36	3'	P4976	P5151	GCGGTTATCGACAGCNNTNCCNNTCGAGCCATCCAGATCTTTAAAG	277
		5'	P4974	P5152	ATCTGGATGGCTCGAGNNGNANNNGTGTGATAACCGCTACTTT	278

10

20

【表 16 - 2】

(上記表の続き)

ライブラリ#	BPN' -v3中で 変異させた残基	遺伝子 断片	共通の隣接する プライマー名	変異原性 プライマー名	変異原性プライマー配列	配列番号:
18	35~37	3'	P4976	P5153	GTTATCGACAGCGGTNCCNCCNNGAGCCATCCAGATCTTTAAAGTC	279
		5'	P4974	P5154	AAGATCTGGATGGCTCNCNNGNNGNACCCTGTCGATAACCGCTA	280
19	36~38	3'	P4976	P5155	ATCGACAGCGGTTATCNCNCCNCCATCCAGATCTTTAAAGTCGCTG	281
		5'	P4974	P5156	TTTAAGATCTGGATGNNCCNCCNNGATACCGCTGTCGATAACCGCTA	282
20	37~39	3'	P4976	P5157	GACAGCGGTTATCGACNCCNCCNNTCCAGATCTTTAAAGTCGCTGGA	283
		5'	P4974	P5158	GACTTTAAGATCTGGANNCCNCCNNGTGTGATACCGCTGTCGATAAC	284
21	38~40	3'	P4976	P5159	AGCGGTTATCGACTGCNCCNNTNAGATCTTTAAAGTCGCTGGAGG	285
		5'	P4974	P5160	AGCGACTTTAAGATCTNANNCCNCCGAGTCGATAACCGCTGTCGA	286
22	41~43	3'	P4976	P5161	GACTCGAGCCATCCANNNTNNTNAGTCTGGAGGGGCTTCTAT	287
		5'	P4974	P5162	AGCCCTCCAGCGACTNANNANNNTGGATGGCTCGAGTCGATAC	288
23	43~45	3'	P4976	P5163	AGCCATCCAGATCTTANNCCNCCNNTGGAGGGGCTTCTATGGTGCCGT	289
		5'	P4974	P5164	CATAGAAAGCCCTCCNAGCGACTTTNAAAGATCTGGATGGCTCGAGTC	290
24	44~46	3'	P4976	P5165	CATCCAGATCTTTAAANNCCNNTNAGGGGCTTCTATGGTGCCGT	291
		5'	P4974	P5166	CACCATAGAAGCCCTNANNCCNNTTTAAAGATCTGGATGGCTCGAG	292
25	51~53	3'	P4976	P5167	GGAGGGGCTTCTATGNCCNCCNCCGAAACAACCCGTTTCAAGATAA	293
		5'	P4974	P5168	AAACGGGTTTGTTCGNCCNCCNCCATAGAAGCCCTCCAGCGA	294
26	52~54	3'	P4976	P5169	GGGGCTTCTATGGTGNNCCNCCNNAACAACCCGTTTCAAGATAACAA	295
		5'	P4974	P5170	TTGAAACGGGTTTGTNNCCNCCNCCATAGAAGCCCTCCAG	296
27	53~55	3'	P4976	P5171	GCTTCTATGGTGCCNCCNCCNNAACAACCCGTTTCAAGATAACAATTC	297
		5'	P4974	P5172	ATCTTGAACCGGTTTNNCCNCCNCCGACCATAGAAGCCCTC	298
28	54~56	3'	P4976	P5173	TCTATGGTGCCGTCCNANNANNCCGGTTTCAAGATAACAATTTCTCA	299
		5'	P4974	P5174	GTTATCTTGAACGGGNNNTNNGGACGGCACCATAGAAGCCCTC	300
29	55~57	3'	P4976	P5175	ATGGTGCGCTCCGAANNCCNCCNNTTCAAGATAACAATTTCTCATGG	301
		5'	P4974	P5176	ATTGTTATCTTGAACNCCNCCNNTTCCGACGGCACCATAGAAG	302
30	56~58	3'	P4976	P5177	GTGCCGTCGAAACANCCNCCNNTCAAGATAACAATTTCTCATGGCAC	303
		5'	P4974	P5178	AGAATTGTTATCTTGANCCNCCNNTGTTTCGACGGCACCATAGA	304
31	57~59	3'	P4976	P5179	CCGTCCGAACAACAACNCCNNTNAGATAACAATTTCTCATGGCACAC	305
		5'	P4974	P5180	ATGAGAATTGTTATCTNANNCCNNTGTTTTCGGACGGCACCA	306
32	58~60	3'	P4976	P5181	TCCGAACAACAACCCGNNNTNANNNTAACAATTTCTCATGGCACACAC	307
		5'	P4974	P5182	GCCATGAGAATGTTANNNTNANNCCGGGTTGTTTCGGACGGCA	308
33	59~61	3'	P4976	P5183	GAAACAACCCGTTTNNANNNTNCAATTTCTCATGGCACACACGTC	309
		5'	P4974	P5184	TGTGCCATGAGAATTGNANNNTNAAACGGGTTTGTTCGGACG	310

30

40

【0522】

(上記表の続き)

【表 16 - 3】

(上記表の続き)

表11-6:RCL4ライブラリの生成に使用したプライマー一覧						
ライブラリ#	BPN' -v3中で 変異させた残基	遺伝子 断片	共通の隣接する プライマー名	変異原性 プライマー名	変異原性プライマー配列	配列番号:
34	60~62	3'	P4976	P5185	ACAAACCCGTTTCAANNNTNNCNNTTCTCATGGCACACACGTCG	311
		5'	P4974	P5186	GTGTGTGCCATGAGAANNGNANNNTTGAACGGGTTGTTTCCGGAC	312
35	61~63	3'	P4976	P5187	AACCCGTTTCAAGATNNCNNTTTCATGGCACACACGTCGCAG	313
		5'	P4974	P5188	GACGTGTGTGCCATGANNANNGNNTCTTGAACGGGTTTGTTCG	314
36	62~64	3'	P4976	P5189	CCGTTTCAAGATAACNNNTNNNTTGGCACACACGTCGCAGGAA	315
		5'	P4974	P5190	TGGACGTGTGTGCCANNANNANNNGTATCTTGAACGGGTTTGT	316
37	67~69	3'	P4976	P5191	AATTCTCATGGCACANNCCNAGGAACGGTTGCGGCGTAA	317
		5'	P4974	P5192	CGCCGCAACCGTTCTCANNNGNNTTGTGCCATGAGAATTTTATCTT	318
38	68~70	3'	P4976	P5193	TCTCATGGCACACACNNANNNAACGGTTGCGGCGTTAAACAAT	319
		5'	P4974	P5194	TAACGCCGCAACCGTTNNNNGNNGTGTGTGCCATGAGAATTTGTTA	320
39	71~73	3'	P4976	P5195	ACACACGTTCGCAGGANNGNNTNNNGCGTTAAACAATTTATTGGCGT	321
		5'	P4974	P5196	AGAATTTAAACGCCNANNNNCTCCTGCGACGTGTGCCAT	322
40	74~76	3'	P4976	P5197	GCAGGAACGGTTGCGNNGNANNCAATTTATTGGCGTGTGGTG	323
		5'	P4974	P5198	CACGCCAATAAGAATGNNNNNNCCGCAACCGTTCTCCTGCGACGT	324
41	77~79	3'	P4976	P5199	ACGGTTGCGGCGTTANNCNNTTATTGGCGTGTGGTAGC	325
		5'	P4974	P5200	ACCAAGCAGCCAAATANNANNGNNTAACGCCGCAACCGTTCCCTG	326
42	81~83	3'	P4976	P5201	AACAATTTATTGGCNGNNTTGTAGCCCGCTGCTTCGCT	327
		5'	P4974	P5202	AGCAGACGGGCTACANNANNCCNNGCAAATAGAATTTTAAACGCCGCAA	328
43	83~85	3'	P4976	P5203	TCTATTGGCGTGCTTNNNNANNCCGCTGCTGCTCAG	329
		5'	P4974	P5204	GAGCGAAGCAGACGGNNTNNANNAGCACGCCAATAAGAATTTGTTA	330
44	84~86	3'	P4976	P5205	ATTGGCGTGTGTGTTNNANNNGTCTGCTTCCGCTACGCCGT	331
		5'	P4974	P5206	GTAGAGCGAAGCAGACNNGNNTNACCAGCACGCCAATAAGAATTG	332
45	85~87	3'	P4976	P5207	TGGCGTGTGTGTTANNCCNNGNNTGCTTCCGCTACGCCGTAA	333
		5'	P4974	P5208	GGCGTAGAGCGAAGCANNCNNGNNTACACCAAGCACGCCAATAAGA	334
46	86~88	3'	P4976	P5209	GTGCTTGGTAGGCCNNGNNTTTCGCTCAGCCGTTAAAGTT	335
		5'	P4974	P5210	AACGGCGTAGAGCGAANNANNCCNNGGCTACACCAAGCACGCCAA	336
47	87~89	3'	P4976	P5211	CTTGGTGTAGCCCGNNTNNTNGCTCAGCCGTTAAAGTCTT	337
		5'	P4974	P5212	TTTAAACGGCGTAGAGCANNANNCCGCGGCTACACCAAGCACGCCAAT	338
48	88~90	3'	P4976	P5213	GGTGTAGCCCGCTTNNNNANNCCAGCCGTTAAAGTTCTTGACAG	339
		5'	P4974	P5214	AACTTTAACGGCGTAGNCCNANNAGACGGGCTACACCAAGCA	340
49	89~91	3'	P4976	P5215	GTAGCCCGCTGCTNNNNCCNCCGCTTAAAGTTCTTGACAGCA	341
		5'	P4974	P5216	AAGAACTTAAACGGCGNNGNNCNNAAGCACAGCGGGCTACACCAA	342

10

20

【 0 5 2 3】

(上記表の続き)

【表 16 - 4】

(上記表の続き)

表11-6:RCL4ライブラリの生成に使用したプライマー一覧						
ライブラリ#	BPN' -v3中で 変異させた残基	遺伝子 断片	共通の隣接する プライマー名	変異原性 プライマー名	変異原性プライマー配列	配列番号:
50	90~92	3'	P4976	P5217	GCCCCGTGCTCGTCCGNCCNCCNCCGTTAAAGTTCTTGACAGCAGAC	343
		5'	P4974	P5218	TGCAAGAATTTAAACGNNGNNGNCCGAAGCAGACGGGCTACAC	344
51	91~93	3'	P4976	P5219	CCGCTCGTCTCGCTCNCCNCCNNTAAAGTTCTTGACAGCAGACCGGA	345
		5'	P4974	P5220	TGCTGCAAGAATTTANNNGNNGNAGCGAAGCAGACGGGGCT	346
52	92~94	3'	P4976	P5221	TCTGCTCGCTCAGCCNNTNNAAGTTCTTGACAGCAGACGGATC	347
		5'	P4974	P5222	GTCTGCTGCAAGAACTNNANNNGNNGTAGAGCGAAGCAGACGGGGCTA	348
53	93~95	3'	P4976	P5223	GCTTGCCTCAGCCNNTNNAAGTTCTTGACAGCAGACGGATCAG	349
		5'	P4974	P5224	TCCGCTCTGTGCAGANNNTNANNNGCGTAGAGCGAAGCAGACG	350
54	94~96	3'	P4976	P5225	TCCGCTCAGCCGTTNNANNNTTGCAGCAGACGGATCAGGCCA	351
		5'	P4974	P5226	TGATCCGCTGCTGCANNANNNTNNAACGGCGTAGAGCGAAGCGAG	352
55	95~97	3'	P4976	P5227	CTCTACGCCGTTAAANNNTNNAAGCAGACGGATCAGGCCAATA	353
		5'	P4974	P5228	GCCTGATCCGCTCTGCTNNANNNTTTAACGGCGTAGAGCGAAG	354
56	96~98	3'	P4976	P5229	TACGCCGTTAAAGTTNNNNANNAGCGGATCAGGCCAATACTC	355
		5'	P4974	P5230	TTGGCCTGATCCGCTTNNNNANNAACTTTAAACGGCGTAGAGCGA	356
57	97~99	3'	P4976	P5231	GCCGTTAAAGTTCTTNNANNANNCCGATCAGGCCAATACTCATG	357
		5'	P4974	P5232	GTATTGGCCTGATCCGNNTNNTNNAAGAACTTTAAACGGCGTAGAG	358
58	98~100	3'	P4976	P5233	GTTAAAGTTCTTGCANNANNCCNATCAGGCCAATACTCATGGAATTA	359
		5'	P4974	P5234	TGAGTATTGGCCTGATNNGNNTTNGCAAGAATTTAAACGGCGTAG	360
59	99~101	3'	P4976	P5235	AAAGTTCTTGACAGANNCCNANNAGCCCAATACTCATGATTATC	361
		5'	P4974	P5236	CCATGAGTATTGGCCTNNTNNGNNTGCTGCAAGAACTTTAAACGGCGTA	362
60	100~102	3'	P4976	P5237	GTTCTTGACAGCAGANNANNCCAACTACTCATGATTATCAAC	363
		5'	P4974	P5238	AATCCATGAGTATTGNNNTNNTNGTCTGCTGCAAGAATTTAAACG	364
61	101~103	3'	P4976	P5239	CTTGACAGCAGCGGANNANNCCNATCCTCATGGATTATCAACGGCA	365
		5'	P4974	P5240	GATAATCCATTGAGTATNNGNNTNNTCCGCTGCTGCAAGAATTT	366
62	102~104	3'	P4976	P5241	GCAGCAGACGGATCANNCCNANNCTCATGGATTATCAACGGCATC	367
		5'	P4974	P5242	TTGATAATCCATGAGNNTNNGNNTGATCCGCTGCTGCAAGAAC	368
63	103~105	3'	P4976	P5243	GCAGCAGGATCAGGCNANNCCNATGGAATTAACAACGGCATCGAAT	369
		5'	P4974	P5244	GCCGTTGATAATCCATNNGNNTNNGCCTGATCCGCTGCTGCAA	370
64	104~106	3'	P4976	P5245	GACGGATCAGGCCAANNCCNANNGATTAACAACGGCATCGAATGG	371
		5'	P4974	P5246	GATGCCGTTGATAATCANNNTNNGNNTGGCCTGATCCGCTGCTG	372
65	105~107	3'	P4976	P5247	GGATCAGGCCAATACNANNNGNNTATCAACGGCATCGAATGGCCAT	373
		5'	P4974	P5248	TTCATGCCGTTGATANNCCNNTNNGTATTGGCCTGATCCGCTG	374

30

40

【 0 5 2 4】

(上記表の続き)

【表16-5】

(上記表の続き)

表11-6:RCL4ライブラリの生成に使用したプライマー一覧

ライブラリ#	BPN' -v3中で変異させた残基	遺伝子断片	共通の隣接するプライマー名	変異原性プライマー名	変異原性プライマー配列	配列番号:
66	106~108	3'	P4976	P5249	TCAGGCCAACTACTCANNNNNNCAACGGCATCGAATGGGCCAT	375
		5'	P4974	P5250	CCATTTCGATGCCGTTGNNAANNNNNGAGTATTGGCCGTGATCGGTC	376
67	107~109	3'	P4976	P5251	GGCCAATACTCATGNNNTNCCNCCGCGCATCGAATGGCCATCGCGAAT	377
		5'	P4974	P5252	GGCCCATTCGATGCCGNNNNANNCATGAGTATTGGCCGTGATCC	378
68	108~110	3'	P4976	P5253	CAATACTCATGGATTNNCCNNCCATCGAATGGGCCATCGCGAA	379
		5'	P4974	P5254	GATGGCCATTTCGATGNNGNNGNNAATCCATGAGTATTGGCCGTGAT	380
69	109~111	3'	P4976	P5255	TACTCATGGATTATCNCNNCCNCGAATGGGCCATCGCGAATAA	381
		5'	P4974	P5256	CGCGATGGCCCATTCGNNNNNGNNGATAATCCATGAGTATTGGCCT	382
70	110~112	3'	P4976	P5257	TCATGGATTACAACNNCCNCCNATGGGCCATCGCGAATAACATG	383
		5'	P4974	P5258	ATTTCGCGATGGCCCATNNNNNGNNGTTGATAATCCATGAGTATTGG	384
71	111~113	3'	P4976	P5259	TGGATTATCAACGGCCNCCNANNNGCCATCGCGAATAACATGGGA	385
		5'	P4974	P5260	GTTATTCGCGATGGCCNNTNNGNNGCCGTTGATAATCCATGAGTAT	386
72	112~114	3'	P4976	P5261	ATTATCAACGGCATCNCNANNCCNCCATCGCGAATAACATGGATGTA	387
		5'	P4974	P5262	CATGTTATTTCGCGATGNNCCNNTNNGATGCGCGTTGATAATCCATGAG	388
73	113~115	3'	P4976	P5263	ATCAACGGCATCGAANNCCNCCGCGAATAACATGGATGTAATCAA	389
		5'	P4974	P5264	ATCCATGTTATTTCGCGNNCCNNTTTCGATGCGCGTTGATAATCCAT	390
74	114~116	3'	P4976	P5265	AACGGCATCGAATGGNNCCNCCNNAATAACATGGATGTAATCAACAT	391
		5'	P4974	P5266	TACATCCATGTAATTCNNGNNCCATTCGATGCGCGTTGATAATC	392
75	115~117	3'	P4976	P5267	GGCATCGAATGGGCCNCCNCCNNAACATGGATGTAATCAACATGAG	393
		5'	P4974	P5268	GATTACATCCATGTTANCCNCCNNGGCCATTCGATGCGCGTTGA	394
76	116~118	3'	P4976	P5269	ATCGAATGGGCCATCNCNCCNCCATGGATGTAATCAACATGAGCCT	395
		5'	P4974	P5270	GTTGATTACATCCATGNNANCCNCCNNGATGGCCATTCGATGCGCG	396
77	117~119	3'	P4976	P5271	GAATGGGCCATCGCGNNTNCCNCCNCCGATGTAATCAACATGAGCCTG	397
		5'	P4974	P5272	CATGTTGATTACATCCNCCNCCNCCGATGGGCCATTTCGATGCG	398
78	118~120	3'	P4976	P5273	TGGGCCATCGCGAATNNCCNCCNNTGATAACATGAGCCTGGGA	399
		5'	P4974	P5274	GCTCATGTTGATTACANNCCNCCNATTCGCGATGGCCATTTCGA	400
79	119~121	3'	P4976	P5275	GCCATCGCGAATAACNNCCNCCNNAATAACATGAGCCTGGGAGCA	401
		5'	P4974	P5276	CAGGCTCATGTTGATTNNCCNCCNNTTTCGCGATGGCCCATTC	402
80	120~122	3'	P4976	P5277	ATCGCGAATAACATGNNNTNCCNCCNCCATGAGCCTGGGAGCAC	403
		5'	P4974	P5278	TCCCAGGCTCATGTTGNNTNCCNCCATGTTATTCGCGATGGCCCAT	404
81	121~123	3'	P4976	P5279	GCGAATAACATGGATTNNANCCNCCATGAGCCTGGGAGCACCAAG	405
		5'	P4974	P5280	TGCTCCAGGCTCATGNNCCNCCNCCATGTTATTCGCGATGGCCATT	406

10

20

【0525】

(上記表の続き)

【表16-6】

(上記表の続き)

表11-6:RCL4ライブラリの生成に使用したプライマー一覧

ライブラリ#	BPN' -v3中で変異させた残基	遺伝子断片	共通の隣接するプライマー名	変異原性プライマー名	変異原性プライマー配列	配列番号:
82	122~124	3'	P4976	P5281	AATAACATGGATGTANNCCNCCNAGCCCTGGGAGCACCAGCGGCA	407
		5'	P4974	P5282	TGGTGCTCCCGAGGCTCNCNCCNCCNNTACATCCATGTTATTTCGCGATG	408
83	123~125	3'	P4976	P5283	AACATGGATGTAATCNCNCCNCCNCCCTGGGAGCACCAGCGGCA	409
		5'	P4974	P5284	GCTTGGTGCTCCCGAGNNCCNCCNCCNCCGATGTAATCCATGTTATTTCGCGA	410
84	124~126	3'	P4976	P5285	ATGGATGTAATCAACNNCCNCCNCCGAGCACCAGCGGCAGTG	411
		5'	P4974	P5286	GCCGCTTGCTGCTCCNCCNCCNCCNCCGATTACATCCATGTTATTTCG	412
85	125~127	3'	P4976	P5287	GATGTAATCAACATGNNCCNCCNCCNAGCACCAGCGGCAGTGCGGCA	413
		5'	P4974	P5288	ACTGCGCTTGGTGCTCNCNCCNCCNCCATGTTGATTACATCCATGTTATT	414
86	126~128	3'	P4976	P5289	GTAATCAACATGAGCNCNCCNCCNCCAGCGGCAGTGCGGCACT	415
		5'	P4974	P5290	CGCACTGCGCCTTGGTNNCCNCCNCCNCCATGTTGATTACATCCATG	416
87	129~131	3'	P4976	P5291	ATGAGCCTGGGAGCANNCCNCCNCCAGTGCGGCACCTTAAAGCAGCA	417
		5'	P4974	P5292	TTTAAAGTGCCGCACTGNNCCNCCNCCNCCGCTCCAGGCTCATGTTGAT	418
88	132~134	3'	P4976	P5293	GGAGCACCAGCGCCNNTNCCNCCNCCNNAAGCAGCAGTTGATAAAG	419
		5'	P4974	P5294	AACTGCTGCTTTAAGTNNCCNCCNCCNCCGCTTGGTGCTCCAGGCT	420
89	133~135	3'	P4976	P5295	GCACCAAGCGGCAGTNNCCNCCNCCNNAAGCAGCAGTTGATAAAGCTG	421
		5'	P4974	P5296	ATCAACTGCTGCTTTANNCCNCCNCCNCCGCGCTTGGTGCTCCCA	422
90	134~136	3'	P4976	P5297	CCAAGCGGCAGTGCGNCCNCCNCCNCCNAGCAGCAGTTGATAAAGCTGTTG	423
		5'	P4974	P5298	TTTATCAACTGCTGCTNNCCNCCNCCNCCGCACTGCGGCTTGGTGCTC	424
91	135~137	3'	P4976	P5299	AGCGGCAGTGCGCCANNCCNCCNCCNCCNAGCAGTTGATAAAGCTGTTGAT	425
		5'	P4974	P5300	AGCTTTATCAACTGCTNNCCNCCNCCNCCGCACTGCGGCTTGGTG	426
92	136~138	3'	P4976	P5301	GGCAGTGCGGCACCTNNCCNCCNCCNCCNAGTTGATAAAGCTGTTGCATCTG	427
		5'	P4974	P5302	AACAGCTTTATCAACTNNCCNCCNCCNCCNNAAGTCCGCACTGCGGCTTG	428
93	137~139	3'	P4976	P5303	AGTGCGGCACCTTAAANNCCNCCNCCNCCNAGCAGCAGTTGATAAAGCTGTTG	429
		5'	P4974	P5304	TGCAACAGCTTTATCANNCCNCCNCCNCCNNAAGTCCGCACTGCGGCTT	430
94	138~140	3'	P4976	P5305	GCGGCACCTTAAAGCANNCCNCCNCCNCCNNAAGCTGTTGCATCTGGTGTC	431
		5'	P4974	P5306	AGATGCAACAGCTTTANNCCNCCNCCNCCNCCNNAAGTCCGCACTGCG	432
95	139~141	3'	P4976	P5307	GCACTTAAAGCAGCANNCCNCCNCCNCCNCCNAGCTGTTGCATCTGGTGCTG	433
		5'	P4974	P5308	ACCAGATGCAACAGCTNNCCNCCNCCNCCNCCNNAAGTCCGCACTGCG	434
96	140~142	3'	P4976	P5309	CTTAAAGCAGCAGTTNNCCNCCNCCNCCNCCNNAAGTCCGCACTGCGCTG	435
		5'	P4974	P5310	GACACCAAGTGCACANNCCNCCNCCNCCNCCNNAAGTCCGCACTGCG	436
97	141~143	3'	P4976	P5311	AAAGCAGCAGTTGATNNCCNCCNCCNCCNCCNNAAGTCCGCACTGCG	437
		5'	P4974	P5312	GACGACACAGGATGCANNCCNCCNCCNCCNCCNNAAGTCCGCACTGCG	438

30

40

【0526】

(上記表の続き)

【表 16 - 7】

(上記表の続き)

表11-6:RCL4ライブラリの生成に使用したプライマー一覧						
ライブラリ#	BPN' -v3中で変異させた残基	遺伝子断片	共通の隣接するプライマー名	変異原性プライマー名	変異原性プライマー配列	配列番号:
98	142~144	3'	P4976	P5313	GCAGCAGTTGATAAANNNTNNATCTGGTGTCTGCTAGTAGC	439
		5'	P4974	P5314	TACGACGACACCAGATNNANNANNNTTATCAACTGCTGCTTTAAGTG	440
99	143~145	3'	P4976	P5315	GCAGTTGATAAAGCTNNNTNNANNNTGGTGTCTGCTAGTAGCGGCA	441
		5'	P4974	P5316	TACTACGACGACACCANNNTNNANNAGCTTTATCAACTGCTGCTTTAA	442
100	144~146	3'	P4976	P5317	GTTGATAAAGCTGTTNNANNNTNTGCTGCTGTAGTAGCGGCAGCT	443
		5'	P4974	P5318	CGCTACTACGACGACANNANNNTNNAACAGCTTTATCAACTGCTGCT	444
101	145~147	3'	P4976	P5319	GATAAAGCTGTTGCANNTNNNTNCGTGTAGTAGCGGCAGCTG	445
		5'	P4974	P5320	TGCCGCTACTACGACGNNANNANNNTGCAACAGCTTTATCAACTGCT	446
102	146~148	3'	P4976	P5321	AAAGCTGTTGCATCTNNNTNCGTAGTAGCGGCAGCTGGGAA	447
		5'	P4974	P5322	AGCTGCCGCTACTACGNNGNANNAGATGCAACAGCTTTATCAACTG	448
103	147~149	3'	P4976	P5323	GCTGTTGCATCTGGTNNCNCCNAGTAGCGGCAGCTGGGAATGA	449
		5'	P4974	P5324	CCCAGCTGCCGCTACTNNGNNGNACCAGATGCAACAGCTTTATCA	450
104	148~150	3'	P4976	P5325	GTTGCATCTGGTGCNCCNANNAGCGGCAGCTGGGAATGAGGGAA	451
		5'	P4974	P5326	ATTCAGCTGCGCGCTNNNTNNGNACACCAGATGCAACAGCTTT	452
105	149~151	3'	P4976	P5327	GCATCTGGTGTCTGCNNANNANNNGGCAGCTGGGAATGAGGGAA	453
		5'	P4974	P5328	CTCATTCCAGCTGCCNNNTNNNGACGACACCAGATGCAACAG	454
106	150~152	3'	P4976	P5329	TCTGGTGTCTGCTANNANNNGNAGCTGGGAATGAGGGAAATC	455
		5'	P4974	P5330	TCCCTCATTCAGCTNNCNNTNACGACGACACCAGATGCAAC	456
107	151~153	3'	P4976	P5331	GGTGTCTGCTAGTANNGNANNNTGGGAATGAGGGAAATCCGGAT	457
		5'	P4974	P5332	TGTTCCCTCATTCANNNTNCCNACTACGACGACACCAGATGCA	458
108	158~160	3'	P4976	P5333	GCTGGGAATGAGGGANNANNCCNNTATCAGTAGTACCGTCGGTTAT	459
		5'	P4974	P5334	GACGGTACTCGATGATNNGNNTNCCCTCATTCAGCTGCCGCTA	460
109	159~161	3'	P4976	P5335	GGGAATGAGGGAAACANNCCNANNATCGAGTACCGTCGGTTATCCA	461
		5'	P4974	P5336	ACCGACGGTACTCGATNNCNNTNCCCTCATTCAGCTGGGAATGA	462
110	160~162	3'	P4976	P5337	AATGAGGGAAATCACCANNANNAGTAGTACCGTCGGTTATCCAGG	463
		5'	P4974	P5338	ATAACCGAGCGTACTCANNNTNNGGATGTTCCCTCATTCAGG	464
111	163~165	3'	P4976	P5339	ACATCCGATCATCGNNNTNCCNCGGTTATCCAGGCAAGTACCCCT	465
		5'	P4974	P5340	CTTGCTGGAATAACCGNNGNANNCGATGATCCGGATGTTCCCT	466
112	164~166	3'	P4976	P5341	TCCGGATCTCAGATNCCNNTTATCCAGGCAAGTACCCCTCA	467
		5'	P4974	P5342	GTAAGTCTGCTGATAANNNGNNGNACTCGATGATCCGGATGTTCC	468
113	167~169	3'	P4976	P5343	TCGAGTACCGTCGGTNNNTNANNCAAGTACCCCTCAGTGATTGCA	469
		5'	P4974	P5344	CACTGAAAGGTACTGNNNTNANNACCAGCGGTACTCGATGATC	470

10

20

【 0 5 2 7】

(上記表の続き)

【表 16 - 8】

(上記表の続き)

表11-6:RCL4ライブラリの生成に使用したプライマー一覧						
ライブラリ#	BPN' -v3中で変異させた残基	遺伝子断片	共通の隣接するプライマー名	変異原性プライマー名	変異原性プライマー配列	配列番号:
114	168~170	3'	P4976	P5345	AGTACCGTCGGTTATNNANNCCNNTACCCCTCAGTGATTGCAGTG	471
		5'	P4974	P5346	AATCACTGAAGGGTACGNNNTNATAACCGACGGTACTCGATGA	472
115	169~171	3'	P4976	P5347	ACCGTCGGTTATCCANNCCNNGNCCCTTCAGTGATTGCAGTGG	473
		5'	P4974	P5348	TGCAATCACTGAAAGGNNCNCNNNTGGATAACCGACGGTACTCGA	474
116	170~172	3'	P4976	P5349	GTCGGTTATCCAGGCNNGNCCNNTTCACTGATTGCACTGGGGCGT	475
		5'	P4974	P5350	CACTGCAATCACTGAANNCCNCCGCTGGATAACCGACGGTAC	476
117	171~173	3'	P4976	P5351	GGTTATCCAGGCAAGNNCCNNTNAGTATTGCACTGGGGCGCTGTA	477
		5'	P4974	P5352	GCCCCTGCAATCACTNNANNCCNNTTGCCTGGATAACCGACGGTA	478
118	172~174	3'	P4976	P5353	TATCCAGGCAAGTACNNNTNANNNGATTGCACTGGGGCGCTGAGA	479
		5'	P4974	P5354	AGCGCCCATGCAATCNCNNNTNANNNTTGCCTGGATAACCGGAC	480
119	182~184	3'	P4976	P5355	GTGGGCGCTGTAGACANNNTNANNNTCAACGTGCCTCTTTTCCCT	481
		5'	P4974	P5356	AAAAGAGGACGCTTGANNTNANNNGTCTACAGCGCCCACTGGAA	482
120	183~185	3'	P4976	P5357	GGCGCTGTAGACTCNCNNNTNACCGTGCCTCTTTTCCCTCGGT	483
		5'	P4974	P5358	GGAAAAAGAGGACGCTNNANNNTNAGAGTCTACAGCGCCCACTG	484
121	184~186	3'	P4976	P5359	GCTGTAGACTCTCANNTNANNNTGCCTCTTTTCCCTCCGTGGGA	485
		5'	P4974	P5360	GGAGGAAAAAGGCANNNTNANNNTGAAGAGTCTACAGCGCCCA	486
122	185~187	3'	P4976	P5361	GTAGACTCTTCAAATNANNNTNCTCTTTTCTCCTCGTGGGAC	487
		5'	P4974	P5362	CACGGAGGAAAAAGANNNTNANNNTTGAAGAGTCTACAGCGCCCA	488
123	186~188	3'	P4976	P5363	GACTCTTCAAATCAANNNTNCCNNTTTTCCCTCCGTGGGACCGGA	489
		5'	P4974	P5364	TCCCACGGAGGAAAAANNNGNANNNTTGAATGGAAGTCTACAGCGCCCA	490
124	192~194	3'	P4976	P5365	GCCTCTTTTCTCCNNGNANNNGGAGCTGGATGTCATGGCCCT	491
		5'	P4974	P5366	CATGACATCAGCTCNCNNNTNCCNNGGAGGAAAAAGAGGCACGTTG	492
125	194~196	3'	P4976	P5367	TTTTCTCCGTGGGANNNGNNGGATGTCATGGCCCTGGCGTT	493
		5'	P4974	P5368	AGGGCCATGACATCCNCCNCCNNTCCACGAGGAAAAAGAGG	494
126	195~197	3'	P4976	P5369	TCTCCGTGGGACCGNNGNNTGTCATGGCCCTGGCGTTTCTATT	495
		5'	P4974	P5370	GCCAGGGCCATGACANNCCNCCGCTCCACGGAGGAAAAAG	496
127	196~198	3'	P4976	P5371	TCCGTGGGACCGGANNNGNNTNCAATGGCCCTGGCGTTTCTATT	497
		5'	P4974	P5372	AACGCCAGGGGCAATGNANNCNCCCTCCGGTCCACGGAGGAAAAA	498
128	197~199	3'	P4976	P5373	GTGGGACCGGAGCTGNNTNCCNCCGCTCCACGGAGGAAAAAG	499
		5'	P4974	P5374	AGAAACGCCAGGGCCNNGNANNCAAGCTCCGGTCCACGGAGGAAAA	500
129	198~200	3'	P4976	P5375	GGACCGGAGCTGGATNCCNCCGCTGGCGTTTCTATTCAATCGA	501
		5'	P4974	P5376	AATAGAAACGCCAGGGNCCNCCGCTCCACGGTCCACGGAA	502

30

40

【 0 5 2 8】

(上記表の続き)

## 【表 16 - 9】

(上記表の続き)

表11-6:RCL4ライブラリの生成に使用したプライマー一覧						
ライブラリ#	BPN' -v3中で 変異させた残基	遺伝子 断片	共通の隣接する プライマー名	変異原性 プライマー名	変異原性プライマー配列	配列番号:
130	203~205	3'	P4976	P5377	GTCAATGGCCCTTGGCCNNTNNTCAATCGACGCTTCCAGGGAA	503
		5'	P4974	P5378	TGGAAGCGTCGATTGANNANNANNNGCCAGGGGCCATGACATCCA	504
131	210~212	3'	P4976	P5379	ATTCATCGACGCTTNNANNNGNCAAGTATGGTGCACAAACGGGA	505
		5'	P4974	P5380	TTGCGCACCACTACTGNNCNNTNNAAGCGTCGATTGAATAGAAACG	506
132	211~213	3'	P4976	P5381	CAATCGACGCTCCANNNGNCCNNGTATGGTGCACAAACGGGACT	507
		5'	P4974	P5382	GTTTTGCGCACCAACACNNGNCCNNTGGAAGCGTCGATTGAATAGAA	508
133	216~218	3'	P4976	P5383	GGGAACAAGTATGGTNNGNANNCCGGGACTTCCATGGCCTCGCCGCAT	509
		5'	P4974	P5384	GGCCATGGAAGTCCCGNNTNNCNACCATACTGTTCCCTGGAAG	510
134	217~219	3'	P4976	P5385	AACAAGTATGGTGCNANNCCNNGACTTCCATGGCCTCGCCGCAT	511
		5'	P4974	P5386	CGAGGCCATGGAAGTCNNGNNTNCCGCCACCACTACTGTTCCCTG	512
135	218~220	3'	P4976	P5387	AAGTATGGTGCACAAANNCCNNGNNTTCCATGGCCTCGCCGCATG	513
		5'	P4974	P5388	CGGCGAGGCCATGGAANNCCNNGNNTTGCACCACTACTGTTCC	514
136	219~221	3'	P4976	P5389	TATGGTGCACAAACNNGNNTNCCATGGCCTCGCCGCATGTAG	515
		5'	P4974	P5390	ATGCGGCGAGGCCATGNANNCCNNGTTTTGCGCACCACTACTGTTTC	516
137	230~232	3'	P4976	P5391	CCGCATGTAGCTGGGNNCCNNTTGAATCTTTCTAAGCACCCGAA	517
		5'	P4974	P5392	CTTAGAAAGAATCAATNNGNCCNCCAGCTACATGCGGCGAGGCCAT	518
138	231~233	3'	P4976	P5393	CATGTAGCTGGGCGNCCNANNNGATTCTTTCTAAGCACCCGAACT	519
		5'	P4974	P5394	GTGCTTAGAAAGAATCNNTNNGNCCGCCAGCTACATGCGGCGAGGCCAT	520
139	232~234	3'	P4976	P5395	GTAGCTGGGCGGCCNANNNGNNTCTTTCTAAGCACCCGAACTG	521
		5'	P4974	P5396	CGGGTGCTTAGAAAGANNCCNNTNNGCCGCCAGCTACATGC	522
140	238~240	3'	P4976	P5397	TTGATTCTTTCTAAGNCCNNGNCCGGAACAACTCAAGTCCGCA	523
		5'	P4974	P5398	TTGAGTGTGTCCAGNCCNNGNCTTAGAAAGAATCAATGCGGC	524
141	240~242	3'	P4976	P5399	CTTTCTAAGCACCCGNNCCNNAACACTCAAGTCCGAGCAGT	525
		5'	P4974	P5400	GCGGACTTGAGTGTNTNCCNNGGCGTCTTAGAAAGAATCAAT	526
142	246~248	3'	P4976	P5401	TGGACAAACACTCAANNCCNCCAGTTTAGAAACACCACACTACAAAA	527
		5'	P4974	P5402	GGTGTCTTCTAAACTGNNGNCCNNTTGAAGTGTGTGTCAGTTCGGGT	528
143	255~257	3'	P4976	P5403	TTAGAAACACCCTNANNANNNTGGTATTCTTCTACTATGGAAA	529
		5'	P4974	P5404	GTAGAAAGAATCACCANNNTNNAAGTGGTGTCTTCTAAACTGCTG	530
144	258~260	3'	P4976	P5405	ACCACTAGAAAACCTTNNNTNNTTCTACTATGGAAAAGGGCTGA	531
		5'	P4974	P5406	TTTTCCATAGTAGAAANNANNANNAAGTTTTGTAGTGGTGTCTTCTAA	532
145	265~267	3'	P4976	P5407	GATCTTTCTACTATNANNANNNGCTGATCAACGTACAGGCGGCA	533
		5'	P4974	P5408	CTGTACGTTGATCAGCANNNTNNTNATAGTAGAAAGAATCACCAGTTT	534

10

20

## 【0529】

(上記表の続き)

## RCL5 変異体

「RCL5」は、親(テンプレート)分子として数個のBPN'変異体を用いて融合PCRにより生成した1組のコンビナトリアル変異体を指す。各親プラスミドに導入した変異を表11-7に示し、変異体を生成するのに使用した変異原性プライマーを表11-8に示す。

30

【表 17 - 1】

表11-7:親プラスミド及びRCL5変異体中に導入した変異一覧		
コンビナトリアル 変異体#	親プラスミド	導入した変異
1	G97A-G128A-Y217Q-T22N-S24A	N61P-N62S
2	G97A-G128A-Y217Q-T22N-S24A	T55P
3	G97A-G128A-Y217Q-T22N-S24A	N61P-S63H
4	G97A-G128A-Y217Q-T22N-S24A	Q59S-N61P
5	G97A-G128A-Y217Q-T22N-S24A	L75S-N76Y
6	G97A-G128A-Y217Q-T22N-S24A	P86S-S87G-A88V
7	G97A-G128A-Y217Q-T22N-S24A	S87G-A88V-S89A
8	G97A-G128A-Y217Q-T22N-S24A	S87T-A88L-S89G
9	G97A-G128A-Y217Q-T22N-S24A	P129Q-S130G-G131S
10	G97A-G128A-Y217Q-T22N-S24A	V203Y
11	G97A-G128A-Y217Q-T22N-S24A	G211R-N212S-K213V
12	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G	N61P-N62S
13	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G	T55P
14	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G	N61P-S63H
15	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G	Q59S-N61P
16	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G	L75S-N76Y
17	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G	P86S-S87G-A88V
18	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G	S87G-A88V-S89A
19	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G	S87T-A88L-S89G
20	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G	P129Q-S130G-G131S
21	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G	V203Y
22	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G	G211R-N212S-K213V
23	G97A-G128A-Y217Q-S24R	N61P-N62S
24	G97A-G128A-Y217Q-S24R	T55P
25	G97A-G128A-Y217Q-S24R	N61P-S63H
26	G97A-G128A-Y217Q-S24R	Q59S-N61P
27	G97A-G128A-Y217Q-S24R	L75S-N76Y
28	G97A-G128A-Y217Q-S24R	P86S-S87G-A88V
29	G97A-G128A-Y217Q-S24R	S87G-A88V-S89A
30	G97A-G128A-Y217Q-S24R	S87T-A88L-S89G
31	G97A-G128A-Y217Q-S24R	P129Q-S130G-G131S

10

20

30

## 【表 17 - 2】

(上記表の続き)

表11-7:親プラスミド及びRCL5変異体中に導入した変異一覧		
コンビナトリアル 変異体#	親プラスミド	導入した変異
32	G97A-G128A-Y217Q-S24R	V203Y
33	G97A-G128A-Y217Q-S24R	G211R-N212S-K213V
34	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G	N61P-N62S
35	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G	T55P
36	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G	N61P-S63H
37	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G	Q59S-N61P
38	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G	L75S-N76Y
39	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G	P86S-S87G-A88V
40	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G	S87G-A88V-S89A
41	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G	S87T-A88L-S89G
42	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G	P129Q-S130G-G131S
43	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G	V203Y
44	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G	G211R-N212S-K213V
45	G97A-G128A-Y217Q-N61P-N62S	L75S-N76Y
46	G97A-G128A-Y217Q-N61P-N62S	P86S-S87G-A88V
47	G97A-G128A-Y217Q-N61P-N62S	S87G-A88V-S89A
48	G97A-G128A-Y217Q-N61P-N62S	S87T-A88L-S89G
49	G97A-G128A-Y217Q-N61P-N62S	P129Q-S130G-G131S
50	G97A-G128A-Y217Q-N61P-N62S	V203Y
51	G97A-G128A-Y217Q-N61P-N62S	G211R-N212S-K213V
52	G97A-G128A-Y217Q-T55P	L75S-N76Y
53	G97A-G128A-Y217Q-T55P	P86S-S87G-A88V
54	G97A-G128A-Y217Q-T55P	S87G-A88V-S89A
55	G97A-G128A-Y217Q-T55P	S87T-A88L-S89G
56	G97A-G128A-Y217Q-T55P	P129Q-S130G-G131S
57	G97A-G128A-Y217Q-T55P	V203Y
58	G97A-G128A-Y217Q-T55P	G211R-N212S-K213V
59	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H	L75S-N76Y
60	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H	P86S-S87G-A88V
61	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H	S87G-A88V-S89A

10

20

30

## 【 0 5 3 0 】

(上記表の続き)



## 【表 17 - 3】

(上記表の続き)

表11-7:親プラスミド及びRCL5変異体中に導入した変異一覧		
コンビナトリアル 変異体#	親プラスミド	導入した変異
62	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H	S87T-A88L-S89G
63	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H	P129Q-S130G-G131S
64	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H	V203Y
65	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H	G211R-N212S-K213V
66	G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P	L75S-N76Y
67	G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P	P86S-S87G-A88V
68	G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P	S87G-A88V-S89A
69	G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P	S87T-A88L-S89G
70	G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P	P129Q-S130G-G131S
71	G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P	V203Y
72	G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P	G211R-N212S-K213V
73	G97A-G128A-Y217Q-L75S-N76Y	P86S-S87G-A88V
74	G97A-G128A-Y217Q-L75S-N76Y	S87G-A88V-S89A
75	G97A-G128A-Y217Q-L75S-N76Y	S87T-A88L-S89G
76	G97A-G128A-Y217Q-L75S-N76Y	P129Q-S130G-G131S
77	G97A-G128A-Y217Q-L75S-N76Y	V203Y
78	G97A-G128A-Y217Q-L75S-N76Y	G211R-N212S-K213V
79	G97A-G128A-Y217Q-P86S-S87G-A88V	P129Q-S130G-G131S
80	G97A-G128A-Y217Q-P86S-S87G-A88V	V203Y
81	G97A-G128A-Y217Q-P86S-S87G-A88V	G211R-N212S-K213V
82	G97A-G128A-Y217Q-S87G-A88V-S89A	P129Q-S130G-G131S
83	G97A-G128A-Y217Q-S87G-A88V-S89A	V203Y
84	G97A-G128A-Y217Q-S87G-A88V-S89A	G211R-N212S-K213V
85	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G	P129Q-S130G-G131S
86	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G	V203Y
87	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G	G211R-N212S-K213V
88	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S	V203Y
89	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S	G211R-N212S-K213V
90	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	G211R-N212S-K213V

10

20

30

## 【 0 5 3 1 】

(上記表の続き)

【表 18】

表11-8: RCL5コンビナトリアル変異体を生成するために使用したプライマー					
導入した変異	遺伝子断片	共通の3'及び5'側の遺伝子に隣接するプライマー名	プライマー名	プライマー配列	配列番号:
T22N-S24A	3'	P4976	P5432	TC AAGGCTACAATGGAGCAAATGTTAAAGTAGCGGTTATCGA	535
	5'	P4974	P5433	TTTAAACATTTGCTCCATTGTAGCCTTGAGAGTGCAGAG	536
S24G-N25G	3'	P4976	P5434	CTACACTGGAGGAGGTGTTAAAGTAGCGGTTATCGACA	537
	5'	P4974	P5435	CTACTTTAACACCTCCTCCAGTGTAGCCTTGAGAGTG	538
S24R	3'	P4976	P5436	AGGCTACACTGGAAGAAATGTTAAAGTAGCGGTTATCGAC	539
	5'	P4974	P5437	CTTTAAACATTTCTCCAGTGTAGCCTTGAGAGTG	540
G23A-S24G-N25G	3'	P4976	P5438	AAGGCTACACTGCAGGAGGTGTTAAAGTAGCGGTTATCGACA	541
	5'	P4974	P5439	CTACTTTAACACCTCCTGCAGTGTAGCCTTGAGAGTGCAG	542
N61P-N62S	3'	P4976	P5440	CGTTTCAAGATCCCTCTTCTCATGGCACACACGTCGC	543
	5'	P4974	P5441	TGTGCCATGAGAAGAGGGATCTTGAACGGGTTTGTTCG	544
T55P	3'	P4976	P5442	TGCCGTCGGAACCAACCCGTTTCAAGATAACAATTCT	545
	5'	P4974	P5443	TCTTGAACGGGTTTGGTTCGGACGCGCACCATAGAAAG	546
N61P-S63H	3'	P4976	P5444	CCGTTTCAAGATCCCAATCATGATGGCACACACGTCGCG	547
	5'	P4974	P5445	TGTGTGCCATGATGATTGGATCTTGAACGGGTTTGTTCG	548
Q59S-N61P	3'	P4976	P5446	ACAAACCCGTTTTCAGATCCCAATTCTCATGGCACACACGTCGCA	549
	5'	P4974	P5447	CCATGAGAATTGGGATCTGAAAACGGGTTTGTTCGGACGGCA	550
L75S-N76Y	3'	P4976	P5448	GGTTGCGGCGTCATACAATTCTATTGGCGTGTGGTG	551
	5'	P4974	P5449	GCCAATAGAAATTGTATGACGCGCAACCGTTCCTGCGA	552
P86S-S87G-A88V	3'	P4976	P5450	TGGTGTAGCCTCGGGTGTTCGCTCTACGCGTTAAAGTT	553
	5'	P4974	P5451	CGTAGAGCGAAACACCCGAGGCTACACCAAGCACGCCAA	554
S87G-A88V-S89A	3'	P4976	P5452	GTGTAGCCCGGGTGTTCACCTCTACGCGCTTAAAGTTCTTG	555
	5'	P4974	P5453	ACGGCGTAGAGTGCAACACCCGGGGTACACCAAGCACGCCAA	556
S87T-A88L-S89G	3'	P4976	P5454	TGGTGTAGCCCGACTCTTGACTCTACGCGTTAAAGTTCTTG	557
	5'	P4974	P5455	ACGGCGTAGAGTCCAAGAGTGGGGTACACCAAGCACGCCAA	558
P129Q-S130G-G131S	3'	P4976	P5456	GCCTGGGAGCACAAAGGCTCTAGTGGCGACTTAAAGCAGCA	559
	5'	P4974	P5457	AGTGGCGACTAGACCTTGTGCTCCAGGCTCATGTTGAT	560
V203Y	3'	P4976	P5458	ATGGCCCTGGCTATTCTATTCAATCGACGCTTCCAG	561
	5'	P4974	P5459	TCGATTGAATAGAATAGCCAGGGGCCATGACATCCA	562
G211R-N212S-K213V	3'	P4976	P5460	TCGACGCTTCCAAGGTCCTGTATGGTGGCGCAAAACGGGACT	563
	5'	P4974	P5461	TTGCGCACCATACCGGACCTTGAAGCGTCGATTGAATAGAAA	564

## 【 0 5 3 2 】

各変異体を生成するために、共通の3'側の遺伝子に隣接するプライマー（P4976、CCTCTCGGTTATGAGTTAGTTC、配列番号61）及び変異原性プライマー、あるいは共通の5'側の遺伝子に隣接するプライマー（P4974、GCCCTCACATTTGTGCCACCTA、配列番号60）及び表11-8で各ライブラリについて示される変異原性プライマーを用いて、2種類のPCR反応を実施した。これらのPCR反応は、2種のPCR断片を生成した。一方はBPN'変異遺伝子の5'側半分（5'遺伝子断片）をコードするものであり、他方はBPN'変異遺伝子の3'側半分（3'遺伝子断片）をコードするものである。各PCR増幅反応には、30pmolの各プライマー及び表11-7に列挙した100ngの親分子を含有させた。増幅はVent DNAポリメラーゼ（NEB）を用いて実施した。PCR反応（20μL）は、まず始めに95で2.5分加熱した後、続いて94で15秒の変性、55で15秒のアニーリング、及び72で40秒の伸長を30サイクル行った。増幅させた後、5'及び3'遺伝子断片を、QIAGEN（登録商標）ゲルバンド精製用キットによりゲル精製し、混合して（各断片につき50ng）、プライマーP4973（AAAGGATCCCTAATCGGCGCTTTTC、配列番号62）及びP4950（CTTGTCTCCAAGCTTAATAATAAAA、配列番号63）を用いて再度PCRで増幅させて、完全長の遺伝子断片を生成した。伸長工程を72で2分にわたって実施したことを除き、PCR条件は上記の条件と同様のものではあった。完全長のDNA断片をQIAGEN（登録商標）ゲルバンド精製用キットによりゲル精製し、制限酵素BamHI及びHindIIIで消化し、同様の制限酵素で消化したpHPLT-BPN'partial optでライゲーションした。Illustra TempliPhiキットでローリング・サークル型増幅法を用い、ライゲーション混合物を製造元（GE Healthcare）からの取扱説明書に従って増幅させることで、枯草菌（Bacillus subtilis）に形質転換させるための多量体DNAを生成した。この目的のため、1μLのライゲーション混合物と5μLのサンプル緩衝液を混合し、95で3分間加熱し、水中で冷却した。次に、5μLの反応緩衝液及び0.2μLの酵素を各チューブに加え、続いて30で10時間にわたってインキ

10

20

30

40

50

キュベートした。ローリング・サークル型増幅産物を100倍希釈し、枯草菌 (*B. subtilis*) 細胞の形質転換に用いた ( *aprE*, *nprE*, *amyE* : : *xyLRPxyLAcomK-phleo* )。形質転換混合物のアリコートをし、1.6%のスキムミルク及び10 µg/mLのネオマイシンを含有しているLBプレートに蒔き、37 °Cで一晩インキュベートした。続いて、ハローを生じたコロニーを、10 µg/mLのネオマイシンを含有している120 µLのLB培地に接種した。

#### 【0533】

##### RCL6コンビナトリアルライブラリ

「RCL6」は、親(テンプレート)分子として数個のBPN'変異体を用いて融合PCRにより生成した一群のコンビナトリアルライブラリを指す。これらの各ライブラリの構築に、BPN'変異体の混合物をテンプレート(親分子)として使用した。これらのライブラリを生成するために使用した親分子の5つの異なる混合物を表11-9に提供し、各ライブラリに導入した変異を表11-10に列挙する。

#### 【0534】

各変異体を生成するために、共通の3'側の遺伝子に隣接するプライマー(P4976、CCTCTCGGTTATGAGTTAGTTC、配列番号61)及び変異原性プライマー、あるいは共通の5'側の遺伝子に隣接するプライマー(P4974、GCCTCACATTTGTGCCACCTA、配列番号60)及び表11-10で各ライブラリについて示される変異原性プライマーを用いて、2種類のPCR反応を実施した。これらのPCR反応は、2種のPCR断片を生成した。一方はBPN'変異遺伝子の5'側半分(5'遺伝子断片)をコードするものであり、他方はBPN'変異遺伝子の3'側半分(3'遺伝子断片)をコードするものである。各PCR増幅反応には、30 pmolの各プライマー及び表11-9に列挙した100 ngの親分子を含有させた。増幅はVent DNAポリメラーゼ(NEB)を用いて実施した。PCR反応(20 µL)は、まず始めに95 °Cで2.5分加熱した後、続いて94 °Cで15秒の変性、55 °Cで15秒のアニーリング、及び72 °Cで40秒の伸長を30サイクル行った。増幅させた後、5'及び3'遺伝子断片を、QIAGEN(登録商標)ゲルバンド精製用キットによりゲル精製し、混合して(各断片につき50 ng)、プライマーP4973(AAAGGATCCTAATCGGCGCTTTTC、配列番号62)及びP4950(CTTGTCCTCCAAGCTTAAAATAAAA、配列番号63)を用いて再度PCRで増幅させて、完全長の遺伝子断片を生成した。伸長工程を72 °Cで2分にわたって実施したことを除き、PCR条件は上記の条件と同様のものではなかった。完全長のDNA断片をQIAGEN(登録商標)ゲルバンド精製用キットによりゲル精製し、制限酵素BamHI及びHindIIIを用いて消化し、同様の制限酵素で消化したpHPLT-BPN'partial optベクターとライゲーションさせた。Illustra TempliPhiキットでローリング・サークル型増幅法を用い、ライゲーション混合物を製造元(GE Healthcare)からの取扱説明書に従って増幅させることで、枯草菌(*Bacillus subtilis*)に形質転換させるための多量体DNAを生成した。この目的のため、1 µLのライゲーション混合物と5 µLのサンプル緩衝液を混合し、95 °Cで3分間加熱し、氷中で冷却した。次に、5 µLの反応緩衝液及び0.2 µLの酵素を各チューブに加え、続いて30 °Cで10時間わたってインキュベートした。ローリング・サークル型増幅産物を100倍希釈し、枯草菌(*B. subtilis*)細胞の形質転換に用いた( *aprE*, *nprE*, *amyE* : : *xyLRPxyLAcomK-phleo* )。形質転換混合物のアリコートをし、1.6%のスキムミルク及び10 µg/mLのネオマイシンを含有しているLBプレートに蒔き、37 °Cで一晩インキュベートした。続いて、ハローを生じたコロニーを、10 µg/mLのネオマイシンを含有している120 µLのLB培地に接種した。

【表 19】

表11-9:RCL6ライブラリを生成するために使用したBPN'の親分子				
親分子の混合物				
混合物1	混合物2	混合物3	混合物4	混合物5
G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G	G97A-G128A-Y217Q-T55P	G97A-G128A-Y217Q-L75S-N76Y	G97A-G128A-Y217Q-P86S-S87G-A88V	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S
G97A-G128A-Y217Q-S24R	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H		G97A-G128A-Y217Q-S87G-A88V-S89A	
G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G	G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P		G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G	

10

【表 20 - 1】

表11-10:RCL6ライブラリに導入した変異					
導入した変異	遺伝子断片	共通の5'及び3'側の遺伝子に隣接するプライマー名	変異原性プライマー名	変異原性プライマー配列	配列番号:
V68C, A69G	3'	P4976	P5462	CATGGCACACACTGCGGAGGAACGGTTGCGGGCTTAAAC	565
	5'	P4974	P5463	GCAACCGTTCCCTCCGCAGTGTGTGCCATGAGAATTGTTA	566
V72L, A73G, delA74, L75S	3'	P4976	P5464	GTCGCAGGAACGATTGGTTCAAACAATTCTATTGGCGTGCTTG	567
	5'	P4974	P5465	CAATAGAATTGTTTGAACCAATCGTTCTGCGACGTGTGTGCCAT	568
L75H, N76G	3'	P4976	P5466	AACGGTTGCGGGCGCATGAAAATTCTATTGGCGTCTTGGTG	569
	5'	P4974	P5467	CAATAGAATTCCATGCGCCGCAACCGTTCCCTGCGACGTGT	570
L75R, N76G, N77S	3'	P4976	P5468	AACGGTTGCGGGCGAGAGGAGTTCTATTGGCGTCTTGGTGTA	571
	5'	P4974	P5469	CACGCCAATAGAACCCTCCTCTCGCCGCAACCGTTCCCTGCGACGTGT	572
L75G, N76G, N77G	3'	P4976	P5470	AACGGTTGCGGGCGGAGGCGTTCTATTGGCGTCTTGGTGTA	573
	5'	P4974	P5471	CACGCCAATAGAACCCTCCTCGCCGCAACCGTTCCCTGCGACGTGT	574
A92G	3'	P4976	P5472	TGCTTCGCTCTACGGCGTTAAAGTTCTTGCAGCAGAC	575
	5'	P4974	P5473	CAAGAACTTTAACGCCGTAGAGCGAAGCAGACGCGGGCTA	576
delV93, K94S, V95C, L96S	3'	P4976	P5474	TTCCGCTCTACGCCCTCATGTTCTGCGAGCAGCGGATCAGGCCAA	577
	5'	P4974	P5475	ATCCGCTCTGCTGCAAGACATGAGCGGTAGAGCGAAGCAGACG	578
V121I, I122S, N123C	3'	P4976	P5476	AATAACATGGATATATCTTGCATGAGCCTGGGAGCACCAAG	579
	5'	P4974	P5477	CAGGCTCATGCAAGATATATCCATGTTATTCGCGATGCGCCATT	580
V121L, N123C	3'	P4976	P5478	CGAATAACATGGATCTTATCTGCATGAGCCTGGGAGCACCAAG	581
	5'	P4974	P5479	CCAGGCTCATGCAGATAAAGATCCATGTTATTCGCGATGGCCATT	582
I122C, N123S, M124L	3'	P4976	P5480	TAACATGGATGTATGCTCATTGAGCCTGGGAGCACCAAGCGGCA	583
	5'	P4974	P5481	TGCTCCAGGCTCAATGAGCATACATCCATGTTATTCGCGATG	584
N123C	3'	P4976	P5482	ACATGGATGTAATCTGCATGAGCCTGGGAGCACCAAG	585
	5'	P4974	P5483	TCCCAGGCTCATGCAGATTACATCCATGTTATTCGCGAT	586
M124I	3'	P4976	P5484	GGATGTAATCAACATCAGCCTGGGAGCACCAAGCGGCA	587
	5'	P4974	P5485	TGCTCCAGGCTGATGTTGATTACATCCATGTTATTCG	588
M124V	3'	P4976	P5486	GGATGTAATCAACGTAAAGCCTGGGAGCACCAAGCGGCA	589
	5'	P4974	P5487	TGCTCCAGGCTTACGTTGATTACATCCATGTTATTCG	590
M124V-L126A	3'	P4976	P5488	GGATGTAATCAACGTAAAGCCTGGGAGCACCAAGCGGCAAGT	591
	5'	P4974	P5489	TTGGTGCTCCCGCGCTTACGTTGATTACATCCATGTTATTCG	592
L126F, delP129	3'	P4976	P5490	AATCAACATGAGCTTCGGAGCAAGCGGCAAGTGGGCACTTAA	593
	5'	P4974	P5491	CACTGCGCTTGCTCCGAAGCTCATGTTGATTACATCCATGT	594
G127Y	3'	P4976	P5492	AACATGAGCCTGTACGCCAAGCGGCAAGTGGGCACTTAA	595
	5'	P4974	P5493	CACTGCGCTTGCTGCGTACAGGCTCATGTTGATTACATCC	596
G127S, P129D	3'	P4976	P5494	CAACATGAGCCTGTGAGCAGATAGCGGCAAGTGGGCACTTAAA	597
	5'	P4974	P5495	GCACTGCGCTATCTGCTGACAGGCTCATGTTGATTACATCC	598
G127N, P129R	3'	P4976	P5496	CAACATGAGCCTGAACGCACGTAGCGGCAAGTGGGCACTTAAA	599
	5'	P4974	P5497	GCACTGCGCTACGTGCGTTCAGGCTCATGTTGATTACATCC	600

20

30

【表 20 - 2】

(上記表の続き)

表11-10:RCL6ライブラリに導入した変異

導入した変異	遺伝子断片	共通の5'及び3'側の 遺伝子に隣接する プライマー名	変異原性 ライマー名	変異原性プライマー配列	配列番号:
G128N, insS, P129S	3'	P4976	P5498	ATGAGCCTGGGAAATTCATCTAGCGGCAGTGCGGCACCTTAAA	601
	5'	P4974	P5499	GCACTGCCGCTAGATGAATTTCCCAGGCTCATGTTGATTAC	602
G128S_P129V	3'	P4976	P5500	CATGAGCCTGGGATCAGTTAGCGGCAGTGCGGCACCTAAA	603
	5'	P4974	P5501	GCACTGCCGCTAACTGATCCAGGCTCATGTTGATTAC	604
G128S, P129D	3'	P4976	P5502	CATGAGCCTGGGATCAGATAGCGGCAGTGCGGCACCTAAA	605
	5'	P4974	P5503	GCACTGCCGCTATCTGATCCAGGCTCATGTTGATTAC	606
G128S, P129G	3'	P4976	P5504	CATGAGCCTGGGATCAGGATAGCGGCAGTGCGGCACCTAAA	607
	5'	P4974	P5505	GCACTGCCGCTACCTGATCCAGGCTCATGTTGATTAC	608
H128H, P129Y	3'	P4976	P5506	CATGAGCCTGGGACACTATAGCGGCAGTGCGGCACCTAAA	609
	5'	P4974	P5507	GCACTGCCGCTATAGTGTCCCAGGCTCATGTTGATTAC	610
P129D	3'	P4976	P5508	GAGCCTGGGAGCAGACAGCGGCAGTGCGGCACCTAA	611
	5'	P4974	P5509	TGCCGCACTGCCGCTGCTGCTCTCCCAGGCTCATGTTGAT	612
P129E	3'	P4976	P5510	GAGCCTGGGAGCAGAAAGCGGCAGTGCGGCACCTAA	613
	5'	P4974	P5511	TGCCGCACTGCCGCTTTCTGCTCCCAGGCTCATGTTGAT	614
P129V	3'	P4976	P5512	GAGCCTGGGAGCAGTAAGCGGCAGTGCGGCACCTAA	615
	5'	P4974	P5513	TGCCGCACTGCCGCTTACTGCTCCCAGGCTCATGTTGAT	616
P129G, delS130	3'	P4976	P5514	GAGCCTGGGAGCAGGAGGCAGTGCGGCACCTAAAGC	617
	5'	P4974	P5515	AGTGCCGCACTGCTCTGCTCCCAGGCTCATGTTGAT	618
P129H, delS130, S132N	3'	P4976	P5516	AGCCTGGGAGCACAGGCAATGCGGCACCTAAAGCAGCAGTT	619
	5'	P4974	P5517	TTTAAAGTCCGCACTTCCGCTGTGCTCCCAGGCTCATGTTGAT	620
A134T	3'	P4976	P5518	AAGCGGCAGTGCGGACACTTAAAGCAGCAGTTGATAAAG	621
	5'	P4974	P5519	AACTGCTGCTTTAAGTGTGCGCACTGCCGCTTTGGTGCTC	622
G97R, insG, A98C	3'	P4976	P5520	GTTAAAGTTCCTCGTGGTGTGACGGATCAGGCCAATACTC	623
	5'	P4974	P5521	CTGATCCGTCACAACCACGAAGAACTTTAAACGGCTAGAGC	624
A98G, D99G	3'	P4976	P5522	TTAAAGTTCCTTGCAAGGAGGCGGATCAGGCCAATACTCATG	625
	5'	P4974	P5523	TATTGGCCTGATCCGCTCCTGCAAGAACTTTAACGGCGTAG	626
A98G, insR	3'	P4976	P5524	TTAAAGTTCCTTGCAAGGACGTGACGGATCAGGCCAATACTCA	627
	5'	P4974	P5525	CTGATCCGTCACGTCCTGCAAGAACTTTAACGGCGTAG	628
A98D, D99G	3'	P4976	P5526	TTAAAGTTCCTTGCAAGGAGGCGGATCAGGCCAATACTCATG	629
	5'	P4974	P5527	TATTGGCCTGATCCGCTCCTGCAAGAACTTTAACGGCGTAG	630
A98H, D99G, G100D	3'	P4976	P5528	TAAAGTTCCTTGCAACATGGAGATTGAGGCCAATACTCATGATTAT	631
	5'	P4974	P5529	AGTATTGGCCTGAATCTCCATGTGCAAGAACTTTAACGGCGTAG	632

10

20

【0535】

(上記表の続き)

【表 20 - 3】

(上記表の続き)

表11-10:RCL6ライブラリに導入した変異

導入した変異	遺伝子断片	共通の5'及び3'側の 遺伝子に隣接する プライマー名	変異原性 ライマー名	変異原性プライマー配列	配列番号:
D99R, insN	3'	P4976	P5530	AAGTTCCTTGCAAGCAGTAAACGGATCAGGCCAATACTCATG	633
	5'	P4974	P5531	TATTGGCCTGATCCGTTACGCTGCTGCAAGAACTTTAACGGCGTA	634
D99V, S101D	3'	P4976	P5532	AGTTCCTTGCAAGCAGTAAAGGATGGCCAACTCATGGATTATCAA	635
	5'	P4974	P5533	TGAGTATTGGCCATCTGCTACTGCTGCAAGAACTTTAACGGCGTA	636
D99C, insS	3'	P4976	P5534	TTAAAGTTCCTTGCAAGCAGTAAACGGATCAGGCCAATACTCATG	637
	5'	P4974	P5535	TATTGGCCTGATCCGCTACATGCTGCAAGAACTTTAACGGCGTA	638
G100S	3'	P4976	P5536	AAGTTCCTTGCAAGCAGACTCTTCCAGGCCAATACTCATGGATTAT	639
	5'	P4974	P5537	ATGAGTATTGGCCTGCAAGAAGTCTGCTGCAAGAACTTTAACG	640
G100S, S101V	3'	P4976	P5538	TTCTTGCAAGCAGACTCTGTAGGCCAATACTCATGGATTATCAA	641
	5'	P4974	P5539	CATGAGTATTGGCCATCAGAGTCTGCTGCAAGAACTTTAACG	642
G100D	3'	P4976	P5540	AAGTTCCTTGCAAGCAGACTTCCAGGCCAATACTCATGGATTAT	643
	5'	P4974	P5541	ATGAGTATTGGCCTGAATCGTCTGCTGCAAGAACTTTAACG	644
G100N	3'	P4976	P5542	AAGTTCCTTGCAAGCAGCAATCCAGGCCAATACTCATGGATTAT	645
	5'	P4974	P5543	ATGAGTATTGGCCTGAAATGCTGCTGCAAGAACTTTAACG	646
S100N, S101L	3'	P4976	P5544	TTCTTGCAAGCAGCAATCTAGGCCAATACTCATGGATTATCAA	647
	5'	P4974	P5545	CATGAGTATTGGCCATGATGCTGCTGCAAGAACTTTAACG	648
S101G	3'	P4976	P5546	TTCTTGCAAGCAGAGGAGGAGGCCAATACTCATGGATTATCAA	649
	5'	P4974	P5547	ATGAGTATTGGCCTCCTCCGCTGCTGCAAGAACTTTAACG	650
S101D	3'	P4976	P5548	TTCTTGCAAGCAGAGAGGATGGCCAATACTCATGGATTATCAA	651
	5'	P4974	P5549	ATGAGTATTGGCCATCTCCGCTGCTGCAAGAACTTTAACG	652
S101V, Q103N	3'	P4976	P5550	TGCAAGCAGGAGTAGGCCAATACTCATGGATTATGAAACGGCAT	653
	5'	P4974	P5551	ATAATCCATGAGTAGTTCGCTACTCCGCTGCTGCAAGAACTTTAACG	654
S101E	3'	P4976	P5552	TTCTTGCAAGCAGAGGAGGAGGCCAATACTCATGGATTATCAA	655
	5'	P4974	P5553	ATGAGTATTGGCCACGCTCCGCTGCTGCAAGAACTTTAACG	656
A116S, N117G, N118R	3'	P4976	P5554	AATGGGCCATCTCTGGTGAATGGATGTAATCAACATGAGCCT	657
	5'	P4974	P5555	GATTACATCCATCTCAGAGATGGCCCATTCGATGCGCTT	658
A116G, N117R	3'	P4976	P5556	AATGGGCCATCGGACGTAACATGGATGTAATCAACATGAG	659
	5'	P4974	P5557	GATTACATCCATGTTACGTCGATGGCCCATTCGATGCGCTT	660
A116N, N117S, N118G	3'	P4976	P5558	AATGGGCCATCAATCTGGAATGGATGTAATCAACATGAGCCT	661
	5'	P4974	P5559	GATTACATCCATTCAGAAATGATGGCCCATTCGATGCGCTT	662
M222Q	3'	P4976	P5560	AAAACGGGACTTCCCAGGCCCTCGCCGCTGTAGCTG	663
	5'	P4974	P5561	TACATGCGCGAGGCGCTGGGAAAGTCCGCTTTTGCAGC	664

30

40

【0536】

(上記表の続き)

【表 20 - 4】

(上記表の続き)

表11-10:RCL6ライブラリに導入した変異

導入した変異	遺伝子断片	共通の5'及び3'側の 遺伝子に隣接する プライマー名	変異原性 ライマー名	変異原性プライマー配列	配列番号:
S24R	3'	P4976	P5562	AAGGCTACACTGGAAGAATGTTAAAGTAGCGGTTATCGA	665
	5'	P4974	P5563	CTACTTTAACATTTCTCCAGTGTAGCCTTGAGAGTG	666
N25Y	3'	P4976	P5564	CTACACTGGATCATATGTTAAAGTAGCGGTTATCGACA	667
	5'	P4974	P5565	TAACCGCTACTTTAACATATGATCCAGTGTAGCCTTGAGA	668
P52D	3'	P4976	P5566	CTTCTATGGTGGATCCGAAACAAACCCGTTTCAAG	669
	5'	P4974	P5567	GGTTTGTTCGGAATCCACCATAGAAGCCCTCCAG	670
S63T	3'	P4976	P5568	TTCAAGATAACAATACACATGGCACACACGTCGCAGGA	671
	5'	P4974	P5569	TGTGTGCCATGTGTTATTGTTATCTTGAACGGGTTTGT	672
N61E	3'	P4976	P5570	GTTTCAAGATGAAAATTCATGGCACACACGTC	673
	5'	P4974	P5571	TGTGCCATGAGAAATTTTCATCTTGAACGGGTTTGTTCG	674
N61P	3'	P4976	P5572	AACCGGTTTCAAGATCCAAATTCATGGCACACACGTC	675
	5'	P4974	P5573	TGCCATGAGAAATTTGGATCTTGAACGGGTTTGTTCG	676
N62Q	3'	P4976	P5574	GTTTCAAGATAACCAATTCATGGCACACACGTCGCAGGAA	677
	5'	P4974	P5575	TGTGTGCCATGAGATTGGTTATCTTGAACGGGTTTGT	678
N62D	3'	P4976	P5576	GTTTCAAGATAACGATTCTCATGGCACACACGTCGCAGGAA	679
	5'	P4974	P5577	TGTGTGCCATGAGAAATCGTTATCTTGAACGGGTTTGT	680
S63Q	3'	P4976	P5578	TCAAGATAACAATCAACATGGCACACACGTCGCAGG	681
	5'	P4974	P5579	ACGTGTGTGCCATGTTGATTGTTATCTTGAACGGGTTT	682
V68A	3'	P4976	P5580	TCATGGCACACACGCGAGCAGGAAAGGTTGCGCGGTTAA	683
	5'	P4974	P5581	CAACCGTTCTGCTGCGTGTGTGCCATGAGAAATTTGTA	684
S87D	3'	P4976	P5582	TGTAGCCCGGATGCTTCGCTCTACGCCGTTAA	685
	5'	P4974	P5583	CGTAGAGCGAAGCATCCGGGGCTACACCAAGCACG	686
L96T	3'	P4976	P5584	CGTTAAAGTTACAGCAGCAGACGGATCAGGCCAATA	687
	5'	P4974	P5585	TGATCCGCTGCTGCTGCTAATTTAACGGCGTAGAGCGAA	688
L126A	3'	P4976	P5586	TAATCAACATGAGCGCGGGAGCACCAGCGGCAGTG	689
	5'	P4974	P5587	TTGGTCTCCCGCCTCATGTTGATTACATCCATG	690
L126T	3'	P4976	P5588	TAATCAACATGAGCAGCGGGAGCACCAGCGGCAGTG	691
	5'	P4974	P5589	TTGGTCTCCCGTCTCATGTTGATTACATCCATG	692
S125A	3'	P4976	P5590	ATGTAATCAACATGGCACTGGGAGCACCAGCGGCAGT	693
	5'	P4974	P5591	TTGGTCTCCAGTGCATGTTGATTACATCCATGTTATT	694
S130P	3'	P4976	P5592	TGGGAGCACCACAGCAGTGGCCACTTAAAGC	695
	5'	P4974	P5593	GTGCCGCACTGCCTGGTGGTCTCCAGGCTCATGT	696

10

20

【0537】

(上記表の続き)

【表 20 - 5】

(上記表の続き)

表11-10:RCL6ライブラリに導入した変異

導入した変異	遺伝子断片	共通の5'及び3'側の 遺伝子に隣接する プライマー名	変異原性 ライマー名	変異原性プライマー配列	配列番号:
P129L	3'	P4976	P5594	TGAGCCTGGGAGCACTTAGCGGCACTGCGGCCTTAA	697
	5'	P4974	P5595	TGCCGCACTGCCGCTAAGTGTCTCCAGGCTCATGTTGAT	698
P129E	3'	P4976	P5596	TGAGCCTGGGAGCAGAAAGCGGCACTGCGGCCTTAA	699
	5'	P4974	P5597	TGCCGCACTGCCGCTTCTGCTCCAGGCTCATGTTGAT	700
P129S	3'	P4976	P5598	TGAGCCTGGGAGCATCTAGCGGCACTGCGGCCTTAA	701
	5'	P4974	P5599	TGCCGCACTGCCGCTAGATGCTCCAGGCTCATGTTGAT	702
P40E	3'	P4976	P5600	GACTCGAGCCATGAAGATCTTAAAGTCTGCTGGAGG	703
	5'	P4974	P5601	GACTTTAAGATCTTCTGCTGAGTGCATACCCGCT	704
Y6Q	3'	P4976	P5602	GCAGTCCGTCCTCAAGCGTATCACAAATTAAGCCCT	705
	5'	P4974	P5603	ATTTGTGATACGCTTGAGGCACGACTGCGCGTACGCAT	706
G102A	3'	P4976	P5604	CAGACGGATCAGCACAATACTCATGGATTATCAACGGCAT	707
	5'	P4974	P5605	TAATCCATGAGTATTGTGCTGATCCGCTGCTGCAAGAAC	708
S101N	3'	P4976	P5606	GCAGCAGACGAAACGGCCAACTCATGGATTATCAA	709
	5'	P4974	P5607	CATGAGTATTGGCCGTTTCCGCTGCTGCAAGAACTTAA	710
G100E	3'	P4976	P5608	TTCTTGACAGCAGCAATCAGGCCAATACTCATGGATTAT	711
	5'	P4974	P5609	TGAGTATTGGCCTGATTCGCTGCTGCAAGAACTTAAACG	712
I115V	3'	P4976	P5610	ATCGAATGGCCGCTAGCGAATAACATGGATGTAATCAA	713
	5'	P4974	P5611	CATCCATGTTATTCGCTACGGCCATTGATGCGGTTGAT	714
A144K	3'	P4976	P5612	GTTGATAAAGCTGTTAAATCTGGTGTGCTGCTGATGAGC	715
	5'	P4974	P5613	GACGACCAAGATTTAACAGCTTTATCAACTGCTGCTT	716
S145D	3'	P4976	P5614	GATAAAGCTGTTGCAAGATGTTGCTGCTGATGAGCGGCA	717
	5'	P4974	P5615	TACTACGACGACCACTGCAACAGCTTTATCAACTGCT	718
S159K	3'	P4976	P5616	AATGAGGGAACAAAAGGATCATCGAGTACCGTCCGTTA	719
	5'	P4974	P5617	ACGGTACTCGATGATCCTTTTGTCCCTCATCCCAAGCTG	720
S162K	3'	P4976	P5618	AACATCCGGATCAAAGAATACCGTCCGTTATCCAGGCAA	721
	5'	P4974	P5619	ATAACCGACGGTACTTTTTGATCCGGATGTTCCCTCATT	722
V147P	3'	P4976	P5620	TGTTGCATCTGGTCCAGTGTGATGCGGCACTGGGAAT	723
	5'	P4974	P5621	TGCCGCTACTACGACTGGACCAAGATGCAACAGCTTTATCA	724
S161P	3'	P4976	P5622	AGGGAACATCCGGACCATCGAGTACCGTCCGTTATCCA	725
	5'	P4974	P5623	ACCGACGGTACTCGATGGTCCGGATGTTCCCTCATCCCA	726

30

40

【0538】

(上記表の続き)

【表 20 - 6】

(上記表の続き)

表11-10:RCL6ライブラリに導入した変異					
導入した変異	遺伝子断片	共通の5'及び3'側の 遺伝子に隣接する プライマー名	変異原性 プライマー名	変異原性プライマー配列	配列番号:
A187D	3'	P4976	P5624	CTTCAAATGAACGTGACTCTTTTCTCCTCGTGGGACCGGA	727
	5'	P4974	P5625	ACGGAGGAAAAAGAGTCACGTTGATTTGAAGAGTCTACAG	728
F189D	3'	P4976	P5626	TCAACGTGCCTCTGATTCTCCTCGTGGGACCGGAGCTGGAT	729
	5'	P4974	P5627	TCCACGGAGGAATCAGAGGCACGTTGATTTGAAGAG	730
L267V	3'	P4976	P5628	TACTATGGAAAAGGGTAAATCAACGTACAGGCGGCAGC	731
	5'	P4974	P5629	CTGTACGTTGATTACCCCTTTTCCATAGTAGAAAAGAAAT	732
Q206E	3'	P4976	P5630	TGGCGTTTCTATTGAATCGACGCTTCCAGGGAACAA	733
	5'	P4974	P5631	CTGGAAGCGTCGATTCAATAGAAAACGCCAGGGCCAT	734
K213T	3'	P4976	P5632	CTTCCAGGGAACACATATGGTGGCAGAAAACGGGACT	735
	5'	P4974	P5633	GTTTTGCGCACCATATGTGTTCCCTGGAAGCGTCGATT	736
K213L	3'	P4976	P5634	CTTCCAGGGAACCTTTATGGTGGCAGAAAACGGGACT	737
	5'	P4974	P5635	GTTTTGCGCACCATAAAGGTTCCCTGGAAGCGTCGATT	738
K265N	3'	P4976	P5636	TTTCTACTATGAAAACGGGCTGATCAACGTACAGGCGGCA	739
	5'	P4974	P5637	ACGTTGATCAGCCGTTTCCATAGTAGAAAAGAAATCACC AA	740
N240K	3'	P4976	P5638	TTTCTAAGCACCCGAAATGGACAAAACACTCAAGTCCGCA	741
	5'	P4974	P5639	GAGTGTGTTGCCATTTCCGGTGCTTAGAAAAGAAATCAAT	742
P239R	3'	P4976	P5640	TTCTTTCTAAGCACCCGTAACGTGGACAAAACACTCAAGTCC	743
	5'	P4974	P5641	TGTTTGTCAGTTACGGTGCTTAGAAAAGAAATCAATGCG	744
T242R	3'	P4976	P5642	CACCCGAACGTGGCGTAACACTCAAGTCCGCGCAGT	745
	5'	P4974	P5643	TGCGGACTTGAAGTTACGCCAGTTCCGGGTGCTTAGAAAAG	746
S89Y	3'	P4976	P5644	CGTGTGCTTACTCTACGCCGTTAAAGTTCTTG	747
	5'	P4974	P5645	ACTTTAACGGCGTAGAGGTAAGCAGACGGGGCTACACCAA	748
P129Q	3'	P4976	P5646	AGCCTGGGAGCACAAAAGCGGCAAGTCCGCGACTTAAA	749
	5'	P4974	P5647	CACTGCCGCTTTGTGCTCCAGGCTCATGTTGAT	750
G211T	3'	P4976	P5648	TTCAATCGACGCTTCCACGAAACAAGTATGGTGGCAGAAAAC	751
	5'	P4974	P5649	CACCATACTTGTTCGTTGGAAAGCGTCGATTGAATAGAAA	752
I111V	3'	P4976	P5650	TGGATTATCAACGGCGTAGAATGGGCCATCGCGAATAAC	753
	5'	P4974	P5651	CGATGGCCCATCTACGCCGTTGATAATCCATGAGTATT	754

10

20

【0539】

(上記表の続き)

RCL7コンビナトリアル変異体

「RCL7」は、親(テンプレート)プラスミドとして数個のBPN'変異体を用いて融合PCRにより生成した1組のコンビナトリアル変異体を指す。各親プラスミドに導入した変異を表11-11に示し、変異体を生成するのに使用した変異原性プライマーを表11-10に示す。

【0540】

各変異体を生成するために、共通の3'側の遺伝子に隣接するプライマー(P4976、CCTCTCGGTTATGAGTTAGTTC、配列番号61)及び変異原性プライマー、あるいは共通の5'側の遺伝子に隣接するプライマー(P4974、GCCCTCACATTTGTGCCACCTA、配列番号60)及び表11-10で各ライブラリについて示される変異原性プライマーを用いて、2種類のPCR反応を実施した。これらのPCR反応は、2種のPCR断片を生成した。一方はBPN'変異遺伝子の5'側半分(5'遺伝子断片)をコードするものであり、他方はBPN'変異遺伝子の3'側半分(3'遺伝子断片)をコードするものである。各PCR増幅反応には、30pmolの各プライマー及び表11-11に列挙した100ngの親分子を含有させた。増幅はVent DNAポリメラーゼ(NEB)を用いて実施した。PCR反応(20µL)は、まず始めに95で2.5分加熱した後、続いて94で15秒の変性、55で15秒のアニール、及び72で40秒の伸長を30サイクル行った。増幅させた後、5'及び3'遺伝子断片を、QIAGEN(登録商標)ゲルバンド精製用キットを用いてゲル精製し、混合して(各断片につき50ng)、プライマーP4973(AAAGGATCCTAATCGGCGCTTTTTC、配列番号62)及びP4950(CTTGTCCTCCAAGCTTAAAAATAAAA、配列番号63)を用いて再度PCRで増幅させて、完全長の遺伝子断片を生成した。伸長工程を72で2分にわたって実施したことを除き、PCR条件は上記の条件と同様のものではあった。完全長のDNA断片をQIAGEN(登録商標)ゲルバンド精製用キットを用いてゲル精製し、制限酵素BamHI及びHindIIIを用いて消化し、同様の制限酵素で消化したpHPLT-BPN'partial optとライゲーションした。Illustra Templi phiキットでローリング・サ

30

40

50

ーケル型増幅法を用い、ライゲーション混合物を製造元 ( G E H e a l t h c a r e ) からの取扱説明書に従って増幅させることで、枯草菌 ( Bacillus subtilis ) に形質転換させるための多量体 DNA を生成した。この目的のため、 1  $\mu$  L のライゲーション混合物と 5  $\mu$  L のサンプル緩衝液を混合し、 95 で 3 分間加熱し、水中で冷却した。次に、 5  $\mu$  L の反応緩衝液及び 0 . 2  $\mu$  L の酵素を各チューブに加え、続いて 30 で 10 時間にわたってインキュベートした。ローリング・サークル型増幅産物を 100 倍希釈し、枯草菌 ( B. subtilis ) 細胞の形質転換に用いた ( a p r E , n p r E , a m y E : : x y l R P x y l A c o m K - p h l e o ) 。形質転換混合物のアリコートをし、 1 . 6 % のスキムミルク及び 10  $\mu$  g / m L のネオマイシンを含有している LB プレートに蒔き、 37 で一晩インキュベートした。続いて、ハローを有するコロニーを、 10  $\mu$  g / m L のネオマイシンを含有している 120  $\mu$  L の LB 培地に接種した。

10

【表 2 1 - 1】

コンビナトリアル変異体#	親プラスミド	導入した変異
1	G97A-G128A-Y217Q-T55P	S24R
2	G97A-G128A-Y217Q-N61E	S24R
3	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H	S24R
4	G97A-G128A-Y217Q-L75S-N76Y	S24R
5	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G	S24R
6	G97A-G128A-Y217Q-S89Y	S24R
7	G97A-G128A-Y217Q-I111V	S24R
8	G97A-G128A-Y217Q-I115V	S24R
9	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S	S24R
10	G97A-G128A-Y217Q-P129Q	S24R
11	G97A-G128A-Y217Q-A134T	S24R
12	G97A-G128A-Y217Q-A144K	S24R
13	G97A-G128A-Y217Q-S145D	S24R
14	G97A-G128A-Y217Q-S159K	S24R
15	G97A-G128A-Y217Q-S162K	S24R
16	G97A-G128A-Y217Q-S161P-S78N	S24R
17	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	S24R
18	G97A-G128A-Y217Q-G211T-S78N	S24R
19	G97A-G128A-Y217Q-K213T	S24R
20	G97A-G128A-Y217Q-P239R	S24R
21	G97A-G128A-Y217Q-N240K	S24R
22	G97A-G128A-Y217Q-L267V-S78N	S24R
23	G97A-G128A-Y217Q-A273S-S78N	S24R
24	G97A-G128A-Y217Q-L75S-N76Y	T55P
25	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G	T55P
26	G97A-G128A-Y217Q-S89Y	T55P
27	G97A-G128A-Y217Q-I111V	T55P
28	G97A-G128A-Y217Q-I115V	T55P
29	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S	T55P
30	G97A-G128A-Y217Q-P129Q	T55P
31	G97A-G128A-Y217Q-A134T	T55P
32	G97A-G128A-Y217Q-A144K	T55P
33	G97A-G128A-Y217Q-S145D	T55P
34	G97A-G128A-Y217Q-S159K	T55P

20

30

40



## 【表 2 1 - 2】

(上記表の続き)

表11-11:親プラスミド及びRCL7変異体中に導入した変異一覧		
コンビナトリアル変異体#	親プラスミド	導入した変異
35	G97A-G128A-Y217Q-S162K	T55P
36	G97A-G128A-Y217Q-S161P	T55P
37	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	T55P
38	G97A-G128A-Y217Q-G211T	T55P
39	G97A-G128A-Y217Q-K213T	T55P
40	G97A-G128A-Y217Q-P239R	T55P
41	G97A-G128A-Y217Q-N240K	T55P
42	G97A-G128A-Y217Q-L267V	T55P
43	G97A-G128A-Y217Q-A273S	T55P
44	G97A-G128A-Y217Q-L75S-N76Y	N61E
45	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G	N61E
46	G97A-G128A-Y217Q-S89Y	N61E
47	G97A-G128A-Y217Q-I111V	N61E
48	G97A-G128A-Y217Q-I115V	N61E
49	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S	N61E
50	G97A-G128A-Y217Q-P129Q	N61E
51	G97A-G128A-Y217Q-A134T	N61E
52	G97A-G128A-Y217Q-A144K	N61E
53	G97A-G128A-Y217Q-S145D	N61E
54	G97A-G128A-Y217Q-S159K	N61E
55	G97A-G128A-Y217Q-S162K	N61E
56	G97A-G128A-Y217Q-S161P	N61E
57	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	N61E
58	G97A-G128A-Y217Q-G211T	N61E
59	G97A-G128A-Y217Q-K213T	N61E
60	G97A-G128A-Y217Q-P239R	N61E
61	G97A-G128A-Y217Q-N240K	N61E
62	G97A-G128A-Y217Q-L267V	N61E
63	G97A-G128A-Y217Q-A273S	N61E
64	G97A-G128A-Y217Q-L75S-N76Y	N61P-S63H
65	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G	N61P-S63H
66	G97A-G128A-Y217Q-S89Y	N61P-S63H
67	G97A-G128A-Y217Q-I111V	N61P-S63H

10

20

30

## 【0 5 4 1】

(上記表の続き)

## 【表 2 1 - 3】

(上記表の続き)

表11-11:親プラスミド及びRCL7変異体中に導入した変異一覧		
コンビナトリアル変異体#	親プラスミド	導入した変異
68	G97A-G128A-Y217Q-I115V	N61P-S63H
69	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S	N61P-S63H
70	G97A-G128A-Y217Q-P129Q	N61P-S63H
71	G97A-G128A-Y217Q-A134T	N61P-S63H
72	G97A-G128A-Y217Q-A144K	N61P-S63H
73	G97A-G128A-Y217Q-S145D	N61P-S63H
74	G97A-G128A-Y217Q-S159K	N61P-S63H
75	G97A-G128A-Y217Q-S162K	N61P-S63H
76	G97A-G128A-Y217Q-S161P	N61P-S63H
77	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	N61P-S63H
78	G97A-G128A-Y217Q-G211T	N61P-S63H
79	G97A-G128A-Y217Q-K213T	N61P-S63H
80	G97A-G128A-Y217Q-P239R	N61P-S63H
81	G97A-G128A-Y217Q-N240K	N61P-S63H
82	G97A-G128A-Y217Q-L267V	N61P-S63H
83	G97A-G128A-Y217Q-A273S	N61P-S63H
84	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G	L75S-N76Y
85	G97A-G128A-Y217Q-S89Y	L75S-N76Y
86	G97A-G128A-Y217Q-I111V	L75S-N76Y
87	G97A-G128A-Y217Q-I115V	L75S-N76Y
88	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S	L75S-N76Y
89	G97A-G128A-Y217Q-P129Q	L75S-N76Y
90	G97A-G128A-Y217Q-A134T	L75S-N76Y
91	G97A-G128A-Y217Q-A144K	L75S-N76Y
92	G97A-G128A-Y217Q-S145D	L75S-N76Y
93	G97A-G128A-Y217Q-S159K	L75S-N76Y
94	G97A-G128A-Y217Q-S162K	L75S-N76Y
95	G97A-G128A-Y217Q-S161P	L75S-N76Y
96	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	L75S-N76Y
97	G97A-G128A-Y217Q-G211T	L75S-N76Y
98	G97A-G128A-Y217Q-K213T	L75S-N76Y
99	G97A-G128A-Y217Q-P239R	L75S-N76Y
100	G97A-G128A-Y217Q-N240K	L75S-N76Y

10

20

30

## 【0 5 4 2】

(上記表の続き)

## 【表 2 1 - 4】

(上記表の続き)

表11-11:親プラスミド及びRCL7変異体中に導入した変異一覧		
コンビナトリアル変異体#	親プラスミド	導入した変異
101	G97A-G128A-Y217Q-L267V	L75S-N76Y
102	G97A-G128A-Y217Q-A273S	L75S-N76Y
103	G97A-G128A-Y217Q-I111V	S87T-A88L-S89G
104	G97A-G128A-Y217Q-I115V	S87T-A88L-S89G
105	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S	S87T-A88L-S89G
106	G97A-G128A-Y217Q-P129Q	S87T-A88L-S89G
107	G97A-G128A-Y217Q-A134T	S87T-A88L-S89G
108	G97A-G128A-Y217Q-A144K	S87T-A88L-S89G
109	G97A-G128A-Y217Q-S145D	S87T-A88L-S89G
110	G97A-G128A-Y217Q-S159K	S87T-A88L-S89G
111	G97A-G128A-Y217Q-S162K	S87T-A88L-S89G
112	G97A-G128A-Y217Q-S161P	S87T-A88L-S89G
113	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	S87T-A88L-S89G
114	G97A-G128A-Y217Q-G211T	S87T-A88L-S89G
115	G97A-G128A-Y217Q-K213T	S87T-A88L-S89G
116	G97A-G128A-Y217Q-P239R	S87T-A88L-S89G
117	G97A-G128A-Y217Q-N240K	S87T-A88L-S89G
118	G97A-G128A-Y217Q-L267V	S87T-A88L-S89G
119	G97A-G128A-Y217Q-A273S	S87T-A88L-S89G
120	G97A-G128A-Y217Q-I111V	S89Y
121	G97A-G128A-Y217Q-I115V	S89Y
122	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S	S89Y
123	G97A-G128A-Y217Q-P129Q	S89Y
124	G97A-G128A-Y217Q-A134T	S89Y
125	G97A-G128A-Y217Q-A144K	S89Y
126	G97A-G128A-Y217Q-S145D	S89Y
127	G97A-G128A-Y217Q-S159K	S89Y
128	G97A-G128A-Y217Q-S162K	S89Y
129	G97A-G128A-Y217Q-S161P	S89Y
130	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	S89Y
131	G97A-G128A-Y217Q-G211T	S89Y
132	G97A-G128A-Y217Q-K213T	S89Y
133	G97A-G128A-Y217Q-P239R	S89Y

10

20

30

## 【0 5 4 3】

(上記表の続き)

## 【表 2 1 - 5】

(上記表の続き)

表11-11:親プラスミド及びRCL7変異体中に導入した変異一覧		
コンビナトリアル変異体#	親プラスミド	導入した変異
134	G97A-G128A-Y217Q-N240K	S89Y
135	G97A-G128A-Y217Q-L267V	S89Y
136	G97A-G128A-Y217Q-A273S	S89Y
137	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S	I111V
138	G97A-G128A-Y217Q-P129Q	I111V
139	G97A-G128A-Y217Q-A134T	I111V
140	G97A-G128A-Y217Q-A144K	I111V
141	G97A-G128A-Y217Q-S145D	I111V
142	G97A-G128A-Y217Q-S159K	I111V
143	G97A-G128A-Y217Q-S162K	I111V
144	G97A-G128A-Y217Q-S161P	I111V
145	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	I111V
146	G97A-G128A-Y217Q-G211T	I111V
147	G97A-G128A-Y217Q-K213T	I111V
148	G97A-G128A-Y217Q-P239R	I111V
149	G97A-G128A-Y217Q-N240K	I111V
150	G97A-G128A-Y217Q-L267V	I111V
151	G97A-G128A-Y217Q-A273S	I111V
152	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S	I115V
153	G97A-G128A-Y217Q-P129Q	I115V
154	G97A-G128A-Y217Q-A134T	I115V
155	G97A-G128A-Y217Q-A144K	I115V
156	G97A-G128A-Y217Q-S145D	I115V
157	G97A-G128A-Y217Q-S159K	I115V
158	G97A-G128A-Y217Q-S162K	I115V
159	G97A-G128A-Y217Q-S161P	I115V
160	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	I115V
161	G97A-G128A-Y217Q-G211T	I115V
162	G97A-G128A-Y217Q-K213T	I115V
163	G97A-G128A-Y217Q-P239R	I115V
164	G97A-G128A-Y217Q-N240K	I115V
165	G97A-G128A-Y217Q-L267V	I115V
166	G97A-G128A-Y217Q-A273S	I115V

10

20

30

## 【 0 5 4 4 】

(上記表の続き)

## 【表 2 1 - 6】

(上記表の続き)

表11-11:親プラスミド及びRCL7変異体中に導入した変異一覧		
コンビナトリアル変異体#	親プラスミド	導入した変異
167	G97A-G128A-Y217Q-A144K	P129Q-S130G-G131S
168	G97A-G128A-Y217Q-S145D	P129Q-S130G-G131S
169	G97A-G128A-Y217Q-S159K	P129Q-S130G-G131S
170	G97A-G128A-Y217Q-S162K	P129Q-S130G-G131S
171	G97A-G128A-Y217Q-S161P	P129Q-S130G-G131S
172	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	P129Q-S130G-G131S
173	G97A-G128A-Y217Q-G211T	P129Q-S130G-G131S
174	G97A-G128A-Y217Q-K213T	P129Q-S130G-G131S
175	G97A-G128A-Y217Q-P239R	P129Q-S130G-G131S
176	G97A-G128A-Y217Q-N240K	P129Q-S130G-G131S
177	G97A-G128A-Y217Q-L267V	P129Q-S130G-G131S
178	G97A-G128A-Y217Q-A273S	P129Q-S130G-G131S
179	G97A-G128A-Y217Q-A144K	P129Q
180	G97A-G128A-Y217Q-S145D	P129Q
181	G97A-G128A-Y217Q-S159K	P129Q
182	G97A-G128A-Y217Q-S162K	P129Q
183	G97A-G128A-Y217Q-S161P	P129Q
184	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	P129Q
185	G97A-G128A-Y217Q-G211T	P129Q
186	G97A-G128A-Y217Q-K213T	P129Q
187	G97A-G128A-Y217Q-P239R	P129Q
188	G97A-G128A-Y217Q-N240K	P129Q
189	G97A-G128A-Y217Q-L267V	P129Q
190	G97A-G128A-Y217Q-A273S	P129Q
191	G97A-G128A-Y217Q-A144K	A134T
192	G97A-G128A-Y217Q-S145D	A134T
193	G97A-G128A-Y217Q-S159K	A134T
194	G97A-G128A-Y217Q-S162K	A134T
195	G97A-G128A-Y217Q-S161P	A134T
196	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	A134T
197	G97A-G128A-Y217Q-G211T	A134T
198	G97A-G128A-Y217Q-K213T	A134T
199	G97A-G128A-Y217Q-P239R	A134T

10

20

30

## 【 0 5 4 5】

(上記表の続き)

## 【表 2 1 - 7】

(上記表の続き)

表11-11:親プラスミド及びRCL7変異体中に導入した変異一覧		
コンビナトリアル変異体#	親プラスミド	導入した変異
200	G97A-G128A-Y217Q-N240K	A134T
201	G97A-G128A-Y217Q-L267V	A134T
202	G97A-G128A-Y217Q-A273S	A134T
203	G97A-G128A-Y217Q-S159K	A144K
204	G97A-G128A-Y217Q-S162K	A144K
205	G97A-G128A-Y217Q-S161P	A144K
206	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	A144K
207	G97A-G128A-Y217Q-G211T	A144K
208	G97A-G128A-Y217Q-K213T	A144K
209	G97A-G128A-Y217Q-P239R	A144K
210	G97A-G128A-Y217Q-N240K	A144K
211	G97A-G128A-Y217Q-L267V	A144K
212	G97A-G128A-Y217Q-A273S	A144K
213	G97A-G128A-Y217Q-S159K	S145D
214	G97A-G128A-Y217Q-S162K	S145D
215	G97A-G128A-Y217Q-S161P	S145D
216	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	S145D
217	G97A-G128A-Y217Q-G211T	S145D
218	G97A-G128A-Y217Q-K213T	S145D
219	G97A-G128A-Y217Q-P239R	S145D
220	G97A-G128A-Y217Q-N240K	S145D
221	G97A-G128A-Y217Q-L267V	S145D
222	G97A-G128A-Y217Q-A273S	S145D
223	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	S159K
224	G97A-G128A-Y217Q-G211T	S159K
225	G97A-G128A-Y217Q-K213T	S159K
226	G97A-G128A-Y217Q-P239R	S159K
227	G97A-G128A-Y217Q-N240K	S159K
228	G97A-G128A-Y217Q-L267V	S159K
229	G97A-G128A-Y217Q-A273S	S159K
230	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	S162K
231	G97A-G128A-Y217Q-G211T	S162K

## 【 0 5 4 6 】

(上記表の続き)

10

20

30

## 【表 2 1 - 8】

(上記表の続き)

表11-11:親プラスミド及びRCL7変異体中に導入した変異一覧		
コンビナトリアル変異体#	親プラスミド	導入した変異
232	G97A-G128A-Y217Q-K213T	S162K
233	G97A-G128A-Y217Q-P239R	S162K
234	G97A-G128A-Y217Q-N240K	S162K
235	G97A-G128A-Y217Q-L267V	S162K
236	G97A-G128A-Y217Q-A273S	S162K
237	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	S161P
238	G97A-G128A-Y217Q-G211T	S161P
239	G97A-G128A-Y217Q-K213T	S161P
240	G97A-G128A-Y217Q-239R	S161P
241	G97A-G128A-Y217Q-N240K	S161P
242	G97A-G128A-Y217Q-L267V	S161P
243	G97A-G128A-Y217Q-A273S	S161P
244	G97A-G128A-Y217Q-G211T	V203Y
245	G97A-G128A-Y217Q-K213T	V203Y
246	G97A-G128A-Y217Q-P239R	V203Y
247	G97A-G128A-Y217Q-N240K	V203Y
248	G97A-G128A-Y217Q-L267V	V203Y
249	G97A-G128A-Y217Q-A273S	V203Y
250	G97A-G128A-Y217Q-P239R	G211T
251	G97A-G128A-Y217Q-N240K	G211T
252	G97A-G128A-Y217Q-L267V	G211T
253	G97A-G128A-Y217Q-A273S	G211T
254	G97A-G128A-Y217Q-P239R	K213T
255	G97A-G128A-Y217Q-N240K	K213T
256	G97A-G128A-Y217Q-L267V	K213T
257	G97A-G128A-Y217Q-A273S	K213T
258	G97A-G128A-Y217Q-L267V	P239R
259	G97A-G128A-Y217Q-A273S	P239R
260	G97A-G128A-Y217Q-L267V	N240K
261	G97A-G128A-Y217Q-A273S	N240K

10

20

## 【0 5 4 7】

(上記表の続き)

30

(実施例 1 2)

洗剤の表

パート I 実施例 1 2 のアッセイで使用される洗剤の組成を表 1 2 - 1 に示す。B P N ' 変異体のタンパク質サンプルを、パート I 実施例 1 に記載のような洗剤組成物に添加して、列挙した様々な特性についてのアッセイを行った。

【表 2 2】

成分	組成 (組成の重量%)		
	1	2	3
C <sub>12-16</sub> アルキルエトキシ(1, 8)サルフェート	14. 7	11. 6	
C <sub>11, 8</sub> アルキルベンゼンスルホネート	4. 3	11. 6	8. 3
C <sub>16-17</sub> 分枝鎖アルキルサルフェート	1. 7	1. 29	
C <sub>12-14</sub> アルキル-9-エトキシレート	0. 9	1. 07	
C <sub>12</sub> ジメチルアミノオキシド	0. 6	0. 64	
クエン酸	3. 5	0. 65	3
C <sub>12-16</sub> 脂肪酸	1. 5	2. 32	3. 6
ホウ酸ナトリウム(ホウ砂)	2. 5	2. 46	1. 2
C <sub>12-14</sub> アルキルエトキシ三硫酸ナトリウム			2. 9
C <sub>14-16</sub> アルキル7-エトキシレート			4. 2
C <sub>12-14</sub> アルキル7-エトキシレート			1. 7
ギ酸カルシウム	0. 09	0. 09	
次の一般構造:ビス((C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O)(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub> )(CH <sub>3</sub> )-N <sup>+</sup> -C <sub>x</sub> H <sub>2x</sub> -N <sup>+</sup> -(CH <sub>3</sub> )- ビス((C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O)(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub> )(式中、nは20~30であり、xは3~8である)を有する化合物、又は このサルフェート化若しくはスルホネート化変異体			1. 2
ランダムグラフトコポリマー <sup>1</sup>		1. 46	0. 5
エトキシル化ポリエチレンイミン <sup>2</sup>	1. 5	1. 29	
ジエチレントリアミン五酢酸	0. 34	0. 64	
ジエチレントリアミンペンタ(メチレンホスホン酸)			0. 3
Tinopal AMS-GX		0. 06	
Tinopal CBS-X	0. 2	0. 17	
両親媒性アルコキシル化グリースクリーニングポリマー <sup>3</sup>	1. 28	1	0. 4
エタノール	2	1. 58	1. 6
プロピレングリコール	3. 9	3. 59	1. 3
ジエチレングリコール	1. 05	1. 54	
ポリエチレングリコール	0. 06	0. 04	
モノエタノールアミン	3. 05	2. 41	0. 4
NaOH	2. 44	1. 8	
クメンスルホン酸ナトリウム			1
ギ酸ナトリウム		0. 11	
水、審美剤(染料、香料)及び微量成分(酵素、溶媒、構造剤)	残部	残部	残部

## 【 0 5 4 8 】

<sup>1</sup> 「ランダムグラフトコポリマー」は、ポリエチレンオキシド主鎖と複数のポリビニルアセテート側鎖とを有する、ポリビニルアセテートグラフト化ポリエチレンオキシドコポリマーである。ポリエチレンオキシド主鎖の分子量は約 6 0 0 0 であり、ポリエチレンオキシドとポリビニルアセテートとの重量比は約 4 0 : 6 0 であり、5 0 個のエチレンオキシド単位当たりのグラフト点は 1 以下である。

## 【 0 5 4 9 】

<sup>2</sup> - NH につき 2 0 個のエトキシル基を有するポリエチレンイミン ( MW = 6 0 0 )

## 【 0 5 5 0 】

<sup>3</sup> 両親媒性アルコキシル化グリース洗浄ポリマーは、- NH につき 2 4 個のエトキシル基、及び - NH につき 1 6 個のプロポキシル基を有するポリエチレンイミン ( MW = 6 0 0 ) である。

## 【 0 5 5 1 】

B P N ' のコンビナトリアル変異体のシミ除去性能

実施例 1 1 に記載のように生成した B P N ' のコンビナトリアル変異体の、シミ除去性能の評価実験を、B M I 染色した微小標本を用いて実施した。アッセイを実施例 1 に記載

10

20

30

40

50



のように実施した（BMI微小標本アッセイ）。表12-2は、pH 8及び16での洗剤組成物1の、並びにpH 8及び32での洗剤組成物1の、BMI微小標本アッセイを用いて、並びに、16及びpH 8での加熱不活性化した市販のTIDE（登録商標）2X Cold（Procter & Gamble）洗剤のBMI微小標本アッセイを用いて、RCL4ライブラリから生成した変異体の性能指数（PI）値を提供する。市販の洗剤配合物の加熱不活性化は、任意のタンパク質成分の内因性の酵素活性を破壊しつつ、非酵素成分の特性は保持させる。洗剤の加熱不活性化は、予め計量した液体洗剤（ガラス瓶中）を95のウォーターバスに2時間にわたって配置することで行った。TIDE（登録商標）2X Cold洗剤は、地元のスーパーマーケットで購入した。不活性化率を正確に判定するために、未加熱及び加熱洗剤のどちらも、洗剤を溶解させて5分以内にアッセイを行った。酵素活性はAAPFアッセイにより試験した。希釈標準溶液は、加熱不活性化した母液から調製した。所望される条件に一致するよう適切な硬度の水及び緩衝液を洗剤溶液に加えた（表12-2）。瓶をボルテックスにかけるか反転させるかして溶液を混合した。

## 【表23】

界面活性剤	温度(°C)	洗剤g/L	pH	緩衝剤	硬度Gpg
TIDE(登録商標)2X Cold	16, 32	0.98	8	5mMのHEPES	6

## 【0552】

表12-3に列挙した変異体の配列は、BPN'-v3:G97A-G128A-Y217Qと比較したものである。PI値はBPN'-v3と比較して算出する。この一覧中のすべての変異のPIは、試験した少なくとも1種の特性について0.5以上は切り捨てられている。「洗剤組成物(Det. Comp.)」は洗剤組成物を意味する。

## 【表24】

BPN'と比較した配列	BPN'-v3:G97A-G128A-Y217Qと比較した配列	TIDE(登録商標)洗剤pH8, 16°C, BMI PI	洗剤組成物1, pH 8, 16°C, BMI PI	洗剤組成物1, pH 8, 32°C, BMI PI
S87T-A88L-S89G-G97A-G128A-Y217Q	S87T-A88L-S89G	1.00	1.12	0.99
N61P-S63H-G97A-G128A-Y217Q	N61P-S63H	1.03	1.12	1.01
S87G-A88V-S89A-G97A-G128A-Y217Q	S87G-A88V-S89A	1.02	1.11	0.99
P86S-S87G-A88V-G97A-G128A-Y217Q	P86S-S87G-A88V	1.00	1.10	1.00
Q59S-N61P-G97A-G128A-Y217Q	Q59S-N61P	1.01	1.09	1.00
S24G-N25G-G97A-G128A-Y217Q	S24G-N25G	0.99	1.09	1.02
N61P-N62S-G97A-G128A-Y217Q	N61P-N62S	0.99	1.06	0.98
G97A-G128A-P129Q-S130G-G131S-Y217Q	P129Q-S130G-G131S	0.96	1.06	0.99
L75S-N76Y-G97A-G128A-Y217Q	L75S-N76Y	0.99	1.06	1.00
G97A-G128A-V203Y-Y217Q	V203Y	0.99	1.05	1.01
T55P-G97A-G128A-Y217Q	T55P	0.98	1.04	0.98
A88V-L90I-G97A-G128A-Y217Q	A88V-L90I	0.99	1.04	1.00
G97A-G128A-G211R-N212S-K213V-Y217Q	G211R-N212S-K213V	0.97	1.04	0.98
G23A-S24G-N25G-G97A-G128A-Y217Q	G23A-S24G-N25G	0.98	1.04	0.98
T22N-S24A-G97A-G128A-Y217Q	T22N-S24A	0.98	1.03	0.97
S24R-G97A-G128A-Y217Q	S24R	0.95	1.02	0.99
G97A-A98S-G128A-Y217Q	A98S	0.95	1.02	0.99
<b>BPN'-v3:G97A-G128A-Y217Q</b>	<b>BPN'-v3</b>	<b>1.00</b>	<b>1.00</b>	<b>1.00</b>
G97A-G128A-T158G-S159G-Y217Q	T158G-S159G	0.95	0.99	0.97
Q59E-N61P-G97A-G128A-Y217Q	Q59E-N61P	0.90	0.94	0.90
G97A-A98E-G128A-Y217Q	A98E	0.92	0.91	0.90

## 【0553】

本発明は、タンパク質分解活性を有するプロテアーゼ変異体を含み、変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列、並びに表12-3のものから選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。このようなプロテアーゼ変異体のタンパク質分解活性は、BPN'又はBPN'-v3プロテアーゼよりも大きくてもよい。このようなプロテアーゼ変異体は、それぞれ単離物、組み換え体、実質的な純品、又は天然に生じたものではないプロテアーゼ変異体であり得る。

本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくとも1つのこのようなプロテアーゼ変異体を含む組成物（クリーニング組成物が挙げられる）、並びに、少なくとも1つのこのようなプロテアーゼ変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0554】

表12-4は、16及びpH 8での洗剤組成物1のBMI微小標本アッセイ、並びに、16及びpH 8での洗剤組成物2のBMI微小標本アッセイ、並びに、洗剤組成物3で測定された安定性を用いて、RCL 5~7及びFS 1~3から生成した変異体の性能指数（PI）値を提供する。AAPF加水分解による比活性についてのPI値（AAPF比のPI）も同様に測定した。すべてのアッセイは実施例1に記載のように実施した。変異体の配列は、BPN'-v3:G97A-G128A-Y217Qと比較したものである。PI値はBPN'-v3と比較して算出した。この一覧中のすべての変異のPIは、試験した少なくとも1種の特性的について0.5以上は切り捨てられている。0.01未満のPI値は、太字のイタリック体で修飾して0.01と表示させた。

10

【表25-1】

変異体の供給源	BPN'と比較した配列	BPN'-v3:G97A-G128A-Y217Qと比較した配列	洗剤組成物1. pH 8.16°C. BMI PI	洗剤組成物2. pH 8.16°C. BMI PI	AAPF比のPI	洗剤組成物3. 安定性PI
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-P86S-S87G-A88V-A116N-N117S-N118G	P86S-S87G-A88V-A116N-N117S-N118G	1.21	1.14	1.17	0.03
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-N61P-S101N	S24G-N25G-N61P-S101N	1.05	1.12	1.96	1.00
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	S24G-N25G-S53G-T55P-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	1.04	1.10	1.71	0.03
FS1	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S78N-S101N-V203Y	N61P-S78N-S101N-V203Y	1.03	1.10	1.73	0.33
FS1	G97A-G128A-Y217Q-T55P-N61P-S78N-S101N-V203Y	T55P-N61P-S78N-S101N-V203Y	1.06	1.10	1.97	0.39
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N	S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N	1.03	1.10	2.22	0.33
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-V203Y-L267V	V203Y-L267V	1.10	1.09	1.12	0.09
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-T55P-S101N	S24G-N25G-T55P-S101N	1.04	1.09	1.82	1.13
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-A134T-L267V	A134T-L267V	1.13	1.08	0.93	0.66
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G	S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G	1.01	1.08	1.10	0.29
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-N61P-S101N-V203Y	S24G-N25G-S53G-N61P-S101N-V203Y	1.07	1.08	2.11	0.09
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-N25Y-Q59S-N61P	N25Y-Q59S-N61P	1.07	1.08	0.85	0.66
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-I111V-S161P	I111V-S161P	1.10	1.08	0.66	0.98
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-I115V-L267V	I115V-L267V	1.10	1.08	1.07	0.63
FS1	G97A-G128A-Y217Q-T55P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	T55P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	0.99	1.08	1.39	0.16
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-N25Y-P129Q-S130G-G131S-A137T	N25Y-P129Q-S130G-G131S-A137T	1.07	1.08	0.88	0.67
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H-A128S-P129Q	N61P-S63H-A128S-P129Q	1.04	1.08	1.59	0.78
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S53G-N61P-S101N-V203Y	S53G-N61P-S101N-V203Y	1.03	1.08	1.91	0.09
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N	S24G-N25G-S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N	1.08	1.07	1.44	0.33
FS1	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N	N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N	1.07	1.07	1.80	0.31

20

30

【表 25 - 2】

(上記表の続き)

表 12-4: RCL5~7及びFS1~3から生成した変異体の性能指数値						
変異体の供給源	BPN' と比較した配列	BPN' -v3:G97A-G128A-Y217Q と比較した配列	洗剤組成物1. pH 8, 16°C, BMI PI	洗剤組成物2. pH 8, 16°C, BMI PI	AAPF比の PI	洗剤組成物3. 安定性PI
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-N25Y-N61P-S63H	N25Y-N61P-S63H	1.06	1.07	0.74	0.60
RCL5	G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P-V203Y	Q59S-N61P-V203Y	0.99	1.07	0.69	0.09
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-V8L-N25Y-P129Q-S130G-G131S	V8L-N25Y-P129Q-S130G-G131S	1.08	1.07	1.22	0.03
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-P86S-S87G-A88V-P239R	P86S-S87G-A88V-P239R	1.16	1.07	1.26	0.03
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S101N-V203Y	S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S101N-V203Y	1.02	1.07	2.07	0.11
RCL5	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-P129Q-S130G-G131S	S24G-N25G-P129Q-S130G-G131S	1.09	1.06	1.25	1.00
FS3	G97A-G128A-Y217Q-N240K	N240K	1.04	1.06	0.90	0.94
RCL5	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G-G211R-N212S-K213V	G23A-S24G-N25G-G211R-N212S-K213V	1.06	1.06	1.05	0.06
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H-S78N-I11V-A134T	N61P-S63H-S78N-I11V-A134T	1.03	1.06	0.43	1.14
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S63T-P86S-S87G-A88V	S63T-P86S-S87G-A88V	1.17	1.06	1.46	0.02
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G-A116N-N117S-N118G	G23A-S24G-N25G-A116N-N117S-N118G	1.08	1.06	0.91	0.21
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N	S78N-S87T-A88L-S89G-S101N	1.03	1.06	1.40	0.33
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-A116N-N117S-N118G	S24G-N25G-A116N-N117S-N118G	1.06	1.06	0.74	1.05
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-T55P-N240K	T55P-N240K	1.02	1.06	0.91	0.93
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-T55P-P129V-P194S	T55P-P129V-P194S	1.07	1.06	0.85	0.86
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-N25Y-S87G-A88V-S89A	N25Y-S87G-A88V-S89A	1.07	1.05	1.14	0.08
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S87T-A88L-S89G-S101N	S24G-N25G-S87T-A88L-S89G-S101N	1.02	1.05	1.19	0.06
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-V203Y	P129Q-S130G-G131S-V203Y	1.04	1.05	0.94	0.05
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P-N240K	Q59S-N61P-N240K	1.05	1.05	0.80	0.84
FS3	G97A-G128A-Y217Q-S24R-P40E-P129E-S159K-K265R	S24R-P40E-P129E-S159K-K265R	1.13	1.05	1.08	1.31
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-P52S-T55P-V203Y	P52S-T55P-V203Y	1.09	1.05	0.53	0.15

10

20

【0555】

(上記表の続き)

【表 25 - 3】

(上記表の続き)

表 12-4: RCL5~7及びFS1~3から生成した変異体の性能指数値						
変異体の供給源	BPN' と比較した配列	BPN' -v3:G97A-G128A-Y217Q と比較した配列	洗剤組成物1. pH 8, 16°C, BMI PI	洗剤組成物2. pH 8, 16°C, BMI PI	AAPF比の PI	洗剤組成物3. 安定性PI
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24R-P129E	S24R-P129E	1.11	1.05	0.88	0.59
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-N61P-S78N	S24G-N25G-S53G-N61P-S78N	0.98	1.05	1.17	1.16
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-T55P-S78N-S101N	S24G-N25G-T55P-S78N-S101N	1.07	1.05	1.71	1.29
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-P86S-S87G-A88V-A116S-N117G-N118R	P86S-S87G-A88V-A116S-N117G-N118R	1.10	1.05	0.76	0.05
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S87T-A88L-S89G	N61P-S87T-A88L-S89G	1.00	1.05	1.12	0.05
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-S78N-S87T-A88L-S89G	S24G-N25G-S53G-T55P-S78N-S87T-A88L-S89G	0.96	1.05	0.96	0.29
RCL5	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G-N61P-S63H	G23A-S24G-N25G-N61P-S63H	1.06	1.05	0.89	0.13
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24R-Q59S-N61P	S24R-Q59S-N61P	1.07	1.05	0.94	0.49
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-N61P-P129Q-S130G-G131S	N61P-P129Q-S130G-G131S	1.07	1.05	1.13	0.78
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N	S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N	1.05	1.04	1.98	0.32
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-S101N-V203Y	S24G-N25G-S53G-T55P-S101N-V203Y	1.05	1.04	1.57	0.15
FS1	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	1.02	1.04	1.60	0.12
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-S78N-S101N	S24G-N25G-S53G-T55P-S78N-S101N	1.03	1.04	2.01	1.27
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S101N-V203Y	S24G-N25G-S53G-S101N-V203Y	1.01	1.04	1.77	0.07
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S78N-S101N-V203Y	S24G-N25G-S78N-S101N-V203Y	1.09	1.04	1.54	0.28
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-A133V-L267V	P129Q-S130G-G131S-A133V-L267V	1.14	1.04	1.37	0.56
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-S101N	S87T-A88L-S89G-S101N	1.05	1.04	1.44	0.07
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G-P239R	G23A-S24G-N25G-P239R	1.07	1.04	0.92	0.16
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S87G-A88V-S89A-A116N-N117S-N118G	S87G-A88V-S89A-A116N-N117S-N118G	1.07	1.04	0.92	0.37

30

40

【0556】

50

(上記表の続き)

【表 25 - 4】

(上記表の続き)

表 12-4: RCL5~7及びFS1~3から生成した変異体の性能指数値

変異体の供給源	BPN'と比較した配列	BPN' -v3: G97A-G128A-Y217Qと比較した配列	洗剤組成物1. pH 8, 16°C, BMI PI	洗剤組成物2. pH 8, 16°C, BMI PI	AAPF比の PI	洗剤組成物3. 安定性PI
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P-A116S-N117G-N118R	Q59S-N61P-A116S-N117G-N118R	1.09	1.04	0.68	0.91
RCL5	G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P-S87T-A88L-S89G	Q59S-N61P-S87T-A88L-S89G	1.03	1.04	0.81	0.08
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S87T-A88L-S89G-V203Y	S24G-N25G-S53G-S87T-A88L-S89G-V203Y	0.96	1.04	0.73	0.04
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-A134T-G211T	A134T-G211T	1.11	1.04	0.71	0.35
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-T55P-A128S-P129Q	T55P-A128S-P129Q	1.03	1.04	2.71	1.02
FS1	G97A-G128A-Y217Q-T55P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N	T55P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N	1.05	1.04	1.56	0.33
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-P86S-S87G-A88V-T242R	P86S-S87G-A88V-T242R	1.09	1.04	0.83	0.04
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S161P-V203Y	S161P-V203Y	1.04	1.04	0.81	0.09
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-T55P-N61P-S78N-S101N-V203Y	S24G-N25G-T55P-N61P-S78N-S101N-V203Y	1.05	1.04	2.01	0.44
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-G211T-L267V	G211T-L267V	1.08	1.03	1.16	0.30
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-P40E-T55P-N269K	P40E-T55P-N269K	1.08	1.03	0.71	0.05
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24R-A128S-P129G	S24R-A128S-P129G	1.08	1.03	1.63	0.64
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-N61P-N62S-P194L-A232T	S24G-N25G-N61P-N62S-P194L-A232T	1.15	1.03	3.06	0.35
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-T55P-A116S-N117G-N118R	T55P-A116S-N117G-N118R	1.07	1.03	0.83	1.06
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S78N-S101N-V203Y	S24G-N25G-S53G-S78N-S101N-V203Y	1.03	1.03	1.76	0.32
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-N240K	P129Q-S130G-G131S-N240K	1.08	1.03	0.90	0.83
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G	S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G	0.93	1.03	1.00	0.33
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-N25Y-P129Q-S130G-G131S	N25Y-P129Q-S130G-G131S	1.08	1.03	0.93	0.69
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-T55P-I115V	T55P-I115V	1.06	1.03	1.07	1.07
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-N25Y-T55P	N25Y-T55P	1.05	1.03	1.00	0.80
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G-A128S-P129D	G23A-S24G-N25G-A128S-P129D	0.97	1.03	1.75	0.15

10

20

【0557】

(上記表の続き)

【表 25 - 5】

(上記表の続き)

表 12-4: RCL5~7及びFS1~3から生成した変異体の性能指数値

変異体の供給源	BPN'と比較した配列	BPN' -v3: G97A-G128A-Y217Qと比較した配列	洗剤組成物1. pH 8, 16°C, BMI PI	洗剤組成物2. pH 8, 16°C, BMI PI	AAPF比の PI	洗剤組成物3. 安定性PI
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-P129S-V203Y	S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-P129S-V203Y	1.00	1.03	1.68	0.13
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-T55P-A134T	T55P-A134T	1.06	1.03	0.94	1.05
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H-S78N-I111V	N61P-S63H-S78N-I111V	1.03	1.02	0.49	1.18
FS2	Y217Q-N61P-A97G-G102A-A128G-P129S	N61P-A97G-G102A-A128G-P129S	0.98	1.02	Na	Na
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S53G-N61P-S101N	S53G-N61P-S101N	1.02	1.02	2.08	0.88
RCL5	G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P-S87G-A88V-S89A	Q59S-N61P-S87G-A88V-S89A	1.01	1.02	0.90	0.20
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S53G-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	S53G-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	0.96	1.02	1.11	0.04
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-P129S	S87T-A88L-S89G-P129S	1.06	1.02	1.21	0.10
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S53G-T55P-S78N-S101N-V203Y	S53G-T55P-S78N-S101N-V203Y	1.03	1.02	1.70	0.48
RCL5	G97A-G128A-Y217Q-T55P-P129Q-S130G-G131S	T55P-P129Q-S130G-G131S	1.01	1.02	1.18	0.91
RCL5	G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P-P129Q-S130G-G131S	Q59S-N61P-P129Q-S130G-G131S	0.98	1.02	0.83	0.80
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-A134T-P239R	A134T-P239R	1.03	1.02	0.53	0.98
RCL5	G97A-G128A-Y217Q-T55P-V203Y	T55P-V203Y	1.01	1.01	1.02	0.23
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-T55P-S78N-S89Y	T55P-S78N-S89Y	1.03	1.01	1.05	1.25
RCL5	G97A-G128A-Y217Q-T22N-S24A-N61P-S63H	T22N-S24A-N61P-S63H	1.00	1.01	0.69	0.46
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S161P-L267V	S161P-L267V	1.05	1.01	1.00	0.66
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-T55P-L75H-N76G	T55P-L75H-N76G	1.06	1.01	0.69	0.59
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-A134T-S161P	A134T-S161P	1.07	1.01	0.73	1.00
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-A134T	S87T-A88L-S89G-A134T	1.08	1.01	0.66	0.13
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-T55P-A116N-N117S-N118G	T55P-A116N-N117S-N118G	1.06	1.01	1.06	1.11

30

40

50

【 0 5 5 8 】

( 上記表の続き )

【 表 2 5 - 6 】

( 上記表の続き )

変異体の供給源	BPN'と比較した配列	BPN' -v3:G97A-G128A-Y217Qと比較した配列	洗剤組成物1. pH 8.16°C, BMI PI	洗剤組成物2. pH 8.16°C, BMI PI	AAPF比のPI	洗剤組成物3. 安定性PI
v12	G97A-G128S-Y217Q	A128S	1.02	1.01	1.65	1.00
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-T55P-S78N-I115V	T55P-S78N-I115V	1.07	1.00	1.00	1.32
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-Y6Q-P129Q-S130G-G131S	Y6Q-P129Q-S130G-G131S	1.03	1.00	0.98	0.23
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S24R-P129Q-S130G-G131S	S24R-P129Q-S130G-G131S	1.06	1.00	1.11	0.61
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S78N-S101N	S24G-N25G-S53G-S78N-S101N	0.99	1.00	1.61	1.21
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-T55P-P129V	T55P-P129V	1.07	1.00	0.70	1.00
v3	G97A-G128A-Y217Q	BPN' -V3	1.00	1.00	1.00	1.00
FS2	G97A-Y217Q-N61P-N62Q-G100N-A128G	N61P-N62Q-G100N-A128G	0.95	1.00	Na	Na
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-T55P-P129Q	T55P-P129Q	1.10	1.00	1.77	1.15
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	1.05	1.00	1.84	0.12
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-N240K	S87T-A88L-S89G-N240K	1.04	1.00	0.83	0.10
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-A134T-N240K	A134T-N240K	1.07	0.99	0.61	0.96
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-P239R	S87T-A88L-S89G-P239R	1.04	0.99	0.68	0.14
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-L267V	P129Q-S130G-G131S-L267V	1.08	0.99	1.35	0.61
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-N240K	P129Q-N240K	1.06	0.99	1.39	1.00
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S78N-S87T-A88L-S89G-V203Y	S78N-S87T-A88L-S89G-V203Y	0.93	0.99	0.74	0.15
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-I111V-A273S	I111V-A273S	1.00	0.99	0.48	0.27
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-T55P-S78N-A88V-S101N	S24G-N25G-T55P-S78N-A88V-S101N	1.03	0.99	2.17	0.71
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-T55P-S78N	S24G-N25G-T55P-S78N	0.96	0.98	1.15	1.20
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S78N-S87T-A88L-S101N-V203Y	S24G-N25G-S53G-S78N-S87T-A88L-S101N-V203Y	1.02	0.98	1.27	0.10
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-V203Y	S24G-N25G-S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-V203Y	0.97	0.98	0.75	0.14

10

20

【 0 5 5 9 】

( 上記表の続き )

【表 25 - 7】

(上記表の続き)

表 12-4: RCL5~7及びFS1~3から生成した変異体の性能指数値						
変異体の供給源	BPN'と比較した配列	BPN' -v3:G97A-G128A-Y217Qと比較した配列	洗剤組成物1. pH 8, 16°C, BMI PI	洗剤組成物2. pH 8, 16°C, BMI PI	AAPF比の PI	洗剤組成物3. 安定性PI
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	S24G-N25G-S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	1.06	0.98	1.21	0.14
RCL5	G97A-G128A-Y217Q-S87G-A88V-S89A-P129Q-S130G-G131S	S87G-A88V-S89A-P129Q-S130G-G131S	1.01	0.98	1.18	0.29
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H-S78N-S161P	N61P-S63H-S78N-S161P	1.03	0.98	0.73	1.16
FS1	G97A-G128A-Y217Q-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	1.04	0.98	1.75	0.14
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-I111V-P129Q-S130G-G131S	I111V-P129Q-S130G-G131S	1.00	0.98	0.52	0.97
RCL5	G97A-G128A-Y217Q-T22N-S24A-T55P	T22N-S24A-T55P	0.96	0.98	0.94	0.64
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-I115V-N240K	I115V-N240K	1.04	0.98	0.66	0.90
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S87G-A88V-S89A-A116N-N117S-N118G-P172H	S87G-A88V-S89A-A116N-N117S-N118G-P172H	0.98	0.98	0.66	0.40
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N	S24G-N25G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N	1.01	0.98	1.28	0.31
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-I115V-A134T	S24G-N25G-I115V-A134T	1.03	0.98	0.59	1.13
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-T55P-A128S-P129D	T55P-A128S-P129D	0.97	0.97	1.39	1.00
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-I111V-S159K	I111V-S159K	0.99	0.97	0.64	1.12
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-N240K-A273S	N240K-A273S	1.03	0.96	0.64	0.19
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S159K-L267V	S159K-L267V	1.00	0.96	1.08	0.79
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-I111V-P129Q-G211T	I111V-P129Q-G211T	1.01	0.96	0.83	0.42
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-I115V-A273S	I115V-A273S	1.05	0.95	0.74	0.20
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S89Y	S89Y	0.99	0.95	0.70	0.88
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24R-A116N-N117S-N118G	S24R-A116N-N117S-N118G	1.08	0.95	0.91	0.60
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-N61E-A144K	N61E-A144K	1.03	0.95	0.97	1.10
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-P239R	P129Q-S130G-G131S-P239R	1.02	0.95	0.85	0.99
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-I115V	S87T-A88L-S89G-I115V	0.97	0.95	0.59	0.13

10

20

【0560】

(上記表の続き)

【表 25 - 8】

(上記表の続き)

表 12-4: RCL5~7及びFS1~3から生成した変異体の性能指数値						
変異体の供給源	BPN'と比較した配列	BPN' -v3:G97A-G128A-Y217Qと比較した配列	洗剤組成物1. pH 8, 16°C, BMI PI	洗剤組成物2. pH 8, 16°C, BMI PI	AAPF比の PI	洗剤組成物3. 安定性PI
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-T55P-A92G	T55P-A92G	0.96	0.94	0.56	0.91
FS3	G97A-G128A-Y217Q-S145D-S159K-N240K-Q275E	S145D-S159K-N240K-Q275E	0.98	0.94	0.76	1.08
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S89Y-P129Q-S130G-G131S	S89Y-P129Q-S130G-G131S	1.04	0.94	0.71	0.70
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-S162K	P129Q-S130G-G131S-S162K	1.01	0.94	1.00	0.93
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-I111V-A134T	I111V-A134T	0.98	0.94	0.37	1.06
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-P40E-S53Y-S78Y-P86S-S87G-A88V	P40E-S53Y-S78Y-P86S-S87G-A88V	0.99	0.94	0.97	0.35
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-L75H-N76G	S24G-N25G-L75H-N76G	0.93	0.93	0.58	0.52
FS2	G97A-Y217Q-N61P-A128G-P129S-S130P	N61P-A128G-P129S-S130P	0.85	0.93	0.65	0.92
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24R-S145D	S24R-S145D	0.99	0.93	0.89	0.59
FS3	G97A-G128A-Y217Q-S24R-S145D-P239R-Q275E	S24R-S145D-P239R-Q275E	0.92	0.92	0.63	0.68
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S24R-S78N-S182P-L267V	S24R-S78N-S182P-L267V	0.95	0.92	1.16	0.55
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S53G-N61P-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	S53G-N61P-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	1.04	0.92	1.67	0.02
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-P5S-S87G-A88V-S89A-A116G-N117R	P5S-S87G-A88V-S89A-A116G-N117R	0.98	0.92	0.64	0.07
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S53G-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	S53G-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	0.99	0.92	1.65	0.11
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P-A116N-N117S-N118G	Q59S-N61P-A116N-N117S-N118G	0.93	0.92	0.42	1.04
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-P239R-A273S	P239R-A273S	0.94	0.91	0.52	0.23
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	0.94	0.91	1.16	0.13
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24R-P129V	S24R-P129V	0.98	0.91	0.52	0.58
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-I111V-P239R	I111V-P239R	0.97	0.91	0.38	1.08
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	0.90	0.91	0.79	0.05
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-T55P-P129L	T55P-P129L	0.99	0.91	0.62	0.98
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-I111V	S87T-A88L-S89G-I111V	0.92	0.90	0.42	0.13

30

40

【0561】

50

(上記表の続き)

【表 25 - 9】

(上記表の続き)

表 12-4: RCL5~7及びFS1~3から生成した変異体の性能指数値						
変異体の供給源	BPN'と比較した配列	BPN' -v3: G97A-G128A-Y217Qと比較した配列	洗剤組成物1. pH 8, 16°C, BMI PI	洗剤組成物2. pH 8, 16°C, BMI PI	AAPF比のPI	洗剤組成物3. 安定性PI
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S145D-A273S	S145D-A273S	0.91	0.90	0.66	0.17
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-T242R	P129Q-S130G-G131S-T242R	0.94	0.90	0.51	0.89
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S3F-S87T-A88L-S89G-G211T	S3F-S87T-A88L-S89G-G211T	0.93	0.89	0.55	0.07
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S87G-A88V-S89A-S162K	S87G-A88V-S89A-S162K	0.97	0.89	1.21	0.37
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S89Y-G211T	S89Y-G211T	0.89	0.88	0.53	0.41
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-A144K	S87T-A88L-S89G-A144K	0.93	0.88	0.74	0.12
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-S159K	P129Q-S130G-G131S-S159K	0.95	0.88	1.21	0.96
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-A116N-N117S-N118G-P129Q-S130G-G131S	A116N-N117S-N118G-P129Q-S130G-G131S	0.90	0.88	0.54	0.95
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-P129V	S24G-N25G-P129V	0.86	0.87	0.44	1.02
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	S24G-N25G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	0.87	0.86	0.83	0.12
FS2	G97A-Y217Q-N123G-A128G	N123G-A128G	0.83	0.86	1.00	0.14
FS2	G97A-G128A-Y217Q-N61P-N62Q-G100N-G102A-M124I	N61P-N62Q-G100N-G102A-M124I	0.82	0.86	5.52	0.40
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-K141E-T242R	S24G-N25G-K141E-T242R	0.90	0.85	0.65	1.10
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S87G-A88V-S89A-A116N-N117S-N118G-A144T	S87G-A88V-S89A-A116N-N117S-N118G-A144T	0.89	0.85	0.44	0.32
FS1	G97A-G128A-Y217Q-T55P-N61P-S87T-A88L-S89G-G110C-S130P	T55P-N61P-S87T-A88L-S89G-G110C-S130P	0.83	0.85	0.92	0.30
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-L75S-N76Y-A116S-N117G-N118R	L75S-N76Y-A116S-N117G-N118R	0.84	0.83	0.41	0.13
FS3	G97A-G128A-Y217Q-S145D-S159K-K213L-P239R-N240K	S145D-S159K-K213L-P239R-N240K	0.74	0.81	0.38	0.65

10

20

【0562】

(上記表の続き)

【表 25 - 10】

(上記表の続き)

表 12-4: RCL5~7及びFS1~3から生成した変異体の性能指数値						
変異体の供給源	BPN'と比較した配列	BPN' -v3: G97A-G128A-Y217Qと比較した配列	洗剤組成物1. pH 8, 16°C, BMI PI	洗剤組成物2. pH 8, 16°C, BMI PI	AAPF比のPI	洗剤組成物3. 安定性PI
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24R-S87T-A88L-S89G	S24R-S87T-A88L-S89G	0.86	0.80	0.53	0.08
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G-P129V	G23A-S24G-N25G-P129V	0.88	0.79	0.53	0.20
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-A134T-K213L	A134T-K213L	0.87	0.79	0.51	0.81
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S89Y-A273S	S89Y-A273S	0.81	0.79	0.48	0.19
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S24R-P239R	S24R-P239R	0.90	0.78	0.71	0.69
FS2	G97A-Y217Q-N123G-A128G-P129S	N123G-A128G-P129S	0.76	0.78	0.71	0.12
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S89Y-P239R	S89Y-P239R	0.77	0.76	0.38	0.90
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-A92G	S24G-N25G-A92G	0.71	0.76	0.25	0.59
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H-I115V-A228V	N61P-S63H-I115V-A228V	0.73	0.74	0.24	0.42
FNA	Y217L	A97G-A128G-Q217L	0.73	0.74	1.81	1.21
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-L75S-N76Y-P129V	L75S-N76Y-P129V	0.73	0.73	0.34	0.09
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24R-P129L	S24R-P129L	0.80	0.73	0.35	0.58
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S87G-A88V-S89A-P129Q-S182Y-S204Y-P239Q	S87G-A88V-S89A-P129Q-S182Y-S204Y-P239Q	0.69	0.73	0.90	0.36
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24R-A92G	S24R-A92G	0.75	0.73	0.28	0.44
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24R-A116S-N117G-N118R	S24R-A116S-N117G-N118R	0.81	0.72	0.48	0.58
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G-A116G-N117R	G23A-S24G-N25G-A116G-N117R	0.85	0.66	0.63	0.20
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-P129L	S24G-N25G-P129L	0.72	0.66	0.39	1.03
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-S101G	S87T-A88L-S89G-S101G	0.78	0.66	0.65	0.11
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G-P129L	G23A-S24G-N25G-P129L	0.52	0.59	0.37	0.20
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S53G-N61P-G102A-V203Y	S53G-N61P-G102A-V203Y	0.55	0.58	0.29	0.16

30

40

【0563】

(上記表の続き)

【表 25 - 11】

(上記表の続き)

表 12-4: RCL5~7及びFS1~3から生成した変異体の性能指数値

変異体の供給源	BPN'と比較した配列	BPN' -v3: G97A-G128A-Y217Qと比較した配列	洗剤組成物1. pH 8, 16°C. BMI PI	洗剤組成物2. pH 8, 16°C. BMI PI	AAPF比の PI	洗剤組成物3. 安定性PI
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-T55P-V147P	T55P-V147P	0.56	0.57	0.22	1.09
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-Y6Q-L75S-N76Y	Y6Q-L75S-N76Y	0.55	0.52	0.24	0.17
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H-V147P	N61P-S63H-V147P	0.36	0.37	0.14	0.95
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24R-V147P	S24R-V147P	0.16	0.22	0.08	0.85
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-V68C-A69G	S24G-N25G-V68C-A69G	0.21	0.18	0.06	0.71
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-N61P-L75S-N76Y-S101N-V203Y	S24G-N25G-N61P-L75S-N76Y-S101N-V203Y	0.19	0.18	0.08	0.38
FS1	G97A-G128A-Y217Q-L75S-N76Y-S78N-S101N-V203Y	L75S-N76Y-S78N-S101N-V203Y	0.13	0.12	0.05	0.72
FS1	G97A-G128A-Y217Q-L75S-N76Y-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-S130P	L75S-N76Y-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-S130P	0.04	0.04	0.07	0.73
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S101N-S130P-V203Y	S24G-N25G-S53G-S101N-S130P-V203Y	0.06	0.04	0.06	0.33
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-G47E-M50I-L75S-N76Y-S162K	G47E-M50I-L75S-N76Y-S162K	<b>0.01</b>	0.03	0.02	1.21
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S53G-T55P-S87T-A88L-S89G-S101N-S130P-V203Y	S53G-T55P-S87T-A88L-S89G-S101N-S130P-V203Y	<b>0.01</b>	0.02	0.05	0.45
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-L75S-N76Y-A128T-P129T-S130G-G131Q-S132C-A133G-A134T	S24G-N25G-L75S-N76Y-A128T-P129T-S130G-G131Q-S132C-A133G-A134T	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>	0.02	1.21
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-V147P	P129Q-S130G-G131S-V147P	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>	0.03	1.11
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S53G-T55P-N61P-L75S-N76Y-S87T-A88L-S89G-G102A-S130P-V203Y	S53G-T55P-N61P-L75S-N76Y-S87T-A88L-S89G-G102A-S130P-V203Y	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>	0.02	1.05
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S53G-T55P-N61P-L75S-N76Y-S101N-S130P-V203Y	S53G-T55P-N61P-L75S-N76Y-S101N-S130P-V203Y	0.03	<b>0.01</b>	0.02	1.03

10

20

【0564】

(上記表の続き)

本発明は、タンパク質分解活性を有するプロテアーゼ変異体を含み、変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列、並びに表12-4に列挙されるものから選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。このようなプロテアーゼ変異体は、それぞれ単離物、組み換え体、実質的な純品、又は天然に生じたものではないプロテアーゼ変異体であり得る。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくとも1つのこのようなプロテアーゼ変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられる)、並びに、少なくとも1つのこのようなプロテアーゼ変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

30

【0565】

表12-5は、16及びpH 8での洗剤組成物1のBMI微小標本アッセイ(洗剤組成物1, pH 8, 16, BMI PI)におけるシミ除去についての、並びに、LAS/EDTA(LAS/EDTA安定性PI)の安定性についての、BPN'変異体(「BPN'安定性を改善するための変異体の生産」に記載のように生成、表11-3を参照されたい)の性能指数(PI)値を提供する。アッセイは実施例1に記載のように実施した(BMI微小標本アッセイ、LAS/EDTA安定性アッセイ)。変異体の配列は、BPN'及びFNAの両方と比較して示す。すなわち、各変異体配列は、特定のアミノ酸置換変異を有するBPN'又はFNA配列である。PI値は、親FNAすなわちBPN'-Y217Lと比較して示す。

40



【表 2 6】

FNA: BPN' Y217Lと比較した配列	BPN'と比較した配列	洗剤組成物1, pH 8, 16°C, BMI PI	LAS/EDTA 安定性PI
P40E-S78N-S87D	P40E-S78N-S87D-Y217L	0.71	11.65
P40E	P40E-Y217L	0.96	8.33
T22V-S78N-Q206E-K213N	T22V-S78N-Q206E-K213N-Y217L	0.75	5.95
T22V-S78N-K213N	T22V-S78N-K213N-Y217L	0.86	5.71
S87D	S87D-Y217L	0.90	4.04
S78N	S78N-Y217L	0.87	3.86
K213N	K213N-Y217L	0.91	1.84
Q206E	Q206E-Y217L	0.86	1.76
T22V	T22V-Y217L	0.97	1.46
<b>FNA</b>	<b>Y217L</b>	<b>1.00</b>	<b>1.00</b>

【 0 5 6 6 】

本発明は、タンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、FNAと比較して安定性が改善されている、プロテアーゼ変異体を含み、変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、又は98%の同一性を有するアミノ酸配列、並びに表12-5に列挙された少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。このようなプロテアーゼ変異体は、BPN'又はBPN'-v3よりも大きなタンパク質分解活性を有し得る。このようなプロテアーゼ変異体は、それぞれ単離物、組み換え体、実質的な純品、又は天然に生じたものではないプロテアーゼ変異体であり得る。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくとも1つのこのようなプロテアーゼ変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられる)、並びに、少なくとも1つのこのようなプロテアーゼ変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【 0 5 6 7 】

表12-6は、16及びpH 8での洗剤組成物1のBMI微小標本アッセイにおけるシミ除去についての、並びに、LAS/EDTAでの安定性についての、親ライブラリ: BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q(「BPN'安定性を改善するための変異体の生産」に記載のようなもの、表11-3を参照されたい)から生成されたBPN'変異体の性能指数(PI)値を提供する。アッセイは実施例1に記載のように実施した(BMI微小標本アッセイ及びLAS/EDTA安定性アッセイ)。性能指数は、BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Qと比較して算出した。この一覧中のすべての変異のPIは、試験した少なくとも1種の特性について0.5以上は切り捨てられている。

【表 2 7】

BPN'-v3: BPN' G97A-G128A-と比較した配列Y217Q	BPN'と比較した配列	洗剤組成物1, pH 8, 16°C, BMI PI	LAS/EDTA 安定性 PI
S87D-N76D-S78N	S87D-N76D-S78N-G97A-G128A-Y217Q	0.62	2.27
P40E-S78N-S87D	P40E-S78N-S87D-G97A-G128A-Y217Q	0.21	2.18
P40E-S87D	P40E-S87D-G97A-G128A-Y217Q	0.18	2.14
S78N-P40E	S78N-P40E-G97A-G128A-Y217Q	0.80	2.03
S87D-N76D	S87D-N76D-G97A-G128A-Y217Q	0.55	1.89
P40E	P40E-G97A-G128A-Y217Q	0.84	1.79
S78N-S87D	S78N-S87D-G97A-G128A-Y217Q	0.79	1.71
S87D	S87D-G97A-G128A-Y217Q	0.78	1.20
S78N	S78N-G97A-G128A-Y217Q	0.93	1.14
BPN'-v3	G97A-G128A-Y217Q	1.00	1.00

【 0 5 6 8 】

本発明は、タンパク質分解活性を有する、及びBPN'-v3と比較して安定性が改善されている、プロテアーゼ変異体を含み、変異体は、配列番号2に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列、並びに表12-6に列挙された少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。このようなプロテアーゼ変異体は、それぞれ単離物、組み換え体、実質的な純品、又は天然に生じたものではないプロテアーゼ変異体であり得る。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくとも1つのこのようなプロテアーゼ変異体を含む組成物（クリーニング組成物が挙げられる）、並びに、少なくとも1つのこのようなプロテアーゼ変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

10

## 【0569】

表12-7は、16及びpH 8での洗剤組成物1のBMI微小標本アッセイにおけるシミ除去についての、BPN'変異体（「異なる5種の親プラスミドからのBPN'変異体の生産」に記載のように生成、表11-4を参照されたい）の性能指数（PI）値を提供する。アッセイは実施例1に記載のように実施した（BMI微小標本アッセイ）。各変異体の性能指数は、BPN'-v3：G97A-G128A-Y217Qと比較して算出した。この一覧中のすべての変異のPIは、試験した少なくとも1種の特性的について0.5以上は切り捨てられている。

## 【表28】

20

表12-7: BPN' 変異体の性能指数		
BPN'-v3 G97A-G128Aと比較した配列Y217Q	BPN'と比較した配列	洗剤組成物1, pH 8, 16°C, BMI PI
S101N	G97A-S101N-G128A-Y217Q	1.12
A137V	G97A-G128A-A137V-Y217Q	1.12
N61P	N61P-G97A-G128A-Y217Q	1.11
S130P	G97A-G128A-S130P-Y217Q	1.09
Q103N	G97A-Q103N-G128A-Y217Q	1.07
S63T	S63T-G97A-G128A-Y217Q	1.03
G102A	G97A-G102A-G128A-Y217Q	1.02
<b>BPN'-v3</b>	<b>BPN'-v3(G97A-G128A-Y217Q)</b>	<b>1.00</b>
N109D-S248R	G97A-N109D-G128A-Y217Q-S248R	0.96
S87R	S87R-G97A-G128A-Y217Q	0.95
S188D	G97A-G128A-S188D-Y217Q	0.95
S87D-S248R	S87D-G97A-G128A-Y217Q-S248R	0.94
S188D-S248R	G97A-G128A-S188D-S248R-Y217Q	0.93
S248D	G97A-G128A-S248D-Y217Q	0.86
N109D-S188D-S248R	G97A-N109D-G128A-S188D-S248R-Y217Q	0.83
N109D	G97A-N109D-G128A-Y217Q	0.81
S87R-S248R	S87R-G97A-G128A-Y217Q-S248R	0.79
N109D-S188R	G97A-N109D-G128A-S188R-Y217Q	0.77
N76D	N76D-G97A-G128A-Y217Q	0.75
S87D-N109D-S188D-S248R	S87D-G97A-N109D-G128A-S188D-S248R-Y217Q	0.58
S87R-N109D-S188D-S248R	S87R-G97A-N109D-G128A-S188D-Y217Q-S248R	0.55
S87R-S188R-S248R	S87R-G97A-G128A-S188R-Y217Q-S248R	0.52
A187D	G97A-G128A-A187D-Y217Q	0.48
N109D-S248D	G97A-N109D-G128A-Y217Q-S248D	0.47
S87R-N109R-S188R-S248R	S87R-G97A-N109R-G128A-S188R-Y217Q-S248R	0.39
F189D	G97A-G128A-F189D-Y217Q	0.31
G100N	G97A-G100N-G128A-Y217Q	0.28
S87R-N109D-S188D	S87R-G97A-N109D-G128A-S188D-Y217Q	0.24
S87D-N109D-S188D	S87D-G97A-N109D-G128A-S188D-Y217Q	0.12
S87R-S188D-S248D	S87R-G97A-G128A-S188D-S248D-Y217Q	0.09
N62D	N62D-G97A-G128A-Y217Q	0.09
S87D-N109D-S188D-S248D	S87D-G97A-N109D-G128A-S188D-Y217Q-S248D	0.08

30

40

## 【0570】

本発明は、タンパク質分解活性を有するプロテアーゼ変異体を含み、変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92

50

％、93％、94％、95％、96％、97％又は98％の同一性を有するアミノ酸配列、並びに表12-7に列挙されるものから選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。このようなプロテアーゼ変異体は、それぞれ単離物、組み換え体、実質的な純品、又は天然に生じたものではないプロテアーゼ変異体であり得る。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくとも1つのこのようなプロテアーゼ変異体を含む組成物（クリーニング組成物が挙げられる）、並びに、少なくとも1つのこのようなプロテアーゼ変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0571】

表12-8は、16及びpH 8での洗剤組成物1のBMI微小標本アッセイを用い、シミ除去についての、BPN'変異体（実施例3に記載の「コンビナトリアルライブラリの作成及び変異体BPN'-v3+S78Nのクリーニング性能」で記載されるように生成）の性能指数（PI）値を提供する。アッセイは実施例1に記載のように実施した（BMI微小標本アッセイ）。各変異体の性能指数は、BPN'-S78N-G97A-G128A-Y217Qと比較して算出した。0.01未満のPI値は修飾され、太字のイタリック体で「0.01」として記される。

【表29】

表12-8: BPN' 変異体の性能指数値			
変異体	BPN' と比較した配列	BPN' -v3: G97A-G128A-と比較した配列Y217Q	洗剤組成物1, pH 8, 16°C, BMI PI
v3/S78N/L267V	S78N-G97A-G128A-Y217Q-L267V	S78N-L267V	1.12
v3/S78N/S161P	S78N-G97A-G128A-Y217Q-S161P	S78N-S161P	1.05
v3/S78N/I115V	S78N-G97A-G128A-Y217Q-I115V	S78N-I115V	1.04
v3/S78N/A273S	S78N-G97A-G128A-Y217Q-A273S	S78N-A273S	1.03
v3/S78N/G211T	S78N-G97A-G128A-Y217Q-G211T	S78N-G211T	1.00
<b>V3+S78N</b>	<b>S78N-G97A-G128A-Y217Q</b>	<b>S78N</b>	<b>1.00</b>
v3/S78N/I111V	S78N-G97A-G128A-Y217Q-I111V	S78N-I111V	0.98
v3/S78N/V147L	S78N-G97A-G128A-Y217Q-V147L	S78N-V147L	0.97
v3/S78N/I108V	S78N-G97A-G128A-Y217Q-I108V	S78N-I108V	0.97
v3/S78N/S89Y	S78N-G97A-G128A-Y217Q-S89Y	S78N-S89Y	0.94
v3/S78N/A138T	S78N-G97A-G128A-Y217Q-A138T	S78N-A138T	0.92
v3/S78N/P172V	S78N-G97A-G128A-Y217Q-P172V	S78N-P172V	0.74
v3/S78N/Q59G	S78N-G97A-G128A-Y217Q-Q59G	S78N-Q59G	0.64
GcM96	G97A-G128A-Y217Q-P129T-V147Q-S159D-S161P-S183T-Q185T-G211A-S224A	P129T-V147Q-S159D-S161P-S183T-Q185T-G211A-S224A	0.57
GcM91	G97A-G128A-Y217Q-Q059V-I108V-V147Q-G211A-N252Q	Q059V-I108V-V147Q-G211A-N252Q	0.55
v3/S78N/Y167A	S78N-G97A-G128A-Y217Q-Y167A	S78N-Y167A	0.53
v3/S78N/A92G	S78N-G97A-G128A-Y217Q-A92G	S78N-A92G	0.49
v3/S78N/P129L	S78N-G97A-G128A-Y217Q-P129L	S78N-P129L	0.48
GcM92	G97A-G128A-Y217Q-N061A-S087E-M124I-S161P-S224A	N061A-S087E-M124I-S161P-S224A	0.36
v3/S78N/N62Q	S78N-G97A-G128A-Y217Q-N62Q	S78N-N62Q	0.27
v3/S78N/V68A	S78N-G97A-G128A-Y217Q-V68A	S78N-V68A	0.24
GcM94	G97A-G128A-Y217Q-S063T-S101A-L126V-S183T-T244N	S063T-S101A-L126V-S183T-T244N	0.12
v3/S78N/M124T	S78N-G97A-G128A-Y217Q-M124T	S78N-M124T	0.05
GcM95	G97A-G128A-Y217Q-P040L-S053G-Q059V-N061A-N062Q-S063T-S087E-G100N	P040L-S053G-Q059V-N061A-N062Q-S063T-S087E-G100N	<b>0.01</b>
GcM93	G97A-G128A-Y217Q-N062Q-G100N-S125A-S159D-N240S	N062Q-G100N-S125A-S159D-N240S	<b>0.01</b>
GcM100	G97A-G128A-Y217Q-V68A-G102A-G211A-S125A	V68A-G102A-G211A-S125A	<b>0.01</b>
GcM90	G97A-G128A-Y217Q-S053G-V068A-G102A-P129T-Q185T	S053G-V068A-G102A-P129T-Q185T	<b>0.01</b>

【0572】

本発明は、タンパク質分解活性を有するプロテアーゼ変異体を含み、変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60％、70％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％又は98％の同一性を有するアミノ酸配列、並びに表12-8に列挙されるものから選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。このようなプロテアーゼ変異体は、それぞれ単離物、組み換え体、実質的な純品、又は天然に生じたものではないプロテアーゼ変異体であり得る。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくとも1つのこのようなプロテアーゼ変異体を含む組成物（クリーニング組成物が挙げられる）、並びに、少なくとも1つのこのようなプロテアー

ゼ変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0573】

表12-9は、16及びpH 8での洗剤組成物2でのBMI微小標本アッセイにおける、シミ除去についての、並びに、洗剤組成物3で測定される安定性についての、BPN'単独変異体(PCT出願番号PCT/US09/46156(2009年6月3日出願、記載は本明細書に参照により組み込まれる)に記載のような融合PCRを用いて構築)の性能指数(PI)値を提供する。AAPF加水分解による比活性についてのPI値(AAPF比のPI)を測定した。すべてのアッセイは実施例1に記載のように実施した。性能指数値はBPN野生型と比較して算出した。0.01未満のPI値は、太字のイタリック体で「0.01」として示す。「洗剤組成物(Det. Comp.)」は洗剤組成物を意味する。

【表 3 0】

表12-9: BPN' 単独変異体の性能指数値			
BPN' 変異体	洗剤組成物2, pH 8, 16°C, BMI PI	AAPF比のPI	洗剤組成物3, 安定性PI
S182E	1.34	1.05	0.50
N109I	1.28	1.22	0.20
N117H	1.15	0.25	0.20
K237D	1.15	0.60	0.70
L257Q	1.14	0.94	0.80
P225N	1.13	1.02	0.70
S105H	1.11	1.07	<b>0.01</b>
S236I	1.10	0.58	0.90
L235H	1.10	0.65	0.70
S249E	1.07	0.72	0.30
N76E	1.07	0.76	0.20
S145N	1.06	1.16	1.10
N243D	1.05	1.03	0.90
R247N	1.04	1.04	0.50
E195N	1.04	1.05	0.40
A98K	1.03	0.75	0.70
S182N	0.99	1.14	0.90
S161H	0.97	1.07	0.90
G83H	0.95	0.72	0.60
G131D	0.95	1.11	1.30
T71C	0.93	1.00	1.30
K136Q	0.93	1.02	0.80
P40D	0.93	1.20	1.20
A187H	0.91	0.95	0.60
L250K	0.90	1.02	0.40
S9I	0.87	0.20	<b>0.01</b>
N76M	0.85	0.60	0.60
S132D	0.85	0.88	0.70
Q19F	0.83	0.47	0.30
E112H	0.83	1.02	<b>0.01</b>
S249P	0.80	1.02	0.50
S53D	0.78	0.29	0.10
V68E	0.78	0.59	1.70
D41I	0.72	1.15	0.90
K43H	0.70	0.28	0.10
V4H	0.66	0.37	0.60
A13Y	0.64	0.48	<b>0.01</b>
N62P	0.61	0.60	1.30
L196E	0.56	0.70	0.70
V44D	0.51	0.18	<b>0.01</b>

【0574】

本発明は、タンパク質分解活性を有するプロテアーゼ変異体を含み、変異体は、配列番号2の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92

10

20

30

40

50

%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列、並びに表12-9に列挙されるものから選択される少なくとも1つの置換を含み、ここで、変異体の位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。このようなプロテアーゼ変異体は、それぞれ単離物、組み換え体、実質的な純品、又は天然に生じたものではないプロテアーゼ変異体であり得る。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくとも1つのこのようなプロテアーゼ変異体を含む組成物（クリーニング組成物が挙げられる）、並びに、少なくとも1つのこのようなプロテアーゼ変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0575】

（実施例13）

液体洗濯洗剤組成物

この実施例では、液体洗濯洗剤組成物についての様々な配合物を提供する。本発明の以下の液体洗濯洗剤組成物は、下記に示すように調製される。これらの配合物のそれぞれにおいて、本明細書で提供される少なくとも1つのプロテアーゼ変異体は、約0.0001～約10重量%の濃度で含まれる。一部の代替的な態様では、必要性に応じ、配合者により決定されるものとして、他の濃度での使用も見出される。

【表 3 1】

表13-1: 液体洗濯洗剤組成物					
化合物	配合物				
	I	II	III	IV	V
LAS	24.0	32.0	6.0	3.0	6.0
NaC <sub>16</sub> ~C <sub>17</sub> HSAS	—	—	—	5.0	—
C <sub>12</sub> ~C <sub>15</sub> AE <sub>1.8</sub> S	—	—	8.0	7.0	5.0
C <sub>8</sub> ~C <sub>10</sub> プロピルジメチルアミン	2.0	2.0	2.0	2.0	1.0
C <sub>12</sub> ~C <sub>14</sub> アルキルジメチルアミノキシド	—	—	—	—	2.0
C <sub>12</sub> ~C <sub>15</sub> AS	—	—	17.0	—	8.0
CFAA	—	5.0	4.0	4.0	3.0
C <sub>12</sub> ~C <sub>14</sub> 脂肪族アルコールエトキシレート	12.0	6.0	1.0	1.0	1.0
C <sub>12</sub> ~C <sub>18</sub> 脂肪酸	3.0	—	4.0	2.0	3.0
クエン酸(無水物)	4.5	5.0	3.0	2.0	1.0
DETPMP	—	—	1.0	1.0	0.5
モノエタノールアミン	5.0	5.0	5.0	5.0	2.0
水酸化ナトリウム	—	—	2.5	1.0	1.5
1N HCl水溶液	#1	#1	—	—	—
プロパンジオール	12.7	14.5	13.1	10.	8.0
エタノール	1.8	2.4	4.7	5.4	1.0
DTPA	0.5	0.4	0.3	0.4	0.5
ペクチンリアーゼ	—	—	—	0.005	—
アミラーゼ	0.001	0.002	—	—	—
セルラーゼ	—	—	0.0002	—	0.0001
リパーゼ	0.1	—	0.1	—	0.1
NprE(任意)	0.05	0.3	—	0.5	0.2
PMN	—	—	0.08	—	—
プロテアーゼA(任意)	—	—	—	—	0.1
アルドースオキシダーゼ	—	—	0.3	—	0.003
ZnCl <sub>2</sub>	0.1	0.05	0.05	0.05	0.02
ギ酸カルシウム	0.05	0.07	0.05	0.06	0.07
DETBCHD	—	—	0.02	0.01	—
SRP1	0.5	0.5	—	0.3	0.3
ホウ酸	—	—	—	—	2.4
キシレンスルホン酸ナトリウム	—	—	3.0	—	—
クメンスルホン酸ナトリウム	—	—	—	0.3	0.5
DC 3225C	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
2-ブチル-オクタノール	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03
増白剤1	0.12	0.10	0.18	0.08	0.10
100%までの残部香料/染料及び/又は水					

## 【0576】

#1: 1NのHCl水溶液を添加して、配合物の正味pHを約3~約5の範囲に調整。

## 【0577】

表13-1の配合物(I)~(II)のpHは約5~約7であり、表13-1の配合物(III)~(V)のpHは約7.5~約8.5である。

## 【0578】

(実施例14)

食器手洗い用液体洗剤組成物

この実施例では、様々な食器手洗い用液体洗剤配合物が提供される。以下の本発明の食器手洗い用液体洗剤組成物が、下記に提供される。これらの配合物のそれぞれにおいて、本明細書に提供される少なくとも1つのプロテアーゼ変異体が約0.0001~約10重

10

20

30

40

50

量パーセントの濃度で含まれる。一部の代替的態様では、配合者に必要に基づいて判定されるように他の濃度の使用が見出される。

【表 3 2】

表14-1: 食器手洗い用液体洗剤組成物						
化合物	配合物					
	I	II	III	IV	V	VI
C <sub>12</sub> ~C <sub>15</sub> AE <sub>1.9</sub> S	30.0	28.0	25.0	—	15.0	10.0
LAS	—	—	—	5.0	15.0	12.0
パラフィンスルホネート	—	—	—	20.0	—	—
C <sub>10</sub> ~C <sub>18</sub> アルキルジメチルアミノオキシド	5.0	3.0	7.0	—	—	—
ベタイン	3.0	—	1.0	3.0	1.0	—
C <sub>12</sub> ポリ-OH脂肪酸アミド	—	—	—	3.0	—	1.0
C <sub>14</sub> ポリ-OH脂肪酸アミド	—	1.5	—	—	—	—
C <sub>11</sub> E <sub>9</sub>	2.0	—	4.0	—	—	20.0
DTPA	—	—	—	—	0.2	—
クエン酸三ナトリウム二水和物	0.25	—	—	0.7	—	—
ジアミン	1.0	5.0	7.0	1.0	5.0	7.0
MgCl <sub>2</sub>	0.25	—	—	1.0	—	—
nprE(任意)	0.02	0.01	—	0.01	—	0.05
PMN	—	—	0.03	—	0.02	—
プロテアーゼA(任意)	—	0.01	—	—	—	—
アミラーゼ	0.001	—	—	0.002	—	0.001
アルドースオキシダーゼ	0.03	—	0.02	—	0.05	—
クメンスルホン酸ナトリウム	—	—	—	2.0	1.5	3.0
PAAC	0.01	0.01	0.02	—	—	—
DETBCHD	—	—	—	0.01	0.02	0.01
100%までの残部香料/染料及び/又は水						

【 0 5 7 9 】

表 1 4 - 1 の配合物 ( I ) ~ ( V I ) の pH は、約 8 ~ 約 1 1 である。

【 0 5 8 0 】

( 実施例 1 5 )

液体自動食器洗浄洗剤組成物

この実施例では、様々な液体自動食器洗浄洗剤配合物が提供される。以下の本発明の食器手洗い用液体洗剤組成物が、下記に提供される。これらの配合物のそれぞれにおいて、本明細書で提供される少なくとも一つのプロテアーゼ変異体は、約 0 . 0 0 0 1 ~ 約 1 0 重量 % の濃度で含まれる。一部の代替的な態様では、必要性に応じ、配合者により決定されるものとして、他の濃度での使用も見出される。

10

20

30



【表 3 3】

表15-1:液体自動食器洗浄洗剤組成物					
化合物	配合物				
	I	II	III	IV	V
STPP	16	16	18	16	16
硫酸カリウム	—	10	8	—	10
1, 2-プロパンジオール	6. 0	0. 5	2. 0	6. 0	0. 5
ホウ酸	—	—	—	4. 0	3. 0
CaCl <sub>2</sub> 二水和物	0. 04	0. 04	0. 04	0. 04	0. 04
非イオン性	0. 5	0. 5	0. 5	0. 5	0. 5
nprE(任意)	0. 1	0. 03	—	0. 03	—
PMN	—	—	0. 05	—	0. 06
プロテアーゼB(任意)	—	—	—	0. 01	—
アミラーゼ	0. 02	—	0. 02	0. 02	—
アルドースオキシダーゼ	—	0. 15	0. 02	—	0. 01
ガラクトースオキシダーゼ	—	—	0. 01	—	0. 01
PAAC	0. 01	—	—	0. 01	—
DETBCHD	—	0. 01	—	—	0. 01
100%までの残部香料/染料及び/又は水					

10

20

## 【 0 5 8 1 】

( 実施例 1 6 )

顆粒及び/又はタブレット洗濯組成物

この実施例は、顆粒及び/又はタブレット洗濯洗剤のための様々な配合物を提供する。顆粒又はタブレットの形態であり得る以下の本発明の洗濯組成物が下記に提供される。これらの配合物のそれぞれにおいて、本明細書で提供される少なくとも1つのプロテアーゼ変異体は、約0.0001~約10重量%の濃度で含まれる。一部の代替的な態様では、必要性に応じ、配合者により決定されるものとして、他の濃度での使用も見出される。

【表 3 4】

表16-1: 顆粒及び／又はタブレット洗濯組成物					
化合物	配合物				
	I	II	III	IV	V
ベース製品					
C <sub>14</sub> ~C <sub>15</sub> AS又はTAS	8.0	5.0	3.0	3.0	3.0
LAS	8.0	—	8.0	—	7.0
C <sub>12</sub> ~C <sub>15</sub> AE <sub>3</sub> S	0.5	2.0	1.0	—	—
C <sub>12</sub> ~C <sub>15</sub> E <sub>5</sub> 又はE <sub>3</sub>	2.0	—	5.0	2.0	2.0
QAS	—	—	—	1.0	1.0
ゼオライトA	20.0	18.0	11.0	—	10.0
SKS-6(乾燥添加)	—	—	9.0	—	—
MA/AA	2.0	2.0	2.0	—	—
AA	—	—	—	—	4.0
クエン酸三ナトリウム・2H <sub>2</sub> O	—	2.0	—	—	—
クエン酸(無水物)	2.0	—	1.5	2.0	—
DTPA	0.2	0.2	—	—	—
EDDS	—	—	0.5	0.1	—
HEDP	—	—	0.2	0.1	—
PB1	3.0	4.8	—	—	4.0
過炭酸塩	—	—	3.8	5.2	—
NOBS	1.9	—	—	—	—
NACA OBS	—	—	2.0	—	—
TAED	0.5	2.0	2.0	5.0	1.00
BB1	0.06	—	0.34	—	0.14
BB2	—	0.14	—	0.20	—
無水炭酸ナトリウム	15.0	18.0	—	15.0	15.0
硫酸塩	5.0	12.0	5.0	17.0	3.0
ケイ酸塩	—	1.0	—	—	8.0
nprE(任意)	0.03	—	0.1	0.06	—
PMN	—	0.05	—	—	0.1
プロテアーゼB(任意)	—	0.01	—	—	—
プロテアーゼC(任意)	—	—	—	0.01	—
リパーゼ	—	0.008	—	—	—
アミラーゼ	0.001	—	—	—	0.001
セルラーゼ	—	0.0014	—	—	—
ペクチンリアーゼ	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
アルドースオキシダーゼ	0.03	—	0.05	—	—
PAAC	—	0.01	—	—	0.05
100%までの残部水分及び／又は微量成分*					

## 【0582】

\* 香料、染料、増白剤 / SRP1 / カルボキシメチルセルロースナトリウム / 光漂白剤 / MgSO<sub>4</sub> / PVPVI / 抑泡剤 / 高分子量PEG / 粘土。

## 【0583】

(実施例17)

液体洗濯洗剤

この実施例は、液体洗濯洗剤用の様々な配合を提供する。以降、本発明の液体洗濯洗剤配合物が提供される。これらの配合物のそれぞれにおいて、本明細書で提供される少なくとも1つのプロテアーゼ変異体は、約0.0001~約10重量%の濃度で含まれる。—

10

20

30

40

50

部の代替的な態様では、必要性に応じ、配合者により決定されるものとして、他の濃度での使用も見出される。

【表 3 5】

表17-1:液体洗濯洗剤						
化合物	配合物					
	I	II	III	IV	V	VI
LAS	11.5	11.5	9.0	—	4.0	—
C <sub>12</sub> ~C <sub>15</sub> AE <sub>2.85</sub> S	—	—	3.0	18.0	—	16.0
C <sub>14</sub> ~C <sub>15</sub> E <sub>2.5</sub> S	11.5	11.5	3.0	—	16.0	—
C <sub>12</sub> ~C <sub>13</sub> E <sub>9</sub>	—	—	3.0	2.0	2.0	1.0
C <sub>12</sub> ~C <sub>13</sub> E <sub>7</sub>	3.2	3.2	—	—	—	—
CFAA	—	—	—	5.0	—	3.0
TPKFA	2.0	2.0	—	2.0	0.5	2.0
クエン酸(無水物)	3.2	3.2	0.5	1.2	2.0	1.2
ギ酸カルシウム	0.1	0.1	0.06	0.1	—	—
ギ酸ナトリウム	0.5	0.5	0.06	0.1	0.05	0.05
ZnCl <sub>2</sub>	0.1	0.05	0.06	0.03	0.05	0.05
クメンシルホン酸ナトリウム(Na Culmene Sulfonate)	4.0	4.0	1.0	3.0	1.2	—
ホウ酸塩	0.6	0.6	1.5	—	—	—
水酸化ナトリウム	6.0	6.0	2.0	3.5	4.0	3.0
エタノール	2.0	2.0	1.0	4.0	4.0	3.0
1,2-プロパンジオール	3.0	3.0	2.0	8.0	8.0	5.0
モノエタノールアミン	3.0	3.0	1.5	1.0	2.5	1.0
TEPAE	2.0	2.0	—	1.0	1.0	1.0
nprE(任意)	0.03	0.05	—	0.03	—	0.02
PMN	—	—	0.01	—	0.08	—
プロテアーゼA(任意)	—	—	0.01	—	—	—
リパーゼ	—	—	—	0.002	—	—
アミラーゼ	—	—	—	—	0.002	—
セルラーゼ	—	—	—	—	—	0.0001
ペクチンリナーゼ	0.005	0.005	—	—	—	—
アルドースオキシダーゼ	0.05	—	—	0.05	—	0.02
ガラクトースオキシダーゼ	—	0.04	—	—	—	—
PAAC	0.03	0.03	0.02	—	—	—
DETCHD	—	—	—	0.02	0.01	—
SRP 1	0.2	0.2	—	0.1	—	—
DTPA	—	—	—	0.3	—	—
PVNO	—	—	—	0.3	—	0.2
増白剤1	0.2	0.2	0.07	0.1	—	—
シリコーン消泡剤	0.04	0.04	0.02	0.1	0.1	0.1
100%までの残部香料/染料及び/又は水						

## 【 0 5 8 4 】

( 実施例 1 8 )

## 高密度食器洗浄洗剤

この実施例は、高密度食器洗浄洗剤についての様々な配合物を提供する。以下の本発明のコンパクト高密度食器洗浄洗剤は、下記に提供される。これらの配合物のそれぞれにおいて、本明細書で提供される少なくとも1つのプロテアーゼ変異体は、約0.0001~約10重量%の濃度で含まれる。一部の代替的な態様では、必要性に応じ、配合者により決定されるものとして、他の濃度での使用も見出される。

【表 3 6】

表18-1:高密度食器洗浄洗剤						
化合物	配合物					
	I	II	III	IV	V	VI
STPP	—	45.0	45.0	—	—	40.0
クエン酸三ナトリウム・2H <sub>2</sub> O	17.0	—	—	50.0	40.2	—
炭酸ナトリウム	17.5	14.0	20.0	—	8.0	33.6
重炭酸塩	—	—	—	26.0	—	—
ケイ酸塩	15.0	15.0	8.0	—	25.0	3.6
メタケイ酸塩	2.5	4.5	4.5	—	—	—
PB1	—	—	4.5	—	—	—
PB4	—	—	—	5.0	—	—
過炭酸塩	—	—	—	—	—	4.8
BB1	—	0.1	0.1	—	0.5	—
BB2	0.2	0.05	—	0.1	—	0.6
非イオン性	2.0	1.5	1.5	3.0	1.9	5.9
HEDP	1.0	—	—	—	—	—
DETPMP	0.6	—	—	—	—	—
PAAC	0.03	0.05	0.02	—	—	—
パラフィン	0.5	0.4	0.4	0.6	—	—
nprE(任意)	0.072	0.053	—	0.026	—	0.01
PMN	—	—	0.053	—	0.059	—
プロテアーゼB(任意)	—	—	—	—	—	0.01
アミラーゼ	0.012	—	0.012	—	0.021	0.006
リパーゼ	—	0.001	—	0.005	—	—
ペクチンリアーゼ	0.001	0.001	0.001	—	—	—
アルドースオキシダーゼ	0.05	0.05	0.03	0.01	0.02	0.01
BTA	0.3	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3
ポリカルボキシレート	6.0	—	—	—	4.0	0.9
香料	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2
100%までの残部水分及び／又は微量成分*						

## 【0585】

\* 香料 / 染料 / SRP1 / カルボキシメチルセルロースナトリウム / 光漂剤 / MgSO<sub>4</sub> / PVPVI / 抑泡剤 / 高分子量PEG / 粘土。

## 【0586】

表18-1の配合物(I)~(VI)のpHは、約9.6~約11.3である。

## 【0587】

(実施例19)

タブレット洗剤組成物

この実施例は、様々なタブレット洗剤配合物を提供する。以下の本発明のタブレット洗剤組成物は、標準的な12ヘッドロータリープレスを用いて、13KN/cm<sup>2</sup>の圧力にて顆粒食器洗浄洗剤組成物を圧縮することにより、調製される。これらの配合物のそれぞれにおいて、本明細書で提供される少なくとも1つのプロテアーゼ変異体は、約0.0001~約10重量%の濃度で含まれる。一部の代替的な態様では、必要性に応じ、配合者により決定されるものとして、他の濃度での使用も見出される。

【表 3 7】

化合物	配合物							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
STPP	—	48.8	44.7	38.2	—	42.4	46.1	46.0
クエン酸三ナトリウム・2H <sub>2</sub> O	20.0	—	—	—	35.9	—	—	—
炭酸ナトリウム	20.0	5.0	14.0	15.4	8.0	23.0	20.0	—
ケイ酸塩	15.0	14.8	15.0	12.6	23.4	2.9	4.3	4.2
リパーゼ	0.001	—	0.01	—	0.02	—	—	—
プロテアーゼB(任意)	0.01	—	—	—	—	—	—	—
プロテアーゼC(任意)	—	—	—	—	—	0.01	—	—
nprE(任意)	0.01	0.08	—	0.04	—	0.023	—	0.05
PMN	—	—	0.05	—	0.052	—	0.023	—
アミラーゼ	0.012	0.012	0.012	—	0.015	—	0.017	0.002
ペクチンリアーゼ	0.005	—	—	0.002	—	—	—	—
アルドースオキシダーゼ	—	0.03	—	0.02	0.02	—	0.03	—
PB1	—	—	3.8	—	7.8	—	—	4.5
過炭酸塩	6.0	—	—	6.0	—	5.0	—	—
BB1	0.2	—	0.5	—	0.3	0.2	—	—
BB2	—	0.2	—	0.5	—	—	0.1	0.2
非イオン性	1.5	2.0	2.0	2.2	1.0	4.2	4.0	6.5
PAAC	0.01	0.01	0.02	—	—	—	—	—
DETCHD	—	—	—	0.02	0.02	—	—	—
TAED	—	—	—	—	—	2.1	—	1.6
HEDP	1.0	—	—	0.9	—	0.4	0.2	—
DETPMP	0.7	—	—	—	—	—	—	—
パラフィン	0.4	0.5	0.5	0.5	—	—	0.5	—
BTA	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	—
ポリカルボキシレート	4.0	—	—	—	4.9	0.6	0.8	—
PEG 400-30,000	—	—	—	—	—	2.0	—	2.0
グリセロール	—	—	—	—	—	0.4	—	0.5
香料	—	—	—	0.05	0.2	0.2	0.2	0.2
100%までの残部水分及び/又は微量成分*								

## 【0588】

\* 増白剤 / S R P 1 / カルボキシメチルセルロースナトリウム / 光漂白剤 / M g S O<sub>4</sub> / P V P V I / 抑泡剤 / 高分子量 P E G / 粘土。

## 【0589】

表19-1の配合物(I)~(VII)のpHは約10~約11.5であり、表19-1の配合物(VIII)のpHは8~10である。表19-1の配合物(I)~(VII)のタブレット重量は、約20グラム~約30グラムである。

## 【0590】

(実施例20)

## 液体硬質表面クリーニング洗剤

この実施例は、液体硬質表面クリーニング洗剤についての様々な配合物を提供する。以下の本発明の液体硬質表面クリーニング洗剤組成物は、下記に適用される。これらの配合物のそれぞれにおいて、本明細書で提供される少なくとも1つのプロテアーゼ変異体は、約0.0001~約10重量%の濃度で含まれる。一部の代替的な態様では、必要性に応じ、配合者により決定されるものとして、他の濃度での使用も見出される。

10

20

30

40

【表 3 8】

化合物	配合物						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
C <sub>9</sub> ~C <sub>11</sub> E <sub>5</sub>	2.4	1.9	2.5	2.5	2.5	2.4	2.5
C <sub>12</sub> ~C <sub>14</sub> E <sub>5</sub>	3.6	2.9	2.5	2.5	2.5	3.6	2.5
C <sub>7</sub> ~C <sub>9</sub> E <sub>6</sub>	—	—	—	—	8.0	—	—
C <sub>12</sub> ~C <sub>14</sub> E <sub>21</sub>	1.0	0.8	4.0	2.0	2.0	1.0	2.0
LAS	—	—	—	0.8	0.8	—	0.8
クメンスルホン酸ナトリウム	1.5	2.6	—	1.5	1.5	1.5	1.5
Isachem(登録商標)AS	0.6	0.6	—	—	—	0.6	—
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.6	0.13	0.6	0.1	0.2	0.6	0.2
クエン酸三ナトリウム・2H <sub>2</sub> O	0.5	0.56	0.5	0.6	0.75	0.5	0.75
NaOH	0.3	0.33	0.3	0.3	0.5	0.3	0.5
脂肪酸	0.6	0.13	0.6	0.1	0.4	0.6	0.4
2-ブチル-オクタノール	0.3	0.3	—	0.3	0.3	0.3	0.3
PEG DME-2000(登録商標)	0.4	—	0.3	0.35	0.5	—	—
PVP	0.3	0.4	0.6	0.3	0.5	—	—
MME PEG(2000)(登録商標)	—	—	—	—	—	0.5	0.5
Jeffamine(登録商標)ED-2001	—	0.4	—	—	0.5	—	—
PAAC	—	—	—	0.03	0.03	0.03	—
DETBCHD	0.03	0.05	0.05	—	—	—	—
nprE(任意)	0.07	—	0.08	0.03	—	0.01	0.04
PMN	—	0.05	—	—	0.06	—	—
プロテアーゼB(任意)	—	—	—	—	—	0.01	—
アミラーゼ	0.12	0.01	0.01	—	0.02	—	0.01
リパーゼ	—	0.001	—	0.005	—	0.005	—
ペクチンリアーゼ	0.001	—	0.001	—	—	—	0.002
ZnCl <sub>2</sub>	0.02	0.01	0.03	0.05	0.1	0.05	0.02
ギ酸カルシウム	0.03	0.03	0.01	—	—	—	—
PB1	—	4.6	—	3.8	—	—	—
アルドースオキシダーゼ	0.05	—	0.03	—	0.02	0.02	0.05
100%までの残部香料/染料及び/又は水							

【 0 5 9 1 】

表 2 0 - 1 の配合物 ( I ) ~ ( V I I ) の pH は、約 7 . 4 ~ 約 9 . 5 である。

【 0 5 9 2 】

( 実施例 2 1 )

B P N ' - v 3 6 ポリペプチド変異体のクリーニング性能

骨格鎖若しくは親配列として B P N ' - v 3 6 変異体を用いて、アミノ酸置換を 2 つ含む B P N ' - v 3 6 ポリペプチド変異体を標準融合 P C R により構築した。この目的のため、所望の置換をコードするように調製された変異原性プライマーにより、2 つ又は 3 つの部分的に重複している断片を増幅させた。P C R 増幅反応は、上記パート I の実施例 7 に記載のように実施した。以下の B P N ' - v 3 6 二重変異体 ( すなわち、以下のアミノ酸置換を有する B P N ' - v 3 6 ) を構築した : Q 0 1 9 R - N 0 2 5 D , A 0 0 1 Y - Q 2 7 5 R , V 0 0 4 A - S 2 4 9 N , V 0 0 4 E - S 2 6 0 P , V 0 0 4 A - T 5 5 A , Y 0 0 6 F - S 2 4 9 C , Y 0 0 6 D - T 5 5 A , V 0 0 8 L - Q 2 7 5 R , Q 0 1 0 R - Q 2 7 5 K , L 0 1 6 Q - Q 2 1 7 H , H 0 1 7 R - T 1 5 8 A , S 1 8 3 D - Q 2 0 6 R , P 2 1 0 S - N 2 1 2 D , S 0 1 8 Y - V 2 0 3 A , S 0 1 8 K - V 2 0 3 I , Y 0 2 1 H - D 2 5 9 G , Y 0 2 1 H - D 2 5 9 R , K 0 2 7 R - N 2 6 9 D , K 0 2 7 R - N 2 6 9 T , S 0 3 7 P - S 2 6 0 F , S 0 3 7 T - S 2 6 0 P , D 0 4 1 E - N 0 7 7 D , D 0 4 1 G - N 0 7 7 E , G 1 6 6 V - S 1 8 3 T , N 2 5 2 S - L 2 5 7 H , V 0 4 4 A - Q 2 0 6 H , V 0 4 4 A - Q 2 0 6 K , V 0 4 4 A - Q 2 0 6 R , N 0 7 6

10

20

30

40

50

T - N 2 1 2 D , N 0 7 6 P - N 2 1 2 S , N 0 7 7 D - N 2 5 2 D , N 0 7 7 D - N 2 5 2 T , K 1 4 1 I - S 2 4 8 N , T 1 5 8 I - D 2 5 9 N , T 1 5 8 A - D 2 5 9 P , S 1 6 1 E - Q 1 8 5 H , K 2 3 7 M - H 2 3 8 R , G 1 6 0 A - D 2 5 9 G , G 1 6 0 R - D 2 5 9 V , G 2 1 5 R - D 2 5 9 R , G 2 1 5 D - D 2 5 9 V , N 0 6 1 D - Q 2 0 6 R , N 0 6 1 L - Q 2 0 6 H , S 0 0 9 L - N 2 1 8 S , S 1 6 1 E - S 2 6 0 T , Q 0 1 9 A - N 1 0 9 S , T 0 2 2 S - G 1 6 6 V , Y 0 2 1 H - N 2 5 2 H , P 1 2 9 S - K 1 3 6 R , T 0 2 2 S - T 2 4 2 S , N 0 2 5 K - H 2 3 8 R , N 0 2 5 D - Q 1 8 5 R , S 0 3 7 G - Q 2 7 5 H , K 0 4 3 R - N 0 7 6 S , K 0 4 3 N - Q 2 1 7 R , K 0 4 3 N - S 1 6 3 T , T 0 5 5 A - V 1 4 7 A , N 0 6 1 K - N 2 5 2 K , N 0 6 2 Y - G 0 9 7 D , Y 0 2 1 H - V 0 8 4 E , Y 0 2 1 H - S 0 3 7 E , N 0 6 2 Y - T 2 4 4 A , K 0 2 7 E - Y 0 9 1 F , A 0 7 4 S - P 1 2 9 Q , S 2 4 9 R - Q 2 7 5 R , I 0 7 9 V - Q 2 1 7 H , A 0 9 8 T - T 1 5 8 A , K 0 2 7 R - D 1 2 0 H , Q 0 1 9 R - Q 1 8 5 R , G 1 3 1 S - K 2 6 5 N , A 1 3 3 V - D 2 5 9 N , A 1 4 4 H - T 2 4 4 A , I 0 3 5 V - K 0 4 3 N , G 1 6 0 R - T 2 4 4 A , S 1 6 1 P - T 2 5 3 A , S 1 6 3 T - Q 2 4 5 L , K 1 7 0 R - D 2 5 9 G , S 1 8 3 T - S 2 4 9 R , N 1 8 4 Y - Y 2 6 2 N , V 1 9 8 L - D 2 5 9 G , A 2 0 0 T - H 2 2 6 L , Q 2 0 6 R - S 2 6 0 P , G 2 1 1 V - T 2 4 4 A , Q 2 1 7 R - T 2 4 4 A , L 7 5 I - N 7 6 D , S 2 6 0 P - Q 2 7 5 L , S 2 6 0 P - Q 2 7 5 R , Y 2 6 2 N - Q 2 7 5 R , V 0 0 4 A - Y 0 0 6 F , H 0 1 7 L - Q 0 1 9 A , N 0 2 5 D - V 0 2 6 A , N 1 1 8 G - V 1 2 1 A , V 0 7 2 F - L 0 7 5 I , S 1 8 3 T - R 1 8 6 K , V 2 0 3 A - Q 2 1 7 R , 及び S 2 4 9 R - Y 2 6 2 H。パートIの実施例1に記載のように、これらの変異体のクリーニング性能を、pH 8及び16での洗剤組成物4のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、並びにpH 8及び16での洗剤組成物4の卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、試験した。結果は以下に提供される。

【0593】

以下のBPN'プロテアーゼ変異体：S 1 8 3 T - S 2 4 9 R , N 6 1 D - Q 2 0 6 R , Y 2 6 2 N - Q 2 7 5 R , K 4 3 R - N 7 6 S , K 1 7 0 R - D 2 5 9 G , Y 6 F - S 2 4 9 C , Q 1 9 A - N 1 0 9 S , H 1 7 L - Q 1 9 A , Q 1 9 R - Q 1 8 5 R , S 1 8 Y - V 2 0 3 A , S 1 6 1 E - S 2 6 0 T , S 1 8 K - V 2 0 3 I , V 4 A - T 5 5 A , N 2 5 2 S - L 2 5 7 H , S 2 4 9 R - Y 2 6 2 H , N 6 1 L - Q 2 0 6 H , N 1 8 4 Y - Y 2 6 2 N , Q 1 9 R - N 2 5 D , A 7 4 S - P 1 2 9 Q , K 2 7 R - D 1 2 0 H , Y 2 1 H - N 2 5 2 H , K 2 7 R - N 2 6 9 D , A 9 8 T - T 1 5 8 A , I 7 9 V - Q 2 1 7 H , S 9 L - N 2 1 8 S , V 4 A - Y 6 F , S 1 6 1 P - T 2 5 3 A , V 2 0 3 A - Q 2 1 7 R , T 2 2 S - T 2 4 2 S , N 7 6 P - N 2 1 2 S , S 3 7 T - S 2 6 0 P , T 5 5 A - V 1 4 7 A , G 1 6 0 R - T 2 4 4 A , N 2 5 D - Q 1 8 5 R , G 2 1 1 V - T 2 4 4 A , A 1 4 4 H - T 2 4 4 A , Y 2 1 H - N 2 5 2 H , A 1 Y - Q 2 7 5 R , V 1 9 8 L - D 2 5 9 G , K 1 4 1 I - S 2 4 8 N , S 1 8 3 T - R 1 8 6 K , S 1 6 1 E - Q 1 8 5 H , P 1 2 9 S - K 1 3 6 R , K 4 3 N - S 1 6 3 T , S 3 7 G - Q 2 7 5 H , N 6 2 Y - T 2 4 4 A , 及びS 2 6 0 P - Q 2 7 5 R , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Qアミノ酸配列(配列番号：6)は、pH 8及び16での洗剤組成物4のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v 3 6と比較して0.9以上1.0以下のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'よりもPI値が大きい。本発明は、本アッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに、BPN' - v 3 6と比較して0.9以上1.0以下のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号2又は配列番号6の配列と少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99

10

20

30

40

50

%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書他箇所により詳細に記載されるような、少なくとも1つのこのような変異体を含む組成物（クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない）、並びに、少なくとも1つのこのようなプロテアーゼ変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0594】

pH 8及び16での洗剤組成物4のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、向上したタンパク質分解活性を有する、並びに、BPN'と比較して1.0超～約5のPI値を有する、スブチリシンプロテアーゼ変異体も提供され、この変異体は、配列番号2又は配列番号6に対して少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ここで、この変異体は、X1Y, X4A, X6F, X9L, X17L, X18K/Y, X19A/R, X21H, X22S, X25D, X27R, X37G/T, X43N/R, X55A, X61D/L, X62Y, X74S, X76P/S, X79V, X98T, X109S, X120H, X129Q/S, X136R, X141I, X144H, X147A, X158A, X160R, X161E/P, X163T, X170R, X183T, X184Y, X185H/R, X186K, X198L, X203A/I, X206H/R, X211V, X212S, X217H/R, X218S, X242S, X244A, X248N, X249C/R, X252H/S, X253A, X257H, X259G, X260P/T, X262H/N, X269D, 及びX275H/Rからなる群から選択される少なくとも1つの置換を含む少なくとも1つの置換を含み、選択的にA1Y, V4A, Y6F, S9L, H17L, S18K/Y, Q19A/R, Y21H, T22S, N25D, K27R, S37G/T, K43N/R, T55A, N61D/L, N62Y, A74S, N76P/S, I79V, A98T, N109S, D120H, P129Q/S, K136R, K141I, A144H, V147A, T158A, G160R, S161E/P, S163T, K170R, S183T, N184Y, Q185H/R, R186K, V198L, V203A/I, Q206H/R, G211V, N212S, Q217H/R, N218S, T242S, T244A, S248N, S249C/R, N252H/S, T253A, L257H, D259G, S260P/T, Y262H/N, N269D, 及びQ275H/Rからなる群から選択される少なくとも1つの置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'（配列番号2）と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'よりもPI値が大きい。本明細書他箇所により詳細に記載されるような、少なくとも1つのこのような変異体を含む組成物（クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない）、並びに、少なくとも1つのこのようなプロテアーゼ変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0595】

以下のBPN'スブチリシンプロテアーゼ変異体：Y21H-D259G, A133V-D259N, I79V-Q217H, S18K-V203I, T158A-D259P, N61K-N252K, K43N-Q217R, T158A-D259P, Q206R-S260P, A133V-D259N, V198L-D259G, N61K-N252K, S161E-S260T, G160A-D259G, K43N-Q217R, A1Y-Q275R, A200T-H226L, Q217R-T244A, S260P-Q275R, Q206R-S260P, T158I-D259N, Q217R-T244A, L75I-N76D, S161E-Q185H, Y21H-S37E, S249R-Q275R, T158I-D259N, Y21H-S37E, N76T-N212D, S260P-Q275L, G131S-K265N, V4A-S249N, N25D-Q185R, K43R-N76S, S183D-Q206R, Q10R-Q275K, K43N-S163T, Q10R-Q275K, N25D-V26A, G131S-K265N, S2

10

20

30

40

50



60P - Q275L, K141I - S248N, L16Q - Q217H, S249R - Q275R, K27R - N269T, P210S - N212D, L75I - N76D, S183D - Q206R, N118G - V121A, G215D - D259V, N76T - N212D, K27R - N269T, N62Y - G97D, V4E - S260P, G215D - D259V, K27E - Y91F, Y6D - T55A, N77D - N252T, V4E - S260P, Y6D - T55A, N25K - H238R, V44A - Q206H, L16Q - Q217H, V44A - Q206R, V44A - Q206H, 及びS37P - S260F, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN' - S024G - S053G - S078N - S101N - G128A - Y217Qアミノ酸配列(配列番号6)は、pH 8及び16での洗剤組成物4のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v36と比較して0.5以上0.9未満のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、本アッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、BPN'と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN' - v36と比較して0.5以上0.9未満のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号2又は配列番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、又は98%、又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組の酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくとも1つのこのような変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのようなプロテアーゼ変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

10

20

#### 【0596】

以下のBPN' - v36変異体: Y21H - D259G, S183T - S249R, N61D - Q206R, Y262N - Q275R, K043R - N076S, A133V - D259N, 及びI079V - Q217H, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN' - S024G - S053G - S078N - S101N - G128A - Y217Qアミノ酸配列(配列番号6)は、pH 8及び16での洗剤組成物4の卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v36と比較して1.0超、少なくとも1.1、少なくとも1.2、少なくとも1.3、少なくとも1.4、少なくとも1.5、少なくとも1.6、少なくとも1.7、少なくとも1.8、少なくとも1.9、少なくとも2、1.0超~約10、1.0超~約8、又は1.0超~約5のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN'、BPN' - v3、及びBPN' - v36と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'、BPN' - v3及びBPN' - v36よりもPI値が大きい。本発明は、本アッセイにおいて、BPN'(配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、BPN'、BPN' - v3及びBPN' - v36と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、BPN' - v3と比較して1.0超~約5のPI値を有する、並びに/あるいは、BPN' - v36と比較して1.0超~約5のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号2又は配列番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくとも1つのこのような変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのようなプロテアーゼ変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

30

40

50

## 【 0 5 9 7 】

pH 8及び16での洗剤組成物4のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN'と比較して1.0超~約5のPI値を有する、スブチリシンプロテアーゼ変異体も提供され、この変異体は配列番号2又は配列番号6に対して少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ここで、この変異体は、X021H, X043R, X061D, X076S, X079V, X133V, X183T, X206R, X217H, X249R, X259G/N, X262N, 及びX275R, の群から選択される少なくとも1つの置換を含み、選択的に、Y021H, K043R, N061D, N076S, I079V, A133V, S183T, Q206R, Q217H, S249R, D259G/N, Y262N, 及びQ275R, の群から選択される少なくとも1つの置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、BPN' (配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、BPN'よりもPI値が大きい。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくとも1つのこのような変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのようなプロテアーゼ変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

10

## 【 0 5 9 8 】

以下のBPN' - v36変異体: K170R - D259G, S18K - V203I, Y6F - S249C, Q19A - N109S, H17L - Q19A, Q19R - Q185R, S18Y - V203A, N61D - Q206R, S161E - S260T, S18K - V203I, V4A - T55A, N252S - L257H, S249R - Y262H, N61L - Q206H, N184Y - Y262N, Q19R - N25D, S249R - Y262H, A74S - P129Q, T158A - D259P, H17L - Q19A, K27R - D120H, V4A - T55A, N61K - N252K, Y21H - N252H, K27R - N269D, K43N - Q217R, T158A - D259P, Q206R - S260P, K27R - N269D, A98T - T158A, I79V - Q217H, S9L - N218S, V4A - Y6F, S161P - T253A, V203A - Q217R, T22S - T242S, N76P - N212S, A133V - D259N, S37T - S260P, T55A - V147A, V198L - D259G, Q19R - Q185R, V4A - Y6F, Q19A - N109S, Y262N - Q275R, G160R - T244A, Q19R - N25D, N25D - Q185R, N61K - N252K, S161E - S260T, A98T - T158A, N61L - Q206H, G211V - T244A, S9L - N218S, A144H - T244A, A144H - T244A, S18Y - V203A, Y21H - N252H, A74S - P129Q, G160A - D259G, K43N - Q217R, A1Y - Q275R, A1Y - Q275R, A200T - H226L, Q217R - T244A, S260P - Q275R, Q206R - S260P, K141I - S248N, S183T - R186K, T158I - D259N, S37T - S260P, K27R - D120H, T22S - T242S, Q217R - T244A, S161E - Q185H, P129S - K136R, G211V - T244A, N76P - N212S, L75I - N76D, S161E - Q185H, Y21H - S37E, S249R - Q275R, G160A - D259G, K43N - S163T, T158I - D259N, Y21H - S37E, S37G - Q275H, S161P - T253A, N76T - N212D, S260P - Q275L, Y6F - S249C, N184Y - Y262N, G131S - K265N, V4A - S249N, N25D - Q185R, N252S - L257H, K43R - N76S, S183D - Q206R, G160R - T244A, Q10R - Q275K, S37G - Q275H, K43N - S163T, Q10R - Q275K, N25D - V26A, P129S - K136R, G131S - K265N, S260P - Q275L, K141I - S248N, T22S - G166V, N62Y -

20

30

40

50

T 2 4 4 A , L 1 6 Q - Q 2 1 7 H , S 2 4 9 R - Q 2 7 5 R , S 2 6 0 P - Q 2 7 5 R , K 2 7 R - N 2 6 9 T , P 2 1 0 S - N 2 1 2 D , L 7 5 I - N 7 6 D , S 1 8 3 D - Q 2 0 6 R , N 1 1 8 G - V 1 2 1 A , G 2 1 5 D - D 2 5 9 V , N 7 6 T - N 2 1 2 D , V 4 A - S 2 4 9 N , K 2 7 R - N 2 6 9 T , G 1 6 6 V - S 1 8 3 T , N 6 2 Y - G 9 7 D , V 4 E - S 2 6 0 P , G 2 1 5 D - D 2 5 9 V , K 2 7 E - Y 9 1 F , Y 2 1 H - D 2 5 9 R , Y 6 D - T 5 5 A , N 7 7 D - N 2 5 2 T , V 4 E - S 2 6 0 P , Y 6 D - T 5 5 A , N 7 7 D - N 2 5 2 T , Y 2 1 H - D 2 5 9 R , N 2 5 K - H 2 3 8 R , N 7 7 D - N 2 5 2 D , V 4 4 A - Q 2 0 6 H , L 1 6 Q - Q 2 1 7 H , V 7 2 F - L 7 5 I , S 3 7 P - S 2 6 0 F , V 7 2 F - L 7 5 I , N 7 7 D - N 2 5 2 D , V 4 4 A - Q 2 0 6 R , S 1 6 3 T - Q 2 4 5 L , V 4 4 A - Q 2 0 6 H , V 4 4 A - Q 2 0 6 R , S 3 7 P - S 2 6 0 F , G 2 1 5 R - D 2 5 9 R , V 4 4 A - Q 2 0 6 K , 及び V 4 4 A - Q 2 0 6 K , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含む B P N ' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q アミノ酸配列 (配列番号 6) は、pH 8 及び 16 での洗剤組成物 4 の卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、B P N ' - v 3 6 と比較して 0.5 以上 1.0 満の P I 値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号 2 の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、本アッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、並びに / あるいは、B P N ' - v 3 6 と比較して 0.5 以上 1.0 以下の P I 値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、変異体は、配列番号 2 又は配列番号 6 の配列に対して少なくとも 60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 又は 99% の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも 1 組の置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号 2 の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくとも 1 つのこのような変異体を含む組成物 (クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも 1 つのこのようなプロテアーゼ変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

#### 【 0 5 9 9 】

( 実施例 2 2 )

更なる B P N ' - v 3 6 ポリペプチド変異体のクリーニング性能

以下の P N ' - v 3 6 変異体は、クローニング用テンプレート DNA (親プラスミド) として提供されている B P N ' 発現カセットを含有する p H P L T - B P N ' - v 3 6 を用いて、DNA 2.0 (Menlo Park, CA) により合成された: N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 6 1 G - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 6 1 G - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 6 1 G - A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A , N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , A 8 8 T - N 1 0 9 Q - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 9 S - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A , N 1 0 9 S - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , A 8 8 T - N 1 0 9 S - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 9 M - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A , N 1 0 9 M - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , A 8 8 T - N 1 0 9 M - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1 2 8 S , N 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V , A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A , N 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 1 8 3 V , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 1 8 3 L , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 1 8 3 L - S 2 2 4 A , N 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1 2 8 S - S 1 8 3 L - S 2 2 4 A , A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - S 1 8 3 L - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 7 6 D - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S

2 2 4 A , N 1 0 1 Q - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 1 Q  
 - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - P 1 2 9 S - S 1 3 0 T - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0  
 9 G - A 1 2 8 S - P 1 2 9 S - S 1 3 0 T - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , S 3 3 T - A 1  
 2 8 S - N 2 1 8 S , S 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S  
 3 3 T - N 6 1 G - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - N 1  
 0 9 G - A 1 2 8 S - G 1 6 9 A - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - S 6 3 G - N 1  
 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - N 7 6 D - N 1 0 9 G - A 1  
 2 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - S 6 3 G - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - G 1  
 6 9 A - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , I 3 1 L - S 3 3 T - S 6 3 G - N 1 0 9 G - A 1 2  
 8 S - G 1 6 9 A - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - N 6 1 G - S 6 3 G - N 1 0 9  
 G - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - N 6 1 G - A 8 8 T - N 1 0 9 G  
 - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - N 6 1 G - S 6 3 G -  
 N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - G 1 6 9 A - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T  
 - N 6 1 P - S 6 3 G - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - G 1 6 9 A - N 2 1 8 S  
 - N 2 4 3 V , S 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3  
 V , S 6 3 G - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , S 6 3 G - N 1 0 9  
 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 6 1 P - S 6 3 G - N 1 0 9  
 Q - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 6 1 P - S 6 3 G - N 1 0 9 Q - A 1 2 8  
 S - G 1 3 1 H - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , A 1 G - N 6 1 P - S 6 3 G - N 1 0 9 Q -  
 A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , I 3 1 L - N 6 1 P - S 6 3 G - N  
 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 6 1 P - S 6 3 G - N  
 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V - S 2 4 9 Q , S 3 3 T -  
 T 5 5 P - N 6 1 P - S 6 3 G - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - S 2 2 4 A - N  
 2 4 3 V , S 3 3 T - T 5 5 P - N 6 1 P - S 6 3 G - A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6  
 T - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , S 3 3 T - T 5 5 P - N 6 1 P  
 - S 6 3 G - A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - S 2 2 4 A  
 - N 2 4 3 V - S 2 4 9 Q , A 1 G - I 3 1 L - S 3 3 T - T 5 5 P - N 6 1 P - S 6 3  
 G - A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - S 2 2 4 A - N 2 4  
 3 V - S 2 4 9 Q , N 6 1 P - S 6 3 G - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - G 1 6  
 9 A - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V - S 2 4 9 Q , 及び A 1 G - I 3 1 L - S 3 3 T - T 5 5  
 P - N 6 1 P - S 6 3 G - A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H  
 - G 1 6 9 A - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V - S 2 4 9 Q 。

【 0 6 0 0 】

パートIの実施例11に記載のようにタンパク質を発現させるために、変異体を増殖さ  
 せた。パートIの実施例1に記載のように、これらの変異体の性能を、pH 8及び16  
 での洗剤組成物4のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、pH 8及び16  
 での洗剤組成物4の卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、並びにAAPFアッセ  
 イにおいて、試験した。結果は以下に提供される。

【 0 6 0 1 】

以下のBPN' - v 3 6 変異体 : N 6 1 P - S 6 3 G - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - S 2  
 2 4 A - N 2 4 3 V , A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - N  
 2 4 3 V , A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - S 1 8 3 L -  
 S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 1 8 3 V , N 1 0 9 G - A 1 2 8  
 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 M - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A , A 8 8 T - N 1 0  
 9 S - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - S  
 2 2 4 A - N 2 4 3 V , A 8 8 T - N 1 0 9 M - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A -  
 N 2 4 3 V , N 1 0 9 S - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , A 8 8 T - N 1 0 9 G  
 - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V , N 1 0 1 Q - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4  
 3 V , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - P  
 1 2 9 S - S 1 3 0 T - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , 及び A 8 8 T - N 1 0 9 Q - A 1 1 6

T - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含む B P N ' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q アミノ酸配列(配列番号6)からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含む B P N ' アミノ酸配列(配列番号6)は、pH 8及び16での洗剤組成物4のB M I 微小標本クリーニングアッセイにおいて、B P N ' - v 3 6と比較して1.0超、少なくとも1.1、少なくとも1.2、少なくとも1.3、少なくとも1.4、少なくとも1.5、少なくとも1.6、少なくとも1.7、少なくとも1.8、少なくとも1.9、少なくとも2、1.0超~約10、1.0超~約8、又は1.0超~約5のP I 値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、B P N '、B P N ' - v 3、及びB P N ' - v 3 6と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、B P N '、B P N ' - v 3及びB P N ' - v 3 6よりもP I 値が大きい。本発明は、本アッセイにおいて、B P N ' (配列番号2)と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、B P N '、B P N ' - v 3及びB P N ' - v 3 6と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、B P N ' - v 3と比較して1.0超~約5のP I 値を有する、並びに/あるいは、B P N ' - v 3 6と比較して1.0超~約5のP I 値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号2又は配列番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくとも1つのこのような変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのようなプロテアーゼ変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

#### 【0602】

pH 8及び16での洗剤組成物4のB M I 微小標本クリーニングアッセイにおいて、B P N ' - v 3 6と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、B P N ' - v 3 6と比較して1.0超~約5のP I 値を有する、スブチリシンプロテアーゼ変異体も提供され、この変異体は、配列番号2又は配列番号6に対して少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ここで、この変異体は、X 6 1 G / P / S、X 6 3 G、X 8 8 T、X 1 0 1 Q、X 1 0 9 G / M / Q / S、X 1 1 4 S、X 1 1 6 T、X 1 2 8 S、X 1 2 9 S、X 1 3 0 T、X 1 5 8 S、X 1 8 3 L / V、X 2 2 4 A、X 2 4 3 V、X 2 4 8 A、及びX 2 5 6 R、の群から選択される少なくとも1つの置換を含む少なくとも1つの置換を含み、選択的に、N 6 1 G / P / S、S 6 3 G、A 8 8 T、N 1 0 1 Q、N 1 0 9 G / M / Q / S、A 1 1 4 S、A 1 1 6 T、A 1 2 8 S、P 1 2 9 S、S 1 3 0 T、T 1 5 8 S、S 1 8 3 L / V、S 2 2 4 A、N 2 4 3 V、S 2 4 8 A、及びK 2 5 6 R、の群から選択される少なくとも1つの置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、B P N ' (配列番号2)、B P N ' - v 3及びB P N ' - v 3 6と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、かつ本アッセイにおいて、B P N '、B P N ' - v 3及びB P N ' - v 3 6よりもP I 値が大きい。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくとも1つのこのような変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのようなプロテアーゼ変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

#### 【0603】

以下のB P N ' - v 3 6変異体：G 2 4 S - G 5 3 S - N 7 8 S - G 9 7 A - N 1 0 1 S - A 1 2 8 S、G 2 4 S - G 5 3 S - N 7 8 S - G 9 7 A - N 1 0 1 S、S 3 3 T - T 5 5 P - N 6 1 P - S 6 3 G - A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V、S 3 3 T - N 6 1 G - S 6 3 G - N 1 0 9 G - A 1 2 8

10

20

30

40

50

S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - S 6 3 G - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - T 5 5 P - N 6 1 P - S 6 3 G - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 6 1 P - S 6 3 G - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - G 1 6 9 A - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V - S 2 4 9 Q , S 3 3 T - N 6 1 G - A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - N 7 6 D - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - N 7 6 D - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 N - K 2 5 6 R , S 3 3 T - N 6 1 G - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S , A 1 G - N 6 1 P - S 6 3 G - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 6 1 P - S 6 3 G - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V - S 2 4 9 Q , N 6 1 P - S 6 3 G - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , S 6 3 G - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1 2 8 S , N 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1 2 8 S - S 1 8 3 L - S 2 2 4 A , N 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A , N 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 6 1 G - A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 1 8 3 L - S 2 2 4 A , N 6 1 G - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 1 8 3 L , S 3 3 T - N 7 6 D , N 1 0 9 S - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A , N 1 0 1 Q - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - P 1 2 9 S - S 1 3 0 T - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , S 6 3 G - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 9 M - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , S 6 3 G - N 1 0 9 G , N 1 0 9 G - K 2 5 6 R , S 6 3 G - N 7 6 D , S 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - G 1 6 9 A - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , 及び S 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含む BPN' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q アミノ酸配列 (配列番号6) は、pH 8 及び 16 での洗剤組成物4のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v 3 6 と比較して0.9以上1.0以下のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列の位置と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、本アッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、BPN' と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN' - v 3 6 と比較して0.9以上1.0以下のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号2又は配列番号6の配列と少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択された少なくとも1組の酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくとも1つのこのような変異体を含む組成物 (クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのようなプロテアーゼ変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

#### 【0604】

以下のBPN' - v 3 6 変異体：I 3 1 L - S 3 3 T - S 6 3 G - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - G 1 6 9 A - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , A 1 G - I 3 1 L - S 3 3 T - T 5 5 P - N 6 1 P - S 6 3 G - A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - G 1 6 9 A - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V - S 2 4 9 Q , S 3 3 T - N 6 1 G - S 6 3 G - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - G 1 6 9 A - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - S 6 3 G - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - G 1 6 9 A - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - T

10

20

30

40

50

5 5 P - N 6 1 P - S 6 3 G - A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V - S 2 4 9 Q , S 3 3 T - N 7 6 D - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S , N 7 6 D - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A , 及び S 3 3 T - N 6 1 P - S 6 3 G - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - G 1 6 9 A - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含む B P N ' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q アミノ酸配列 ( 配列番号 6 ) は、pH 8 及び 1 6 での洗剤組成物 4 の B M I 微小標本クリーニングアッセイにおいて、B P N ' - v 3 6 と比較して 0 . 5 以上 0 . 9 未満の P I 値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号 2 の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、本アッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、並びに / あるいは、B P N ' - v 3 6 と比較して 0 . 5 以上 0 . 9 未満の P I 値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、変異体は、配列番号 2 又は配列番号 6 の配列に対して少なくとも 6 0 % 、 7 0 % 、 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 又は 9 8 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組の酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号 2 の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、このような変異体を含む組成物 ( クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない ) 、並びに、少なくとも1つのこのようなプロテアーゼ変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【 0 6 0 5 】

以下の B P N ' - v 3 6 変異体 : S 3 3 T - T 5 5 P - N 6 1 P - S 6 3 G - A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , S 3 3 T - N 6 1 G - S 6 3 G - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - S 6 3 G - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , N 6 1 P - S 6 3 G - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - G 1 6 9 A - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V - S 2 4 9 Q , S 3 3 T - N 6 1 G - A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S , A 1 G - N 6 1 P - S 6 3 G - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 6 1 P - S 6 3 G - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V - S 2 4 9 Q , S 6 3 G - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - G 1 3 1 H - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 6 1 P - S 6 3 G - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V , A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - S 1 8 3 L - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1 2 8 S , N 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1 2 8 S - S 1 8 3 L - S 2 2 4 A , N 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A , N 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 6 1 G - A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 1 8 3 V , N 1 0 9 G - A 1 1 4 S - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 A , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 1 8 3 L - S 2 2 4 A , N 6 1 G - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A , N 1 0 9 M - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A , A 8 8 T - N 1 0 9 S - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 9 M - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , S 6 3 G - A 1 2 8 S , A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V , N 1 0 1 Q - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T , S 6 3 G - N 1 0 9 G , A 8 8 T - N 1 0 9 G , N 1 0 9 G - K 2 5 6 R , N 6 1 G - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V , S 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - G 1 6 9 A - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S -

10

20

30

40

50

P 1 2 9 S - S 1 3 0 T - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , 及び A 8 8 T - N 1 0 9 Q - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含む B P N ' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q アミノ酸配列 (配列番号 6) は、p H 8 及び 1 6 での洗剤組成物 4 の卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、B P N ' - v 3 6 と比較して 1 . 0 超、少なくとも 1 . 1、少なくとも 1 . 2、少なくとも 1 . 3、少なくとも 1 . 4、少なくとも 1 . 5、少なくとも 1 . 6、少なくとも 1 . 7、少なくとも 1 . 8、少なくとも 1 . 9、少なくとも 2、1 . 0 超 ~ 約 1 0、1 . 0 超 ~ 約 8、又は 1 . 0 超 ~ 約 5 の P I 値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号 2 の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、B P N '、  
 B P N ' - v 3、及び B P N ' - v 3 6 と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、  
 B P N '、B P N ' - v 3 及び B P N ' - v 3 6 よりも P I 値が大きい。本発明は、本アッセイにおいて、B P N ' (配列番号 2) と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、  
 B P N '、B P N ' - v 3 及び B P N ' - v 3 6 と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、  
 B P N ' - v 3 と比較して 1 . 0 超 ~ 5 の P I 値を有する、並びに / あるいは、  
 B P N ' - v 3 6 と比較して 1 . 0 超 ~ 約 5 の P I 値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号 2 又は配列番号 6 の配列に対して少なくとも 6 0 %、7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 % 又は 9 8 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも  
 1 組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号 2 の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくとも 1 つのこのような変異体を含む組成物 (クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも 1 つのこのようなプロテアーゼ変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

#### 【 0 6 0 6 】

p H 8 及び 1 6 での洗剤組成物 4 の卵微小標本クリーニングアッセイにおいて、B P N ' - v 3 6 と比較して向上したタンパク質分解活性を有する、並びに / あるいは、B P N ' - v 3 6 と比較して 1 . 0 超 ~ 約 5 の P I 値を有する、スプチリシンプロテアーゼ変異体も提供され、この変異体は、配列番号 2 又は配列番号 6 に対して少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ここで、この変異体は、X 1 G、X 3 3 T、X 5 5 P、X 6 1 G / P / S、X 6 3 G、X 7 6 D、X 8 8 T、X 1 0 1 Q、X 1 0 9 G / M / Q / S、X 1 1 4 S、X 1 1 6 T、X 1 2 8 S、X 1 2 9 S、X 1 3 0 T、X 1 3 1 H、X 1 5 8 S、X 1 6 9 A、X 1 8 3 L / V、X 2 1 8 S、X 2 2 4 A、X 2 4 3 V、X 2 4 8 A / N、X 2 4 9 Q、X 2 5 6 R、の群から選択される少なくとも 1 つの置換を含む少なくとも 1 つの置換を含み、選択的に、A 1 G、S 3 3 T、T 5 5 P、N 6 1 G / P / S、S 6 3 G、N 7 6 D、A 8 8 T、N 1 0 1 Q、N 1 0 9 G / M / Q / S、A 1 1 4 S、A 1 1 6 T、A 1 2 8 S、P 1 2 9 S、S 1 3 0 T、G 1 3 1 H、T 1 5 8 S、G 1 6 9 A、S 1 8 3 L / V、N 2 1 8 S、S 2 2 4 A、N 2 4 3 V、S 2 4 8 A / N、S 2 4 9 Q、K 2 5 6 R、の群から選択される少なくとも 1 つの置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号 2 の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッセイにおいて、B P N '、B P N ' - v 3、及び B P N ' - v 3 6 と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、B P N '、B P N ' - v 3 及び B P N ' - v 3 6 よりも P I 値が大きい。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくとも 1 つのこのような変異体を含む組成物 (クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも 1 つのこのようなプロテアーゼ変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

#### 【 0 6 0 7 】

以下の B P N ' - v 3 6 変異体 : 置換 S 3 3 T - N 7 6 D - A 1 2 8 S - N 2 1 8 S、N 7 6 D - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A 及び S 0 6 3 G - N 7 6 D、からなる群

10

20

30

40

50



から選択されるアミノ酸置換を含むBPN' - S024G - S053G - S078N - S101N - G128A - Y217Qアミノ酸配列(配列番号6)は、pH 8及び16での洗剤組成物4の卵BMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v36と比較して0.5以上1.0以下のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本アッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN' - v36と比較して0.5以上1.0以下のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、変異体は配列番号2又は配列番号6に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、S33T - N76D - A128S - N218S, N76D - N109G - A128S - S224A, 及びS063G - N076D, からなる群から選択されるアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくとも1つのこのような変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのようなプロテアーゼ変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

【0608】

以下のBPN' - v36変異体: G24S - G53S - N78S - G97A - N101S - A128S, I31L - S33T - S63G - N109G - A128S - G169A - N218S - N243V, A1G - I31L - S33T - T55P - N61P - S63G - A88T - N109G - A116T - A128S - G131H - G169A - S224A - N243V - S249Q, S33T - N61G - S63G - N109G - A128S - G131H - G169A - N218S - N243V, S33T - S63G - N109G - A128S - G169A - N218S - N243V, S33T - T55P - N61P - S63G - A88T - N109G - A116T - A128S - G131H - S224A - N243V, S33T - T55P - N61P - S63G - A88T - N109G - A116T - A128S - G131H - S224A - N243V - S249Q, S33T - N61G - S63G - N109G - A128S - N218S - N243V, S33T - S63G - N109G - A128S - N218S - N243V, S33T - T55P - N61P - S63G - N109Q - A128S - G131H - S224A - N243V, N61P - S63G - N109Q - A128S - G131H - G169A - S224A - N243V - S249Q, S33T - N61G - A88T - N109G - A116T - A128S - N218S - N243V, S33T - N109G - A128S - N218S - N243V, S33T - N76D - N109G - A128S - N218S - N243V, S33T - N76D - N109G - A128S - N218S - N243V - S248N - K256R, S33T - N61G - N109G - A128S - N218S - N243V, S33T - N76D - A128S - N218S, S33T - A128S - N218S, A1G - N61P - S63G - N109Q - A128S - G131H - S224A - N243V, N61P - S63G - N109Q - A128S - G131H - S224A - N243V - S249Q, N61P - S63G - N109Q - A128S - G131H - S224A - N243V, S63G - N109Q - A128S - G131H - S224A - N243V, N61P - S63G - N109Q - A128S - S224A - N243V, A88T - N109G - A114S - A116T - A128S - N243V, A88T - N109G - A114S - A116T - A128S - S183L - S224A - N243V, N109G - A114S - A128S, N109G - A114S - A128S - S183L - S224A, N109G - A114S - A128S - S224A, N109G - A114S - A128S - S224A - N243V, A88T - N109G - A116T - A128S - S224A - N243V, N61G - A88T - N109G - A116T - A128S - S224A - N243V, N109G - A128S - S183V, N109G - A1

10

20

30

40

50

1 4 S - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3 V - S 2 4 8 A ,  
 N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N 2 4 3  
 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 1  
 8 3 L - S 2 2 4 A , N 6 1 G - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A , N 7 6 D - N 1  
 0 9 G - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A , N 1 0 9 M - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A , N 1 0 9 G -  
 A 1 2 8 S - S 1 8 3 L , S 3 3 T - N 7 6 D , A 8 8 T - N 1 0 9 S - A 1 1 6 T - A  
 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V  
 , N 1 0 9 S - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A , A 8 8 T - N 1 0 9 M - A 1 1 6 T - A 1 2 8  
 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 1 Q - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - P 1 2 9 S - S 1  
 3 0 T - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , S 6 3 G - N 1 0 9 Q - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N  
 2 4 3 V , N 1 0 9 M - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , S 6 3 G - A 1 2 8 S ,  
 N 1 0 9 S - A 1 2 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , A 8 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T  
 - N 2 4 3 V , N 6 1 S - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V , N 1 0 1 Q - N 1 0 9 Q - A 1 2 8  
 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , A 8  
 8 T - N 1 0 9 G - A 1 1 6 T - T 1 5 8 S - N 2 4 3 V - K 2 5 6 R , N 1 0 9 G - A  
 1 1 6 T , S 6 3 G - N 1 0 9 G , A 8 8 T - N 1 0 9 G , N 1 0 9 G - K 2 5 6 R , N  
 6 1 G - N 1 0 9 G - N 2 4 3 V , S 3 3 T - N 6 1 P - S 6 3 G - N 1 0 9 G - A 1 2  
 8 S - G 1 3 1 H - G 1 6 9 A - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1  
 2 8 S - G 1 6 9 A - N 2 1 8 S - N 2 4 3 V , S 3 3 T - N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - N  
 2 1 8 S - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , N 1 0 9 G - A 1 2 8 S - P 1 2 9 S - S 1 3 0 T  
 - S 2 2 4 A - N 2 4 3 V , 及び A 8 8 T - N 1 0 9 Q - A 1 1 6 T - A 1 2 8 S - S 2  
 2 4 A - N 2 4 3 V , からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含む B  
 P N ' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q ア  
 ミノ酸配列(配列番号6)は、A A P F タンパク質分解アッセイにおいて、B P N ' - v  
 3 6 と比較して1.0超、少なくとも1.1、少なくとも1.2、少なくとも1.3、少  
 なくとも1.4、少なくとも1.5、少なくとも1.6、少なくとも1.7、少なくとも  
 1.8、少なくとも1.9、少なくとも2.1.0超~約10、1.0超~約8、又は1  
 .0超~約5のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は、  
 配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、本アッ  
 セイにおいて、B P N '、B P N ' - v 3、及びB P N ' - v 3 6 と比較して向上した  
 タンパク質分解活性を有し、B P N '、B P N ' - v 3 及びB P N ' - v 3 6 よりもPI値  
 が大きい。本発明は、本アッセイにおいて、B P N '(配列番号2)と比較して向上した  
 タンパク質分解活性を有する、B P N '、B P N ' - v 3 及びB P N ' - v 3 6 と比較し  
 て向上したタンパク質分解活性を有する、B P N ' - v 3 と比較して1.0超~5のPI  
 値を有する、並びに/あるいは、B P N ' - v 3 6 と比較して1.0超~約5のPI値を  
 有する、プロテアーゼ変異体を含み、この変異体は配列番号2又は配列番号6の配列に対  
 して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、9  
 4%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群  
 から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は  
 、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の  
 他箇所により詳細に記載されるような、少なくとも1つのこのような変異体を含む組成物  
 (クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つ  
 のこのようなプロテアーゼ変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

#### 【0609】

A A P F タンパク質分解アッセイにおいて、B P N ' - v 3 6 と比較して向上したタン  
 パク質分解活性を有する、並びに/あるいは、B P N ' - v 3 6 と比較して1.0超~約  
 5のPI値を有する、スプチリシンプロテアーゼ変異体も提供され、この変異体は、配列  
 番号2又は配列番号6に対して少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、9  
 4%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み  
 、ここで、この変異体は、X 1 G , X 3 1 L , X 3 3 T , X 5 5 P , X 6 1 G / P / S、

X 6 3 G , X 7 6 D , X 8 8 T , X 1 0 1 Q , X 1 0 9 G / M / Q / S 、 X 1 1 4 S , X 1 1 6 T , X 1 2 8 S , X 1 2 9 S , X 1 3 0 T , X 1 3 1 H , X 1 5 8 S , X 1 6 9 A , X 1 8 3 L / V 、 X 2 1 8 S , X 2 2 4 A , X 2 4 3 V , X 2 4 8 A / N 、 X 2 4 9 Q , 及び X 2 5 6 R , の群から選択される少なくとも1つの置換を含む少なくとも1つの置換を含み、選択的に、A 1 G , I 3 1 L , S 3 3 T , T 5 5 P , N 6 1 G / P / S 、 S 6 3 G , N 7 6 D , A 8 8 T , N 1 0 1 Q , N 1 0 9 G / M / Q / S 、 A 1 1 4 S , A 1 1 6 T , A 1 2 8 S , P 1 2 9 S , S 1 3 0 T , G 1 3 1 H , T 1 5 8 S , G 1 6 9 A , S 1 8 3 L / V 、 N 2 1 8 S , S 2 2 4 A , N 2 4 3 V , S 2 4 8 A / N 、 S 2 4 9 Q , 及び K 2 5 6 R , の群から選択される少なくとも1つの置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体は、B P N ' (配列番号2)、B P N ' - v 3 及び B P N ' - v 3 6 と比較して向上したタンパク質分解活性を有し、本アッセイにおいて、B P N '、B P N ' - v 3 及び B P N ' - v 3 6 よりも P I 値が大きい。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくとも1つのこのような変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのようなプロテアーゼ変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

10

## 【0610】

以下の B P N ' - v 3 6 変異体：アミノ酸置換 G 2 4 S - G 5 3 S - N 7 8 S - G 9 7 A - N 1 0 1 S 又は S 0 6 3 G - N 7 6 D , を含む B P N ' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Q アミノ酸配列(配列番号6)は、A A P F タンパク質分解アッセイにおいて、B P N ' - v 3 6 と比較して 0 . 5 以上 1 . 0 以下の P I 値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、本アッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、B P N ' - v 3 6 と比較して 0 . 5 以上 1 . 0 以下の P I 値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、変異体は、配列番号2又は配列番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、置換 G 2 4 S - G 5 3 S - N 7 8 S - G 9 7 A - N 1 0 1 S 又は S 0 6 3 G - N 7 6 D , を含む、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。本明細書その他箇所により詳細に記載されるような、少なくとも1つのこのような変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのようなプロテアーゼ変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

20

30

## 【0611】

(実施例23)

B P N ' - v 3 6 ポリペプチドに基づくコンビナトリアルライブラリ由来の、ポリペプチド B P N ' - v 3 6 のポリペプチド変異体のクリーニング性能

2つの別個のコンビナトリアルライブラリ(A J 1 及び A J 2 )は、DNA 2 . 0 ( M e n l o P a r k , C A )により合成されたものであり、個々のライゲーション反応物として供給された。B P N ' 発現カセットを含有している p H P L T - B P N ' - v 3 6 プラスミド(図4)をライブラリ構築のためのテンプレートDNA(親プラスミド)として使用した。可能なアミノ酸位置、及び各ライブラリの置換の一覧を表23-1に示す。各ライブラリについてのライゲーション反応物を用いて枯草菌(B. subtilis)を形質転換し、ライブラリ変異体は、実施例11に記載のようにタンパク質発現のために増殖させた。パートIの実施例1に記載のようにpH 8及び16での洗剤組成物4のB M I 微小標本クリーニングアッセイにおける性能について変異体を試験した。

40

【表 3 9】

表23-1:コンビナトリアルライブラリAJ1及びAJ2に可能な置換			
AJ1		AJ2	
位置	可能な置換	位置	可能な置換
S33	G, S	E54	E, Q
D60	D, G	D99	D, N
N62	N, L, S	D120	D, N
S63	S, R, L, N, G	D140	D, N
S125	S, A	E156	E, Q
Q217	Q, R, E, L, G	D197	D, N
M222	M, L, S	K12	K, T
		K27	K, S
		K43	K, T
		K141	K, Y
		K213	K, Q
		K237	K, A
		K256	K, Q

10

20

## 【 0 6 1 2 】

以下のBPN' - v 3 6変異体：G 0 2 4 S - G 0 5 3 S - N 0 7 8 S - G 0 9 7 A - N 1 0 1 S (すなわち、BPN' - v 3)、G 0 2 4 S - G 0 5 3 S - N 0 7 8 S - G 0 9 7 A - N 1 0 1 S - A 1 2 8 S (すなわち、BPN' - v 1 2)、N 0 6 2 L, N 0 6 2 L - S 0 6 3 G, N 0 6 2 S, N 0 6 2 S - S 0 6 3 G - Q 2 1 7 L, N 0 6 2 S - S 0 6 3 L - Q 2 1 7 L, N 0 6 2 S - S 0 6 3 N, N 0 6 2 S - S 0 6 3 R, Q 2 1 7 E, S 0 6 3 G, S 0 6 3 G - Q 2 1 7 L, S 0 6 3 G - Q 2 1 7 L - M 2 2 2 S, S 0 6 3 L - Q 2 1 7 L, S 0 6 3 N, S 0 6 3 N - Q 2 1 7 L, D 0 9 9 N - K 1 4 1 Y - K 2 1 3 Q, D 0 9 9 N - K 1 4 1 Y - K 2 5 6 Q, K 0 4 3 T, K 0 4 3 T - K 1 4 1 Y - E 1 5 6 Q, N 0 6 2 L - Q 2 1 7 E, N 0 6 2 L - Q 2 1 7 L, N 0 6 2 L - S 0 6 3 G - Q 2 1 7 E, N 0 6 2 L - S 0 6 3 L, N 0 6 2 L - S 0 6 3 N - Q 2 1 7 L, N 0 6 2 S - Q 2 1 7 L, N 0 6 2 S - S 0 6 3 G, N 0 6 2 S - S 0 6 3 L, N 0 6 2 S - S 0 6 3 N - Q 2 1 7 L, N 0 6 2 S - S 0 6 3 R - Q 2 1 7 E, Q 2 1 7 L, S 0 6 3 G - Q 2 1 7 E, S 0 6 3 N - Q 2 1 7 E, S 0 6 3 R, S 0 6 3 R - Q 2 1 7 E, S 0 6 3 R - Q 2 1 7 L, )、D 0 9 9 N - K 1 4 1 Y - K 2 1 3 Q, D 0 9 9 N - K 1 4 1 Y - K 2 5 6 Q, K 0 4 3 T, K 0 4 3 T - K 1 4 1 Y - E 1 5 6 Q, N 0 6 2 L - Q 2 1 7 E, N 0 6 2 L - Q 2 1 7 L, N 0 6 2 L - S 0 6 3 G - Q 2 1 7 E, N 0 6 2 L - S 0 6 3 L, N 0 6 2 S - Q 2 1 7 L, N 0 6 2 S - S 0 6 3 G, N 0 6 2 S - S 0 6 3 L, N 0 6 2 S - S 0 6 3 N - Q 2 1 7 L, Q 2 1 7 L, S 0 6 3 G - Q 2 1 7 E, S 0 6 3 N - Q 2 1 7 E, S 0 6 3 R, S 0 6 3 R - Q 2 1 7 E, 及びS 0 6 3 R - Q 2 1 7 L, からなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN' - S 0 2 4 G - S 0 5 3 G - S 0 7 8 N - S 1 0 1 N - G 1 2 8 A - Y 2 1 7 Qアミノ酸配列(配列番号6)は、pH 8及び16での洗剤組成物4のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN' - v 3 6と比較して0.5以上1.0未満のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、本アッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN' - v 3 6と比較して0.5以上1.0以下のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、変異体は、配列番号2又は配列番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%又は98%の同一

30

40

50

性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組の酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくとも1つのこのような変異体を含む組成物（クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない）、並びに、少なくとも1つのこのようなプロテアーゼ変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。配列番号6の位置24のG、位置53のG、位置78のG及び位置101のNが配列番号6の位置24、53、78及び101の各々でSに置換されているので、アミノ酸置換G024S - G053S - N078S - G097A - N101Sを含むBPN' - S024G - S053G - S078N - S101N - G128A - Y217QAアミノ酸配列（配列番号6）であるプロテアーゼ変異体がBPN' - v3（配列番号4）であることに留意されたい。加えて、配列番号6の位置97のGは、Aで置換されている。したがって、得られる配列は、配列番号4である。

【0613】

以下のBPN' - v36変異体：D099N, K141Y - E156Q, N062L - S063L - Q217L, N062L - S063N, N062L - S063N - Q217E, N062L - S063R, N062L - S063R - Q217L, N062S - Q217E, N062S - S063G - Q217E, N062S - S063G - Q217R, N062S - S063N - Q217R, S063G - S125A, D060G - Q217L, D120N - K141Y - K213Q, K043T - D099N - D120N - K141Y, K043T - D099N - K141Y - K256Q, K043T - K237A, N062L - S063G - Q217R, N062L - S063G - S125A, N062L - S063L - Q217E, N062L - S063N - S125A - Q217L, N062S - Q217R, N062S - S063L - Q217E, N062S - S063R - Q217L, S063G - M222S, S063G - Q217R, D120N - E156Q - K256Q, K141Y - D197N, N062L - Q217R, N062L - S063G - Q217L - M222S, N062L - S063L - Q217R, N062L - S063N - Q217R, N062S - Q217G, N062S - S063G - Q217G, N062S - S063G - Q217L - M222L, N062S - S063G - S125A - Q217L, N062S - S063N - Q217E, Q217G, S033G - N062S - S063G, S063G - Q217G, S063G - Q217L - M222L, S063G - S125A - Q217R, S063L - Q217R, S063N - M222S, S063N - Q217R, S063N - S125A - Q217L, S063R - Q217R, S063R - S125A - Q217L, D099N - E156Q - K256Q, E156Q, K012T - D099N - K213Q, K012T - K256Q, K043T - D099N - K141Y - K213Q, K043T - E156Q, K141Y - K213Q, N062L - Q217G, N062L - Q217L - M222L, N062L - Q217L - M222S, N062L - S063G - M222S, N062L - S063G - Q217L - M222L, N062L - S063G - Q217R - M222S, N062L - S063N - Q217L - M222S, N062L - S063N - S125A, N062L - S063R - S125A, N062L - S125A, N062S - S063G - M222S, N062S - S063G - Q217G - M222S, N062S - S063G - S125A, N062S - S063N - Q217L - M222L, N062S - S063N - S125A - Q217L, N062S - S063R - Q217G, N062S - S063R - Q217L - M222S, Q217G - M222S, Q217L - M222S, Q217R, S033G - S063G - Q217R, S063G - Q217E - M222S, S063G - S125A - Q217G, S063L - Q217E, S063N - Q217G, S063N - Q217G - M222S, S063N - Q217L - M222S, S063R - Q217L - M222S, 及びS063R - S125A, かなる群から選択される少なくとも1組のアミノ酸置換を含むBPN' - S024G - S053G - S078N - S101N - G128A - Y217QAアミノ酸配列（配列番号6）

10

20

30

40

50

は、pH 8及び16での洗剤組成物4のBMI微小標本クリーニングアッセイにおいて、BPN'-v36と比較して0.5以上0.9未満のPI値を有するものと判定されたが、ここで、変異体のアミノ酸位置は配列番号2の配列と対応させることにより番号付けされる。このような変異体はタンパク質分解活性を有する。本発明は、本アッセイにおいて、タンパク質分解活性を有する、並びに/あるいは、BPN'-v36と比較して0.5以上0.9未満のPI値を有する、プロテアーゼ変異体を含み、変異体は、配列番号2又は配列番号6の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記群から選択される少なくとも1組の酸置換を含み、ここで、変異体のアミノ酸位置は、配列番号2の配列のアミノ酸位置と対応させることにより番号付けされる。本明細書の他箇所により詳細に記載されるような、少なくとも1つのこのような変異体を含む組成物(クリーニング組成物が挙げられるが、これに限定されない)、並びに、少なくとも1つのこのようなプロテアーゼ変異体を用いるクリーニング方法も含まれる。

10

## 【0614】

パートII

シリーズI GG36冷水プロテアーゼ変異体

野生型成熟バチルス・レントス(*Bacillus lentus*) GG36プロテアーゼのアミノ酸配列は以下の通りである。

## 【0615】

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  
D L N I R G G A S F V P G E P S T Q D G N G H G T H V A G T I A A L N N S I G 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 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 I  
S Y P A R Y A N A M A V G A T D Q N N N R A S F S Q Y G A G L D I V A P G V N V  
Q S T Y P G S T Y A S L N G T S M A T P H V A G A A A L V K Q K N P S 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 (配列番号755)

20

本明細書に示すように、好適なシリーズI GG36冷水プロテアーゼ変異体は、親プロテアーゼから誘導される酵素変異体を含み、上記親プロテアーゼは、配列番号755のアミノ酸配列に対して少なくとも60%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%又は100%同一であり、上記プロテアーゼ変異体は、以下の特徴の1つ以上を有する：

30

a) 少なくとも1.1、少なくとも1.2、少なくとも1.3、少なくとも1.4、少なくとも1.5、少なくとも1.6、少なくとも1.7、少なくとも1.8、少なくとも1.9、少なくとも2、1.1~約10、1.1~約8、又は更には1.1~約5の試験方法2の性能指数、

b) 少なくとも1.1、少なくとも1.2、少なくとも1.3、少なくとも1.4、少なくとも1.5、少なくとも1.6、少なくとも1.7、少なくとも1.8、少なくとも1.9、少なくとも2、1.1~約10、1.1~約8、又は更には1.1~約5の試験方法3の性能指数、

40

c) 少なくとも1.0、少なくとも1.1、少なくとも1.2、少なくとも1.3、少なくとも1.4、少なくとも1.5、少なくとも1.6、少なくとも1.7、少なくとも1.8、少なくとも1.9、少なくとも2、1.0~約10、1.1~約8、又は更には1.1~約5の試験方法4の性能指数。

## 【0616】

試験方法2、試験方法3及び試験方法4は、パートII実施例1の「試験方法」の部分に明記されている。本明細書で参照されるすべての変異は、図5に示すようなBPN'番号付けスキームを用いる。一部の態様では、本明細書で参照される変異体は、BPN'番号付けスキームを用いて、配列番号755のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸配列を有

50

する変異体を照会する。

【0617】

好適なシリーズIのGG36冷水プロテアーゼは、スブチリシンの変異体、又はスブチリシンから誘導される変異体、特に配列番号755のスブチリシンバチルス・レントス(Bacillus lentus) GG36から誘導されるものであることができ、一部の態様では、以下の変異：A1R, Q2S, V4R, V4S, S9A, R10S, P14K, A16S, H17R, N18R, G20R, T22A, T22R, S24R, S24W, G25R, G25V, V26F, L42I, N43R, N43A, G46R, P52F, P52E, P52N, T57R, Q59A, N62E, N62Q, V68A, V68C, T71G, I72C, A74C, L75A, L75F, L75R, N76D, S78R, L82R, P86W, E89P, E89T, E89G, E89H, E89I, E89V, E89W, Y91N, K94N, G100S, S101A, S101N, S101G, S101D, S103G, S103N, V104L, V104I, S106V, S106G, A108I, L111V, E112V, G115K, G115R, N117F, G118I, V121F, S128D, S128F, S128L, S128N, P129E, S144R, L148I, A158E, G159E, S160D, S166D, N185E, N185I, R186H, S188E, S188D, D197F, V203E, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, P210R, S212I, S212F, Y214F, A215N, A215D, A215E, L217E, L217N, T224A, A230E, A231I, Q236F, N238R, N238K, P239K, P239G, P239R, P239S, W241R, S242R, S242L, N243R, V244R, N248I, N248V, H249R, L250I, N252R, T253R, L262D, Y263F, S265F, L267V, L267NN269I, N269R, E271F, E271I, E271H, E271P, E271T, E271V, E271L及び/又はA272F, の1つ以上を含み、ここで、変異体はタンパク質分解活性を有し、変異体の各アミノ酸位置は、配列番号2のアミノ酸配列と変異体のアミノ酸配列とのアラインメントによって決定される配列番号2(BPN')のアミノ酸配列におけるアミノ酸位置に対応させることにより番号付けされる。

【0618】

一態様では、好適なシリーズI GG36冷水プロテアーゼ変異体としては、以下の組の置換：T022R - S024R, S009A - E271L, N018R - W241R, N018R - G115R, N043R - H249R, G020R - H249R, V004R - H249R, G020R - S024R, N018R - H249R, S009A - G020R, G020R - W241R, S009A - S078R, G020R - G115R, N018R - S024R, S024R - S242R, T022R - G115R, N018R - N043R, G020R - N043R, N018R - S242R, S242R - N269R, N018R - V244R, S024R - N269R, G020R - E271L, S024R - E271L, V004R - S009A, G020R - N269R, A001R - S024R, V244R - E271L, S009A - N018R, W241R - E271L, V004R - S024R, S009A - H249R, S009A - T022R, N062E - P129E, N062E - G159E, A016S - L148I, A158E - H249R, A016S - N062E, L111V - S188D, T022A - N062E, N062E - L148I, T022A - P129E, N062E - E271F, N062E - A158E, A016S - G159E, N062E - R186H, S128N - G159E, N062E - S188D, N062E - S128N, L148I - G159E, S103G - A158E, L111V - G159E, A158E - E271F, A016S - S188D, T022A - L111V, S128N - A158E, A016S - A158E, V104L - A158E, S128N - R186H, G159E - Y209E, N062E - S101A, L111V - Y209E, L148I - S188D, S101A - Y209E, T022A - S188D, A016S - T022A, S128

N - P 1 2 9 E , A 0 1 6 S - Y 2 0 9 E , A 0 1 6 S - S 1 2 8 N , T 0 2 2 A - E 0  
 8 9 P , S 1 2 8 N - Y 2 0 9 E , E 0 8 9 P - A 1 5 8 E , N 0 6 2 E - S 1 0 3 G ,  
 R 1 8 6 H - E 2 7 1 F , A 0 1 6 S - P 1 2 9 E , E 0 8 9 P - G 1 5 9 E , L 1 1 1  
 V - H 2 4 9 R , S 1 0 1 A - P 1 2 9 E , L 1 4 8 I - Y 2 0 9 E , T 0 2 2 A - G 1  
 5 9 E , P 1 2 9 E - H 2 4 9 R , P 1 2 9 E - Y 2 0 9 E , V 1 0 4 L - P 1 2 9 E ,  
 S 1 2 8 N - S 1 8 8 D , L 1 1 1 V - A 1 5 8 E , T 0 2 2 A - A 1 5 8 E , N 0 6 2  
 E - Y 2 0 9 E , N 0 6 2 E - H 2 4 9 R , S 1 0 1 A - R 1 8 6 H , E 0 8 9 P - P 1  
 2 9 E , P 1 2 9 E - E 2 7 1 F , T 2 2 A - L 1 1 1 V - G 1 5 9 E , S 1 0 1 A - S 1  
 0 3 G - V 1 0 4 L - Y 2 0 9 E , S 1 0 1 A - S 1 0 3 G - V 1 0 4 L - G 1 5 9 E ,  
 S 1 0 1 A - S 1 0 3 G - V 1 0 4 L - S 1 8 8 D , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4  
 I - G 1 5 9 D , T 2 2 A - S 1 0 3 G - G 1 5 9 E , T 2 2 A - S 1 2 8 N - E 2 7 1  
 F - Y 2 0 9 E , T 2 2 A - Y 2 0 9 E - E 2 7 1 F , T 2 2 A - S 1 0 1 A - Y 2 0 9  
 E , S 1 0 1 A - Y 2 0 9 E - E 2 7 1 F , T 2 2 A - L 1 1 1 V - S 1 2 8 N , T 2 2  
 A - S 1 0 1 A - G 1 5 9 E , S 1 0 1 A - S 1 0 3 G - V 1 0 4 L , T 2 2 A - S 1 0  
 1 A - S 1 0 3 G - V 1 0 4 L , S 1 0 1 A - S 1 0 3 G - V 1 0 4 L , S 1 0 1 G - S  
 1 0 3 A - V 1 0 4 I , S 1 0 1 A - S 1 0 3 G - V 1 0 4 L - S 1 2 8 N , S 1 0 3 A  
 - V 1 0 4 I - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 3 6 H - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - N 2 5  
 2 K , S 1 0 1 G - V 1 0 4 I - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 3 6 H - Q 2 4 5 R - N  
 2 4 8 D - N 2 5 2 K , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 3 6 H  
 - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - N 2 5 2 K , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 L - A 2 3  
 2 V - Q 2 3 6 H - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - N 2 5 2 K , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V  
 1 0 4 L - G 1 5 9 D - Q 2 3 6 H - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - N 2 5 2 K , S 1 0 1 G  
 - S 1 0 3 A - V 1 0 4 L - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - N 2 5  
 2 K , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 L - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 3 6 H - N  
 2 4 8 D - N 2 5 2 K , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 L - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V  
 - Q 2 3 6 H - Q 2 4 5 R - N 2 5 2 K , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 L - G 1 5  
 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 3 6 H - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D , N 6 2 E - S 1 0 1 G - S 1  
 0 3 A - V 1 0 4 I - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - E 2 7 1 F ,  
 N 6 2 E - S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 4 5 R  
 - N 2 4 8 D - H 2 4 9 R , T 2 2 A - S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I - G 1 5 9  
 D - A 2 3 2 V - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - H 2 4 9 R , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1  
 0 4 I - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - S 2 4 R , S 1 0 1 G - S  
 1 0 3 A - V 1 0 4 I - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - T 2 5 3 R  
 , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I - A 1 5 8 E - A 2 3 2 V - Q 2 4 5 R - N 2 4  
 8 D - H 2 4 9 R , T 2 2 A - S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I - G 1 5 9 D - A 2  
 3 2 V - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - E 2 7 1 F , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I -  
 G 1 5 9 E - A 2 3 2 V - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - H 2 4 9 R , S 1 0 1 G - S 1 0 3  
 A - V 1 0 4 I - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - N 2 3 8 R , S 1  
 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I - A 1 5 8 E - A 2 3 2 V - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D -  
 E 2 7 1 F , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 4 5  
 R - N 2 4 8 D , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2  
 4 5 R - N 2 4 8 D - E 2 7 1 F , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I - G 1 5 9 D -  
 A 2 3 2 V - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - N 7 6 D , 及び/又は S 1 0 1 G - S 1 0 3 A -  
 V 1 0 4 I - G 1 5 9 E - A 2 3 2 V - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D - E 2 7 1 F , の1つ以  
 上を含むスプチリシン、特に配列番号755のバチルス・レントス (*Bacillus lentus*)  
 GG36から誘導されるものが挙げられ、ここで、変異体はタンパク質分解活性を有し、  
 変異体の各アミノ酸位置は、配列番号2のアミノ酸配列と変異体のアミノ酸配列とのアラ  
 インメントによって決定される配列番号2 (BPN')のアミノ酸配列におけるアミノ酸  
 位置に対応させることにより番号付けされる。

【0619】



別の態様では、好適なシリーズIのGG36冷水プロテアーゼとしては、スブチリシンの変異体、特に配列番号755のパチルス・レントス (*Bacillus lentus*) GG36から誘導されるものが挙げられ、ここで、変異体は、位置1、2、4、9、10、14、16、17、18、20、22、24、25、26、42、43、46、52、57、59、62、68、71、72、74、75、76、78、82、86、89、91、94、100、101、103、104、106、108、111、112、115、117、118、121、128、129、144、148、158、159、160、166、185、186、188、197、203、209、210、212、214、215、217、224、230、231、236、238、239、241、242、243、244、248、249、250、252、253、262、263、265、267、269、271及び272を含む位置の群内に3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は更には25個の変異を含む。

10

## 【0620】

別の態様では、好適なシリーズIのGG36冷水プロテアーゼとしては、スブチリシンの変異体、特に配列番号755のパチルス・レントス (*Bacillus lentus*) GG36から誘導されるものが挙げられ、ここで、変異体は、A1R, Q2S, V4R, V4S, S9A, R10S, P14K, A16S, H17R, N18R, G20R, T22A, T22R, S24R, S24W, G25R, G25V, V26F, L42I, N43R, N43A, G46R, P52F, P52E, P52N, T57R, Q59A, N62E, N62Q, V68A, V68C, T71G, I72C, A74C, L75A, L75F, L75R, N76D, S78R, L82R, P86W, E89P, E89T, E89G, E89H, E89I, E89V, E89W, Y91N, K94N, G100S, S101A, S101N, S101G, S101D, S103G, S103N, V104L, V104I, S106V, S106G, A108I, L111V, E112V, G115K, G115R, N117F, G118I, V121F, S128D, S128F, S128L, S128N, P129E, S144R, L148I, A158E, G159E, S160D, S166D, N185E, N185I, R186H, S188E, S188D, D197F, V203E, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, P210R, S212I, S212F, Y214F, A215N, A215D, A215E, L217E, L217N, T224A, A230E, A231I, Q236F, N238R, N238K, P239K, P239G, P239R, P239S, W241R, S242R, S242L, N243R, V244R, N248I, N248V, H249R, L250I, N252R, T253R, L262D, Y263F, S265F, L267V, L267N, N269I, N269R, E271F, E271I, E271H, E271P, E271T, E271V, E271LA272Fから選択される合計3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は更には25個の変異を含み、選択的に、以下の変異：S103A, G159D, Q236H, Q245R, N248D及びN252K, のうちの1つ以上を含み、ここで、変異体はタンパク質分解活性を有し、変異体の各アミノ酸位置は、配列番号2のアミノ酸配列と変異体のアミノ酸配列とのアラインメントによって決定される配列番号2 (BPN')のアミノ酸配列におけるアミノ酸位置に対応させることにより番号付けされる。

20

30

40

## 【0621】

一部の態様では、シリーズI GG36冷水プロテアーゼ変異体は1つ以上の変異を含み、B・レントス (*B. lentus*) スブチリシンGG36野生型 (配列番号755) と比較して -5、-4、-3、-2、-1、又0の合計正味電荷を有する。

## 【0622】

別の態様では、シリーズI GG36冷水プロテアーゼ変異体は、低イオン強度のシリーズI GG36冷水プロテアーゼ変異体である。このような低イオン強度のシリーズI

50

GG36冷水プロテアーゼ変異体は1つ以上の変異を含み、B. レンタス (B. lentus) スプチリシンGG36プロテアーゼ野生型(配列番号755)と比較して-5、-4、-3、-2、-1、又0の合計正味電荷を有する。これらの変異体は、(a)以下の変異の2つ以上: A1R, Q2S, V4R, V4S, S9A, R10S, P14K, A16S, T22A, T22R, S24R, G25V, V26F, L42I, P52F, P52E, P52N, N62E, N62Q, V68A, V68C, T71G, I72C, A74C、L75A, L75F, S78R, E89P, E89T, E89G, E89H, E89W, Y91N, K94N, G100S, S101A, S101N, S101G, S101D, S103G, S103N, V104L, V104I, A108I, L111V, E112V, G115K, N117F, V121F, S128D, S128F, S128L, S128N, P129E, L148I, A158EG159E, S160D, S166D, N185E, R186H, S188E, S188D, V203E, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, P210R, S212I, S212F, Y214F, A215N, A215D, A215E, L217E, L217N, T224A, A230E, A231I, Q236F, N238R, N238K, P239K, P239G, P239R, N248V, H249R, L250I, L262D, Y263F, S265F, L267V, L267NN269I, N269R, E271F, E271I, E271H及びA272F、並びに/あるいは、(b)以下の組の変異の1つ以上: N062E - P129E, N062E - G159E, A016S - L148I, A158E - H249R, A016S - N062E, L111V - S188D, T022A - N062E, N062E - L148I, T022A - P129E, N062E - E271F, N062E - A158E, A016S - G159E, N062E - R186H, S128N - G159E, N062E - S188D, N062E - S128N, L148I - G159E, S103G - A158E, L111V - G159E, A158E - E271F, A016S - S188D, T022A - L111V, S128N - A158E, A016S - A158E, V104L - A158E, S128N - R186H, G159E - Y209E, N062E - S101A, L111V - Y209E, L148I - S188D, S101A - Y209E, T022A - S188D, A016S - T022A, S128N - P129E, A016S - Y209E, A016S - S128N, T022A - E089P, S128N - Y209E, E089P - A158E, N062E - S103G, R186H - E271F, A016S - P129E, E089P - G159E, L111V - H249R, S101A - P129E, L148I - Y209E, T022A - G159E, P129E - H249R, P129E - Y209E, V104L - P129E, S128N - S188D, L111V - A158E, T022A - A158E, N062E - Y209E, N062E - H249R, S101A - R186H, E089P - P129E, P129E - E271F, T22A - L111V - G159E, S101A - S103G - V104L - Y209E, S101A - S103G - V104L - G159E, S101A - S103G - V104L - S188D, S101G - S103A - V104I - G159D, T22A - S103G - G159E, T22A - S128N - E271F - Y209E, T22A - Y209E - E271F, T22A - S101A - Y209E, S101A - Y209E - E271F, T22A - L111V - S128N, T22A - S101A - G159E, S101A - S103G - V104L, T22A - S101A - S103G - V104L, S101A - S103G - V104L, S101G - S103A - V104I, S101A - S103G - V104L - S128N, S103A - V104I - G159D - A232V - Q236H - Q245R - N248D - N252K, S101G - V104I - G159D - A232V - Q236H - Q245R - N248D - N252K, S101G - S103A - G159D - A232V - Q236H - Q245R - N248D - N252K, S101G - S103A - V104L - A232V - Q236H - Q245R - N248D - N252K, S101G - S103A - V104L - G159D - Q236H - Q245R - N248D - N

10

20

30

40

50

252K, S101G - S103A - V104L - G159D - A232V - Q245R  
 - N248D - N252K, S101G - S103A - V104L - G159D - A23  
 2V - Q236H - N248D - N252K, S101G - S103A - V104L - G  
 159D - A232V - Q236H - Q245R - N252K, S101G - S103A  
 - V104L - G159D - A232V - Q236H - Q245R - N248D, N62  
 E - S101G - S103A - V104I - G159D - A232V - Q245R - N2  
 48D - E271F, N62E - S101G - S103A - V104I - G159D - A  
 232V - Q245R - N248D - H249R, T22A - S101G - S103A -  
 V104I - G159D - A232V - Q245R - N248D - H249R, S101  
 G - S103A - V104I - G159D - A232V - Q245R - N248D - S2  
 4R, S101G - S103A - V104I - G159D - A232V - Q245R - N  
 248D - T253R, S101G - S103A - V104I - A158E - A232V  
 - Q245R - N248D - H249R, T22A - S101G - S103A - V104  
 I - G159D - A232V - Q245R - N248D - E271F, S101G - S1  
 03A - V104I - G159E - A232V - Q245R - N248D - H249R,  
 S101G - S103A - V104I - G159D - A232V - Q245R - N248  
 D - N238R, S101G - S103A - V104I - A158E - A232V - Q2  
 45R - N248D - E271F, S101G - S103A - V104I - G159D -  
 A232V - Q245R - N248D, S101G - S103A - V104I - G159  
 D - A232V - Q245R - N248D - E271F, S101G - S103A - V1  
 04I - G159D - A232V - Q245R - N248D - N76D及びS101G -  
 S103A - V104I - G159E - A232V - Q245R - N248D - E271  
 F, から選択することができ、ここで、変異体はタンパク質活性を有し、変異体の各アミ  
 ノ酸位置は配列番号2 (BPN')のアミノ酸配列におけるアミノ酸と対応させることに  
 より番号付けされる。

10

20

## 【0623】

別の態様では、上記低イオン強度のシリーズI GG36冷水プロテアーゼ変異体は、  
 典型的には洗濯洗浄機内で、水に希釈されて洗濯洗剤洗浄液を形成する洗剤組成物の部分  
 を形成し、その伝導率は、約0.1mS/cm~約3mS/cm、約0.3mS/cm~  
 約2.5mS/cm、又は更には約0.5mS/cm~約2mS/cmである。

30

## 【0624】

別の態様では、シリーズI GG36冷水プロテアーゼ変異体は、高イオン強度のシリ  
 ーズI GG36冷水プロテアーゼ変異体である。このような高イオン強度のシリーズI  
 GG36冷水プロテアーゼ変異体は2つ以上の変異を含み、B. レンタス (B. lentus)  
 スブチリシンGG36プロテアーゼ野生型 (配列番号755)と比較して+5、+4、+  
 3、+2、+1又0の合計正味電荷を有する。これらの変異は、(a)以下の変異：V4  
 R, H17R, N18R, G20R, T22R, S24R, S24W, G25R, N43  
 R, N43A, G46R, P52F, P52N, T57R, Q59A, N62Q, T71  
 G, L75R, N76D, S78R, L82R, P86W, E89P, E89W, E89  
 T, E89I, E89H, E89V, V104L, S106V, S106G, G115R  
 , G118I, V121F, S144R, N185I, D197F, Y209N, Y20  
 9S, L217E, A231I, P239R, P239S, W241R, S242R, S  
 242L, N243R, V244R, N248I, H249R, N252R, T253R  
 , E271T, E271V, E271L, E271H, E271F, E271P, A1R  
 , S9A, S212F及びN269Rのうち2つ以上、並びに/あるいは、(b)以下  
 の組の変異：T022R - S024R, S009A - E271L, N018R - W241  
 R, N018R - G115R, N043R - H249R, G020R - H249R, V0  
 04R - H249R, G020R - S024R, N018R - H249R, S009A -  
 G020R, G020R - W241R, S009A - S078R, G020R - G115  
 R, N018R - S024R, S024R - S242R, T022R - G115R, N0

40

50

18R-N043R, G020R-N043R, N018R-S242R, S242R-N269R, N018R-V244R, S024R-N269R, G020R-E271L, S024R-E271L, V004R-S009A, G020R-N269R, A001R-S024R, V244R-E271L, S009A-N018R, W241R-E271L, V004R-S024R, S009A-H249R, S009A-T022R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-S24R, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N252K, S101G-S103A-V104L-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, のうちの1つ以上から選択することができ、ここで、変異体はタンパク質活性を有し、変異体の各アミノ酸位置は配列番号2(BPN')のアミノ酸配列におけるアミノ酸と対応させることにより番号付けされる。

10

## 【0625】

別の態様では、上記高イオン強度のシリーズI GG36冷水プロテアーゼ変異体は、典型的には洗濯洗浄機内で、水に希釈されて洗濯洗剤洗浄液を形成する洗剤組成物の部分を形成し、その伝導率は、約3mS/cm~約30mS/cm、約3.5mS/cm~約20mS/cm、又は更には約4mS/cm~約10mS/cmである。

20

## 【0626】

シリーズI GG36冷水プロテアーゼ変異体の電荷は、配列番号755のアミノ酸配列を有するB. レンタス(B. lentus)スプチリシンGG36プロテアーゼ野生型と比較して、表される。単一負電荷を付与するアミノ酸はD及びEであり、単一正電荷を付与するアミノ酸はR、H及びKである。配列番号755に対して電荷を変化させる任意のアミノ酸変化を使用することで、シリーズI GG36冷水プロテアーゼ変異体の電荷を算出する。例えば、野生型中性位置に負電荷変異を導入することはシリーズI GG36冷水プロテアーゼ変異体に-1の正味電荷を加えることになり、一方、野生型正アミノ酸残基(R、H又はK)に負電荷変異(D及びE)を導入することは-2の正味電荷を加えることになる。配列番号755のアミノ酸配列を有するB. レンタス(B. lentus)スプチリシンGG36プロテアーゼ野生型と比較して、シリーズI GG36冷水プロテアーゼ変異体について異なっているすべてのアミノ酸残基からの電荷変化の合計は、シリーズI GG36冷水プロテアーゼ変異体の電荷変化を与える。理論に束縛されるものではないが、(a)低伝導性洗濯洗剤溶液において使用されるシリーズI GG36冷水プロテアーゼ変異体に好ましい電荷範囲は、-5、-4、-3、-2、-1、0、特に-2、-1である、並びに(b)高伝導性洗濯洗剤溶液において使用されるシリーズI GG36冷水プロテアーゼに好ましい電荷範囲は、+5、+4、+3、+2、+1、0、特に+2、+1である、と考えられる。電荷を正しく選択することにより、予想外にレベルの改善された冷水クリーニング性能を得ることができる。「低伝導性洗濯洗剤溶液」は、約0.1mS/cm~約3mS/cm、約0.3mS/cm~約2.5mS/cm、又は更には約0.5mS/cm~約2mS/cmの伝導率を有するものとして定義される。「高伝導性洗濯洗剤溶液」は、約3mS/cm~約30mS/cm、約3.5mS/cm~約20mS/cm、又は更には約4mS/cm~約10mS/cmの伝導率を有するものとして定義される。上記の例は非限定的であることが意図されている。冷水性能を最適化するために変異が組み合わされる場合にも、酵素電荷は更なる位置における変異により均衡が得られ得る。

30

40

## 【0627】

冷水プロテアーゼ変異体GG36の製造方法

冷水プロテアーゼ変異体GG36をコードしている本発明の改変ポリヌクレオチドを生成するのに好適な様々な方法が当該技術分野において既知であり、限定するものではない

50

が、例えば、部位特異的飽和変異誘発、走査変異誘発、挿入変異誘発、欠失変異誘発、無作為変異誘発、部位特異的変異誘発及び指向進化、並びに様々な他の組み換え手法が挙げられる。シリーズ I G G 3 6 冷水プロテアーゼ変異体を製造する非限定的な代表的方法は、上記表題「ベクター、細胞及び本発明のプロテアーゼ変異体ポリペプチドの製造方法」の項で提供される。

【 0 6 2 8 】

加熱不活性化した洗剤の酵素活性の試験に関しては、洗剤の希釈標準溶液は加熱不活性化母液から調製した。所望の条件に一致するよう、適切な水硬度（例えば、6 g p g 又は 1 2 g p g ）及び緩衝剤を洗剤溶液に加える。瓶をボルテックスにかけるか反転させるかして溶液を混合する。以下の表は本明細書で使用される市販の洗剤及び試験条件の一部について

10

【表 4 0】

表A. 洗濯及び食器洗浄条件							
地域	形状	用量	洗剤*	緩衝剤	Gpg	pH	T(°C)
洗濯用(強力液体及び顆粒洗剤)							
NA	HDL	0.78g/L	P&G TIDE(登録商標)2X	5mM HEPES	6	8.0	20
WE	HDL	5.0g/L	Henkel PERSIL(商標)	5mM HEPES	12	8.2	40
WE	HDG	8.0g/L	P&G ARIEL(登録商標)	2mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	12	10.5	40
JPN	HDG	0.7g/L	P&G TIDE(登録商標)	2mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	6	10.0	20
NA	HDG	1.0g/L	P&G TIDE(登録商標)	2mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	6	10.0	20
自動食器洗浄							
WE	ADW	3.0g/L	RB CALGONIT(商標)	2mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	21	10.0	40
NA	ADW	3.0g/L	P&G CASCADE(登録商標)	2mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	9	10.0	40

20

【 0 6 2 9 】

一部の更なる実施例では、以下の溶液の使用が見出される：

【表 4 1】

表B: 希釈標準洗剤溶液					
界面活性剤	温度(C)	界面活性剤g/L	pH	緩衝剤	Gpg
TIDE(登録商標)2X Cold	16	0.98	8	5mM Hepes	6
TIDE(登録商標)2X Cold	32	0.98	8	5mM Hepes	6
TIDE(登録商標)2X Cold	16	0.98	7	5mM MOPS	6

30

【 0 6 3 0 】

表 C は、布地の洗濯に好適な本発明に従って製造された顆粒洗濯洗剤組成物を提供する。

【表 4 2】

表C. 顆粒洗濯洗剤組成物及びその成分						
構成成分	洗剤組成物					
	1	2	3	4	5	6
脂肪族炭素鎖長がC <sub>11</sub> ~C <sub>12</sub> の直鎖アルキルベンゼンスルホネート	15	12	20	10	12	13
他の界面活性剤	1.6	1.2	1.9	3.2	0.5	1.2
リン酸塩ビルダー	2	3	4			
ゼオライト		1		1	4	1
ケイ酸塩	4	5	2	3	3	5
炭酸ナトリウム	2	5	5	4	0	3
ポリアクリレート(MW 4500)	1	0.6	1	1	1.5	1
カルボキシメチルセルロース(CPKelcoからのFinnfix BDA)	1	—	0.3	—	1.1	—
Celluclean(登録商標)(15.6mg/g)	0.23	0.17	0.5	0.2	0.2	0.6
冷水プロテアーゼ変異体*	0.23	0.17	0.05	0.2	0.03	0.1
Stainzyme Plus(登録商標)(14mg/g)	0.23	0.17	0.5	0.2	0.2	0.6
Mannaway 4.0T(4mg/g)	0.1			0.1		0.1
Lipex 100T(18.6mg/g)	0.2		0.1		0.3	
蛍光増白剤	0.16	0.06	0.16	0.18	0.16	0.16
ジエチレントリアミン五酢酸又はエチレンジアミン四酢酸	0.6		0.6	0.25	0.6	0.6
MgSO <sub>4</sub>	1	1	1	0.5	1	1
漂白剤及び漂白活性化剤	6.88		6.12	2.09	1.17	4.66
エトキシル化チオフェン色調染料 <sup>5</sup>	0.002	0.001	0.003	0.003	—	—
Ciba Specialty Chemicalsのダイレクトバイオレット9				0.0006	0.0004	0.0006
硫酸塩/クエン酸/重炭酸ナトリウム/水分/香料	100%までの残部					

## 【0631】

<sup>1</sup> ランダムグラフトコポリマーは、ポリエチレンオキシド主鎖と複数のポリビニルアセテート側鎖とを有する、ポリビニルアセテートグラフト化ポリエチレンオキシドコポリマーである。ポリエチレンオキシド主鎖の分子量は約6000であり、ポリエチレンオキシドとポリビニルアセテートとの重量比は約40:60であり、50個のエチレンオキシド単位当たりのグラフト点は1以下である。

## 【0632】

<sup>2</sup> -NHにつき20個のエトキシル基を有するポリエチレンジアミン(MW=600)。

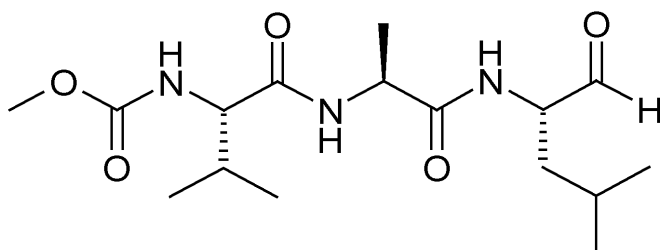
## 【0633】

<sup>3</sup> 両親媒性グリース洗浄ポリマーは、-NHにつき24個のエトキシル基、及び-NHにつき16個のプロポキシル基を有するポリエチレンジアミン(MW=600)である。

## 【0634】

<sup>4</sup> 次の構造を有する可逆性プロテアーゼ抑制剤。

## 【化1】



10

20

30

40

50

## 【 0 6 3 5 】

<sup>5</sup> エトキシ化チオフェン色調染料については米国特許第 7, 2 0 8, 4 5 9 ( B 2 ) 号に記述されている。

## 【 0 6 3 6 】

表 C において、製品に添加した活性タンパク質の % として表される ( 本発明の ) 冷水プロテアーゼ変異体を除き、すべての酵素濃度は酵素原材料 % として表される。表 D は、タテ型自動洗濯機に好適な顆粒洗濯洗剤組成物 ( 洗剤組成物 7 ~ 9 )、及びドラム式洗濯機に好適な顆粒洗濯洗剤組成物 ( 洗剤組成物 1 0 ~ 1 1 ) を提供する。試験した G G 3 6 プロテアーゼ変異体、及び / 又は本発明の冷水プロテアーゼ変異体をこれらの配合物に別個に加える。

【 表 4 3 】

構成成分	表D. 顆粒洗濯洗剤組成物及びその成分				
	7	8	9	10	11
界面活性剤					
C <sub>16~17</sub> 分枝鎖アルキルサルフェート	3.55	15.8			
C <sub>12~14</sub> アルキルサルフェート			1.5		
脂肪鎖長がC <sub>11</sub> ~C <sub>12</sub> の直鎖アルキルベンゼンスルホネート	9.6		10.6	7.5	9
ナトリウムC <sub>14/15</sub> アルコールエトキシ-3-サルフェート	1.15			2.88	
C <sub>14/15</sub> アルキル硫酸ナトリウム	2.37				
平均7モルエトキシ化されたC <sub>14/15</sub> アルコールエトキシレート				1.17	1
モノ-C <sub>8~10</sub> アルキルモノ-ヒドロキシエチルジ-メチル四級アンモニウムクロリド					0.45
ジメチルヒドロキシエチルラウリルアンモニウムクロリド			0.18		
ゼオライトA	13.9	4.7	0.01	2.9	1.8
ケイ酸ナトリウム(1.6比)	4	0.2		4	4
ケイ酸ナトリウム(2.35比)			8		
クエン酸				2.5	1.4
トリポリリン酸ナトリウム			5		
炭酸ナトリウム	24.1	30	16.9	24.4	21
ノノニルオキシベンゼンスルホネート	5.78	2.81	0.96		
オキサジリジン (Oxaziridium) 系漂白増進剤				0.03	0.017
S, S, -エチレンジアミンニコハク酸テトラナトリウム				0.2	
ジエチレントリアミンペンタ(メチレンホスホン酸)ヘプタナトリウム塩	0.61				0.33
ヒドロキシエタンジメチレンホスホン酸				0.29	0.45
エチレンジアミン四酢酸			0.27		
MgSO <sub>4</sub>			0.47	0.5994	0.782
過炭酸ナトリウム	7	4.4		15.9	19.1
テトラアセチルエチレンジアミン				3.3	4.6
過ホウ酸ナトリウム-水和物			1.2		
カルボキシメチルセルロース(例えば、CPKelcoからのFinnifx BDA)	0.1		0.17	1.69	0.23
アクリル酸/マイレン酸コポリマー(70/30)ナトリウム	0.0236	3.8		2	2.5
ポリアクリル酸ナトリウム(Sokalan PA30 CL)	4		0.84		
テレフタレートポリマー				0.23	
ポリエチレングリコール/酢酸ビニルランダムグラフトコポリマー			0.89	0.89	0.91
亜鉛フタロシアニンテトラスルホン酸塩			0.005	0.001	0.002
C. I. 蛍光増白剤260	0.11	0.15	0.04	0.23	0.15
C. I. 蛍光増白剤351 (Tinopal(登録商標)CBS)			0.1		
抑泡剤粒		0.25		0.07	0.04
疎水変性カルボキシメチルセルロース (Finnifx(登録商標)SH-1)			0.019	0.028	
ベントナイト			8.35		
その他の成分(染料、香料、加工助剤、水分及び硫酸ナトリウム)	残部	残部	残部	残部	残部

## 【 0 6 3 7 】

表 D において、界面活性剤成分は、限定するものではないが B A S F ( 例えば、 L U T E N S O L ( 登録商標 ) )、 S h e l l C h e m i c a l s、 S t e p a n、 H u n t s m a n、 及び C l a r i a n t ( 例えば、 P R A E P A G E N ( 登録商標 ) ) が挙げられる、任意の好適な供給元から得ることができる。ゼオライトは I n d u s t r i a l Z e o l i t e などの供給元から得ることができる。クエン酸及びクエン酸ナトリウムは、 J u n g b u n z l a u e r などの供給元から得ることができる。過炭酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム及びセスキ炭酸ナトリウムは、 S o l v a y などの供

10

20

30

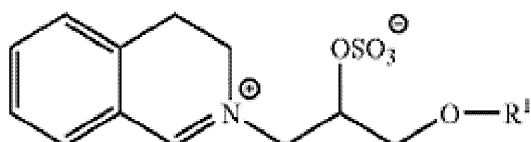
40

50

給元から得ることができる。アクリル酸/マレエートコポリマーは、BASFなどの供給元から得ることができる。カルボキシメチルセルロース及び疎水変性カルボキシメチルセルロースは、CPKelcoなどの供給元から得ることができる。C.I. 蛍光増白剤 260は、3v Sigmaから得ることができる(例えば、OPTIBLANC(登録商標)、OPTIBLANC(登録商標) 2M/G、OPTIBLANC(登録商標) 2MG/LT Extra、又はOPTIBLANC(登録商標) Ecobright)。S, S-エチレンジアミンニコハク酸四ナトリウムは、Innospecなどの供給元から得ることができる。テレフタレートコポリマーは、Clariant(例えば、REPELOTEX SF 2)から得ることができる。加えて、1-ヒドロキシエタン-1, 1-ジホスホン酸は、Thermphosから得ることができる。オキサジリジン系漂白増進剤は、式中、R1 = 2-ブチルオクチルである以下の構造を有するものであり、米国特許第2006/0089284(A1)号に従って製造される。

10

【化2】



【0638】

酵素、NATALASE(登録商標)、TERMAMYL(登録商標)、STAINZYME PLUS(登録商標)、CELLUCLEAN(登録商標)及びMANNAWAY(登録商標)は、NovoZymesから得ることができる。フタロシアニントラシルホン酸亜鉛は、Ciba Specialty Chemicalsから得ることができる(例えば、TINOLUX(登録商標) BMC)。抑泡剤粒は、Dow Corningから得ることができる。これらの洗剤組成物において、ランダムグラフトコポリマーは、ポリエチレンオキシド主鎖と複数のポリビニルアセテート側鎖とを有する、ポリビニルアセテートグラフト化ポリエチレンオキシドコポリマーである。ポリエチレンオキシド主鎖の分子量は約6000であり、ポリエチレンオキシドとポリビニルアセテートとの重量比は約40:60であり、50個のエチレンオキシド単位当たりのグラフト点は1以下である。

20

【0639】

パートII実施例

(実施例1)

アッセイ及び試験方法

本実施例は、これらの実施例に記載される変異体の顕色において使用される様々な試験方法及びアッセイを記載する。提供されるプロトコルからの任意の変更は、関連実施例において示される。アッセイは、Biomek FX Robot(Beckman Coulter)又は多チャンネルピペッター(例えば、Rainin PipetLite(Mettler-Toledo))及びSpectraMAX MTP Reader(340型、Molecular Devices)を用いて、行われた。

30

【0640】

A. 試験方法

試験方法1

染料又は顔料物質が本発明の意図する布地色調剤であるかどうかを明らかにするための手順プロトコルを以下に提供する。

40

【0641】

1) 2つのターゲットメーターポットに英国Newcastle upon Tyneの水道水(総硬度約12グレイン/米ガロン(Northumbrian Water, Pity Me, Durham, Co. Durham, UK)から供給)を800mL充填する。

【0642】

50



2) ポットをターゲットメーターに挿入する。試験中は水温を30 に制御し、攪拌を40 rpmに設定する。

【0643】

3) 各ポットにIEC-B洗剤(IEC 60456 Washing Machine Reference Base Detergent Type B)、wfk(Brugger-Bracht))から供給)を4.8g加える。

【0644】

4) 2分後、第1のポットに活性着色剤を2.0mg加える。

【0645】

5) 1分後、5cm×5cm標本に切断した平坦な綿肌着(Warwick Equest(Consett, County Durham, UK))により供給)50gを各ポットに加える。

【0646】

6) 10分後、ポットを排水し、硬度14.4(イギリスクラーク硬度)を有しカルシウム対マグネシウムのモル比が3:1の冷水(16)を再充填する。

【0647】

7) 2分間すすいだ後、布地を取り出す。

【0648】

8) 同じ処理を用いて工程3~7を更に3サイクル繰り返す。

【0649】

9) 布地を回収し、屋内で12時間自然乾燥させる。

【0650】

10) D65光源及びUVA遮断フィルタを取り付けたHunter Miniscanスペクトロメーターを使用して標本を分析し、ハンターa(赤-緑軸)及びハンターb(黄-青軸)値を得る。

【0651】

11) 各組の布地についてハンターa及びハンターb値の平均値を計算する。着色剤で処理した評価対象布地がa軸又はb軸のいずれかにおいて平均で0.2単位より大きい色相の差を示した場合、本発明の目的のための布地色調剤であると判断される。

【0652】

#### 試験方法2

試験方法2のために、以下に提供されるBMI微小標本アッセイは、顆粒洗剤組成物10(上記表Dを参照されたい)を用いて行われる。洗濯洗剤を、12gpgの硬度を有する水に溶解させ、16の温度に調整し、所望のプロテアーゼ変異体酵素を添加する。次いで、記載されるBMI微小標本アッセイ毎にプロテアーゼ変異体酵素の性能を測定する。性能指数は、配列番号755のアミノ酸配列を有するB. lentus(B. lentus)GG36スブチリシン酵素の性能とプロテアーゼ変異体酵素の性能を比較することにより判定され、全ての場合で酵素投与量は1.6ppmである。1.1以上の性能指数を有するプロテアーゼ変異体酵素は、冷水プロテアーゼ変異体であるとみなされる。

【0653】

#### 試験方法3

試験方法3のために、以下に提供されるBMI微小標本アッセイは、顆粒洗濯洗剤組成物7(上記表Dを参照されたい)を用いて行われる。洗濯洗剤を、6gpgの硬度を有する水に溶解させ、16の温度に調整し、所望のGG36プロテアーゼ変異体酵素を添加する。次いで、記載されるBMI微小標本アッセイ毎にGG36プロテアーゼ変異体酵素の性能を測定する。性能指数は、配列番号755のアミノ酸配列を有するB. lentus(B. lentus)GG36スブチリシン酵素の性能とGG36プロテアーゼ変異体酵素の性能を比較することにより判定され、全ての場合で酵素投与量は4ppmである。1.1以上の性能指数を有するGG36プロテアーゼ変異体酵素は、冷水プロテアーゼ変異体であるとみなされる。

10

20

30

40

50

## 【0654】

## 試験方法4

試験方法4のために、以下に提供されるBMI微小標本アッセイは、顆粒洗濯洗剤組成物7(上記表Dを参照されたい)を用いて行われる。洗濯洗剤を、6gpgの硬度を有する水に溶解させ、16の温度に調整し、所望のGG36プロテアーゼ変異体酵素を添加する。次いで、記載されるBMI微小標本アッセイ毎にGG36プロテアーゼ変異体酵素の性能を測定する。性能指数は、参照酵素GG36-A158Eの性能とGG36プロテアーゼ変異体酵素の性能を比較することにより判定され、上記GG36-A158E参照酵素は、位置158にてアラニンをグルタミン酸に単一置換した(すなわち、A158E変異)配列番号755のB. レンタススブチリシン(B. lentus subtilisin)GG36プロテアーゼアミノ酸配列からなり、すべての場合で酵素投与量は4ppmである。1.0以上の性能指数を有するGG36プロテアーゼ変異体酵素は、冷水プロテアーゼ変異体であるとみなされる。

10

## 【0655】

## 試験方法5

水溶液の伝導度をASTM D1125標準法に従ってアッセイし、単位ミリジーメンズ/cm(本明細書ではmS/cmと略記)で報告する。

## 【0656】

## B. アッセイ

96ウェルマイクロタイタープレートでタンパク質含量を測定するためのTCAアッセイ。

20

## 【0657】

GG36及びGG36変異体に関し、このアッセイは、マイクロタイタープレートで、37、加湿エアレーション下で、250rpmで振盪させながら2~3日増殖させた、枯草菌(B. subtilis)培養上清の、濾過物を用いて開始した。新しい96ウェルの平底マイクロタイタープレート(MTP、Costar 9017培地を透明なポリスチレンプレートと組み合わせた)をアッセイに使用した。最初に、100μL/ウェルの0.25N HClを各ウェルに配置した。次いで、濾過した培養上清を20~25μL加え、溶液を卓上ミキサーで5~10秒混合した(例えば、Lab Line Instruments、タイタープレート震盪機、4825型)。次いで「ブランク」読み取り値を得るために、405nmで光散乱/吸光度を測定した。「試験」読み取りに関し、HClと培養上清の混合物を含有している各ウェルに、100μL/ウェルの30%(重量/体積)トリクロロ酢酸(TCA)を添加し、プレートを室温で10分にわたってインキュベートした。卓上ミキサーで2、3秒未満で溶液を簡単に混合した後、405nmで光散乱/吸光度を測定した。サンプルの濁度/光散乱は、培養上清中の沈殿し得る合計タンパク質の量に相関して増加する。「試験」読み取り値(TCA添加後に上記のように得られた値)から、「ブランク」(TCAは添加せずにHClのみを添加した後に得られた値)読み取り値を減算することで計算を実施し、サンプル中のタンパク質含量の相対的尺度を得た。必要に応じて、既知の変換係数を用い、クローンのAAPFアッセイにより、TCA読み取り値を較正することで、検量線を生成することができる。しかしながら、TCA結果は、50~500百万分率のタンパク質濃度(ppm)(ここで、1ppmは1mg/Lに相当する)に対して直線であることから、所望の性能を有する変異体を選択するために、酵素性能に対して直接プロットすることができる。

30

40

## 【0658】

## 96ウェルマイクロタイタープレートでのAAPFプロテアーゼアッセイ

セリンプロテアーゼ変異体のプロテアーゼ活性を測定するために、N-スクシニル-L-アラニル-L-アラニル-L-プロリル-L-フェニル-p-ニトロアニリド(suc-AAPF-pNA)の加水分解を計測した。使用した試薬溶液は、以下のものであった: 0.005%のTWEEN(登録商標)-80を含有している100mMのトリス/HCl(pH 8.6)(トリス希釈緩衝液)、1mMのCaCl<sub>2</sub>及び0.005%のT

50

WEEN (登録商標) - 80 を含有している 100 mM トリス緩衝液 (pH 8.6) (トリス/Ca 緩衝液)、並びに 160 mM の suc - AAPF - pNA / DMSO (suc - AAPF - pNA 保存溶液) (Sigma : S - 7388)。suc - AAPF - pNA 希釈標準溶液を調製するために、1 mL の suc - AAPF - pNA 原液を 100 mL の トリス / Ca 緩衝液に加え、少なくとも 10 秒にわたってウェルをよく混合した。100  $\mu$ L の希釈プロテアーゼ溶液を 96 ウェル MTP の各ウェルに加え、直ちに 1 mg / mL の suc - AAPF - pNA 希釈標準溶液 190  $\mu$ L を加えてアッセイを実施した。溶液を 5 秒にわたって混合し、吸光度の変化を、25 にて、405 nm で、MTP リーダーの動的解析モードにより読み取りした (5 分毎に 25 回読み取り)。プロテアーゼ活性は AU として表記される (活性 =  $OD \cdot \text{min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ )。 10

#### 【0659】

##### エグリン C 阻害アッセイ

本明細書に記載のセリンプロテアーゼ濃度及び比活性を、エグリン c と呼ばれる阻害剤による滴定で測定した。エグリン c (*leech Hirudo medicinalis*) は、スブチリシン及び ASP プロテアーゼとの相互作用が強いタンパク質阻害剤であり (Heinz et al., *Biochemistry*, 31 : 8755 ~ 66 [1992])、それゆえプロテアーゼ酵素濃度を測定するのに使用することができ、ひいては比活性の算出が可能になる。エグリン c 遺伝子を合成し、標準法により大腸菌 (*E. coli*) で発現させた。特性及び阻害強度は Sigma から購入したエグリン c と同じであった。 20

#### 【0660】

##### (i) エグリン C 原液の濃度測定

既知の比活性を有するバチルス・レントス (*Bacillus Lentus*) スブチリシンのサンプルを、1 mM の  $\text{CaCl}_2$  及び 0.005% TWEEEN (登録商標) - 80 (トリス/Ca 緩衝液) を含有している 100 mM の トリス緩衝液 (pH 8.6) で、上記の AAPF プロテアーゼアッセイに適切な濃度に希釈した。トリス/Ca 緩衝液で、エグリン c 原液の希釈物もいくつか調製した。各希釈エグリン c 溶液のアリコートと、等量のバチルス・レントス (*Bacillus Lentus*) スブチリシン希釈溶液と混合した。エグリン c の非存在下での、阻害されていないスブチリシンの活性を測定するために、エグリン c を含まない トリス / Ca 緩衝液 のみのアリコートも、等量のバチルス・レントス (*Bacillus Lentus*) スブチリシン希釈溶液と混合した。混合溶液を室温で 15 ~ 30 分インキュベートし、次いで各サンプルのプロテアーゼ活性を上記の AAPF アッセイにより測定した。既知の比活性を有するバチルス・レントス (*Bacillus Lentus*) のスブチリシンを用いて、各サンプル中の活性プロテアーゼ濃度を測定した。次いで各サンプル中のエグリン c 濃度を、トリス/Ca 緩衝液のみ (エグリン c を含まない) と混合した未阻害のスブチリシンサンプルと比較したときに観察されるプロテアーゼ活性の減少度に基づいて算出した。したがって、希釈度及び容量が既知のエグリン c 溶液を用い、原液中のエグリン c の濃度を測定した。 30

#### 【0661】

##### (ii) スブチリシン変異体の濃度及び比活性の測定 40

スブチリシン変異体サンプルを、1 mM の  $\text{CaCl}_2$  及び 0.005% TWEEEN (登録商標) - 80 (トリス/Ca 緩衝液) を含有している 100 mM の トリス緩衝液 (pH 8.6) で希釈した。トリス/Ca 緩衝液で、既知の濃度のエグリン c 原液の希釈物もいくつか調製した。各希釈エグリン c 溶液のアリコートと、等量のスブチリシン変異体溶液と混合した。混合溶液を室温で 15 ~ 30 分インキュベートし、次いで各サンプルのプロテアーゼ活性を AAPF アッセイにより測定した。各エグリン c サンプル及び既知の濃度のエグリン c の添加に基づくプロテアーゼ活性の減少を観察することで、各スブチリシン酵素変異体を完全に阻害するのに必要とされるエグリン c 濃度を算出した。この濃度はサンプル中の酵素濃度と等価である。同様に、エグリン c を含まない、トリス/Ca 緩衝液のみのアリコートと各スブチリシン変異体サンプルと混合し、エグリン c の非存在下 50

でのプロテアーゼ活性をA A P Fアッセイにより測定した。次いでスブチリシン変異体の比活性を、上記のように測定した酵素濃度を用い算出した。

#### 【0662】

##### B M I 微小標本アッセイ

血液ミルク及びインク ( B M I ) 染色した、直径 5 . 5 ミリメートルの円形微小標本 ( E M P A 1 1 6 ) を C F T から得た。一方法では、E M P A 1 1 6 B M I 布を水で予めすすぎ、その後、裁断して、96 ウェルのマイクロタイタープレート ( C o r n i n g 3 6 4 1 ) 中に1 ウェルにつき1 標本入れる。第二の方法では、E M P A 1 1 6 布を裁断して直接96 ウェルマイクロタイタープレート ( C o r n i n g 3 6 4 1 ) に入れ、ここで、標本を水で2 度すすぐ。更に200  $\mu$  L のミリQ水を各ウェル/標本に加え、7に設定した卓上ミキサー ( L a b l i n e i n s t r u m e n t s 、タイタープレート震盪機、4825型) で15分にわたって混合することですすぎを行った。洗浄液を除去し、標本に再度200  $\mu$  L の水を加え、更に15分すすぐ。洗浄水を除去し、次いで標本をマイクロタイタープレートで風乾させる。

10

#### 【0663】

洗剤組成物7~11を、ミリQ (脱イオン) 水で、表1-1に記載の最終的な使用濃度に希釈した。これらの洗剤を2 mMの炭酸ナトリウム ( p H 10.3 ) で緩衝化させた。更に、表1-1に記載の最終濃度にするため、水硬度組成物 ( 3 : 1 C a : M g . - C a C l <sub>2</sub> : M g C l <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O ) を各洗剤溶液に添加した。洗剤溶液を室温で0.5時間~2時間にわたって混合し、50 mLのポリプロピレンコニカルチューブで3000  $\times$  gで5~10分遠心分離にかけ、32 アッセイのために室温で保持し、あるいは16 アッセイのためにアイスウォーターバスで予め平衡化した。次いで、B M I 微小標本を含有しているM T P の各ウェルに190  $\mu$  L の所望の洗剤溶液を添加した。この混合物に、希釈した酵素の希釈母液を5~15  $\mu$  L 加え、反応時酵素濃度をおよそ0.25~2  $\mu$  g / m L に調整した。濾過した培養上清から、約2.5~20  $\mu$  g / m L の酵素の希釈母液を調製した ( 上記のT C A アッセイを参照されたい ) 。M T P をテープでシールし、冷蔵庫で予め16 に設定したi E M S 恒温器 / 振盪機 ( T h e r m o / L a b s y s t e m s ) に1400 r p m で攪拌しながら30分間配置し、あるいは卓上に32 にて1400 r p m で攪拌しながら30分間配置した。適切な条件下でインキュベートした後、各ウェルから溶液を120~125  $\mu$  L ずつ新しいM T P ( C o r n i n g 9017 ) に移した。125  $\mu$  L の溶液 / ウェルを含有させた新しいM T P を、M T P S p e c t r a M a x リーダーを用い、600 n m で ( 5 秒混合モードのプレートリーダーにより ) 読み取りした。ブランク対照は微小標本及び洗剤は含有したが、酵素は含有しなかった。得られた吸光度値をブランク値 ( 酵素を除く基質 ) について補正し、加水分解活性を測定した。各サンプル ( 変異体 ) に関し、性能指数を算出した。性能指数は、同じタンパク質濃度下で変異体性能 ( 実測値 ) と標準酵素性能 ( 理論値 ) とを比較する。加えて、理論値は、標準プロテアーゼの性能用量応答曲線 ( p e r f o r m a n c e d o s e r e s p o n s e c u r v e ) のパラメーターを用いて算出することができる。性能指数 ( P I ) が1超 ( P I > 1 ) の場合は、標準 ( 例えば、野生型 ) と比較したときに変異体がより良好なものであることが特定され、一方でP I が1 ( P I = 1 ) である場合は、変異体が標準と同様に機能することが特定され、及びP I が1未満 ( P I < 1 ) の場合は、変異体の働きが標準よりも悪いことが特定される。したがって、P I は優れたプロテアーゼを特定し、並びに特定の状況下での使用が望ましくない変異体を特定する。

20

30

40

【表 4 4】

表1-1: BMI微小標本アッセイに使用した最終的な洗剤、水硬度、及び緩衝液濃度			
洗剤組成物	最終的な洗剤濃度 (g/L)	最終的な水硬度* (gpg)	最終的な炭酸ナトリウム 緩衝液濃度(mM)
7	0.808	6	2
8	1	3	2
9	2.3	12	2
10	5.9	12	2
11	8.3	12	2

## 【0664】

10

## LAS/EDTA安定性アッセイ

代表的なアニオン性界面活性剤(LAS = 直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩、ドデシルベンゼン硫酸ナトリウム DOBS) 及び EDTA ナトリウムの存在下でのプロテアーゼ変異体の安定性を、所定の条件下でのインキュベーション後に測定し、上記 AAPF アッセイを用いて残効性を測定した。試薬は、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム塩(DOBS, Sigma No. D-2525)、TWEEN (登録商標) - 80 (Sigma No. P-8074)、EDTA ナトリウム (Siegfried Hande 1 No. 164599-02)、HEPES (Sigma No. H-7523)、未負荷緩衝液: 50 mM の HEPES (11.9 g/L) + 0.005% TWEEN (登録商標) - 80 (pH 8.0)、負荷緩衝液: 50 mM の HEPES (11.9 g/L) (pH 8.0)、0.1% (w/v) DOBS (1 g/L)、10 mM の EDTA (3.36 g/L) (pH 8.0)、参照プロテアーゼ及びプロテアーゼ変異体培養上清(200~400 µg/mL のタンパク質を含有)を使用した。装置は、希釈プレートとして V 又は U 底 MTP (それぞれ Greiner 651101 及び 650161)、未負荷及び LAS/EDTA 緩衝液用平底 MTP (Corning 9017)、並びに suc-AAPF-pNA プレート、Biomek FX (Beckman Coulter)、Spectramax Plus 384 MTP リーダー (Molecular Devices) 及び iEMS 恒温器/振盪機 (Thermo Electron Corporation) を使用した。

20

## 【0665】

30

iEMS 恒温器/振盪機 (Thermo/Labsystems) は 29 に設定する。培養上清を、未負荷緩衝液を含有しているプレートで約 25 ppm 濃度に希釈した(マスター希釈プレート)。アッセイのため、マスター希釈プレートから、20 µL のサンプルを、180 µL の未負荷緩衝液を含有しているプレートに加え、最終インキュベーション濃度 2.5 ppm を得た。含有物を混合し、室温で維持し、このプレートで AAPF アッセイを実施した。加えて、マスター希釈プレートから、20 µL のサンプルを、180 µL 負荷緩衝液(50 mM の HEPES (11.9 g/L)、0.1% (w/v) DOBS (1 g/L)、10 mM の EDTA (3.36 g/L) (pH 8.0)) を含有しているプレートに加えた。溶液を混合し、直ちに、29 の iEMS 震盪機に 400 rpm で 30 分間配置した。30 分インキュベーションした後、AAPF アッセイを負荷プレートで実施した。次のように残留及び開始 AAPF 比を算出することにより、サンプルの安定性を測定した: 残効性 (%) = [mOD.min - 1 ストレス負荷] \* 100 / [mOD.min - 1 ストレス未負荷]。

40

## 【0666】

最終的な洗剤、水硬度及び緩衝液濃度は、使用したアッセイ系に基づいて決定した(例えば、北アメリカ、日本、西ヨーロッパ又は中央ヨーロッパ条件)。一部の態様では、プロテアーゼ変異体のシミ除去性能は、市販の洗剤で判定される。市販の洗剤配合物の加熱不活性化は、任意のタンパク質成分の酵素活性を破壊しつつ、非酵素成分の特性は保持する。したがって、この方法は、本発明の酵素変異体の試験に使用するために、市販の洗剤を調製するのに好適である。

50

## 【0667】

卵を焼付けた微小標本アッセイ

このアッセイに関し、鶏卵黄を用い、卵黄を焼き付けた96ウェルの基材プレートを調製する。鶏卵黄を白身から取り分け、膜嚢から出し、ミリQ水で20%（体積/重量）に希釈した。希釈した黄身を、電磁攪拌器を用い室温で15分にわたって攪拌する。8チャンネルのピペットを用い、96ウェルのV底プレート（Costar #3894）の各ウェルの中央に、注意深く5 $\mu$ Lずつ分取する。プレートを90 $^{\circ}$ で1時間にわたって焼付け、室温に放冷する。卵黄基材を焼き付けたプレートを室温で保管し、調製の一週間以内に使用した。自動食器洗浄用洗剤を本明細書に記載のように調製し、50 $^{\circ}$ に予熱する。8チャンネルのピペットを用い、洗剤の190 $\mu$ Lのアリコートに96ウェルプレートの各ウェルに加える。96チャンネルのピペット装置を用い、希釈酵素を各ウェルに10 $\mu$ L加える。接着箔シーラーによりプレートを注意深くシールし、50 $^{\circ}$ で30分にわたって振盪した。120 $\mu$ Lの反応混合物を新しい96ウェル平底プレートに移し、405nmで吸光度/光散乱を測定した。405nmでの吸光度/光散乱は、卵黄除去度に比例する。

10

## 【0668】

卵黄微小標本アッセイ（「CS-38微小標本アッセイ」；あるいは「卵」又は「食器」）

自動食器洗浄用洗剤を本明細書に記載のように調製する。使用する装置としては、New Brunswick Innova 4230振盪機/恒温機及びSpectraMAX (340型)MTP読み取り機が挙げられる。MTPは、Costar (9017型)から入手する。色素を加えた時効処理卵黄標本（CS-38）をCenter for Test Materials (Vlaardinggen, Netherlands)から入手する。0.25インチ（0.64cm）の微小標本に裁断する前に、布地を水で洗浄する。96ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルに微小標本を1つずつ配置する。試験洗剤を50 $^{\circ}$ にて平衡化させる。微小標本を含有しているMTPの各ウェルに190 $\mu$ Lの所望の洗剤溶液を添加する。この混合物に10 $\mu$ Lの希釈酵素溶液を添加する。MTPを接着箔でシールし、攪拌しながら30分間インキュベーターに配置する。インキュベーションに続いて、各ウェルから100 $\mu$ Lの溶液を新たなMTPに移す。このMTPを、SpectraMAX MTP読み取り機を用いて、405nmにて読み取りする。ブランク対照、並びに微小標本及び洗剤を含有しているが酵素は含有しない対照も包含させた。

20

30

## 【0669】

一部の態様では、予め洗浄した微小標本が使用を見出される。この種類の微小標本は、周囲温度で、脱イオン水により20分にわたって前洗浄する。前洗浄工程後、標本を紙タオルの上に置き乾燥させる。次いで、空気乾燥させた標本を、排出プレス機（expulsion pre）で1/4"円形ダイを用い、切り出す。最終的には2つの微小標本を、表面積全体を曝露させるために96ウェルMTPの各ウェルに垂直に配置する（すなわち、ウェルの底に平らに配置することはない）。

## 【0670】

試験するプロテアーゼ変異体のサンプルを、MTPプレートで増殖させた培養物の培養ブロスの濾過物から得る。装置は以下のものを使用する：Biomek FXロボット（Beckman Coulter）、SpectraMAX MTPリーダー（340型、Molecular Devices）、iEMS恒温器/振盪機（Thermo/Labsystems）、平底MTP（Costar 9017型、インキュベート後に反応プレートを読み取るために使用）、並びにV底MTP（Greiner 651101、上清の前希釈に使用）。本アッセイにおいて、プロテアーゼは基質及び遊離顔料及び基質由来の不溶性粒子を加水分解する。したがって、濁度の変化率は酵素活性の尺度を示す。

40

## 【0671】

50

微小標本に対する、参照セリンプロテアーゼ及びセリンプロテアーゼ変異体のシミ除去性能を、市販の洗剤（Calgonit 5 in 1）で、MTPスケールで測定する。CFT Vlaarding enから入手したCS-38微小標本（色素を含む卵黄、加熱により時効処理）を基質として使用する。1ウェルにつき2つの標本を用いる。Calgonit 5 in 1からのADWタブレットを使用して、洗剤溶液を調製する。タブレット中に存在するプロテアーゼ活性を不活性化するために、21gのタブレットを、ウォーターバス内で60の温度に加熱したミリQ水に溶解させる。溶液を室温に冷却し、水の容量を700mLに調整する。溶液を更に水で希釈して、3g/Lの最終濃度を得る。1.46mLのCa/Mg混合物（Ca/Mg混合物〔（3：1）、1.92MのCaCl<sub>2</sub> = 282.3g/LのCaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O；0.64MのMgCl<sub>2</sub> = 130.1g/LのMgCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O）、15000gpg〕を添加することにより、水硬度を21°GHに調整する。酵素サンプルを10mMのNaCl、0.1mMのCaCl<sub>2</sub>、0.005%のTWEEN（登録商標）-80溶液中に予め希釈し、適切な濃度で試験する。

10

## 【0672】

恒温機を所望温度50に設定する。72μLの希釈緩衝液を空のV底プレート（すなわち、「希釈プレート」）に添加し、その後、8μLの上清を得る。希釈プレートから9μLを、171μLの希釈溶液中でインキュベートされた微小標本を含有するプレートに添加する。希釈プレートから9μLを、微小標本を含有するプレートに添加して、総希釈率200Xの上清を得る。微小標本プレート（洗剤及び酵素を有する）をテープで覆い、恒温機/振盪機内に30分にわたって1400rpmで配置する。インキュベーション後、75μLの反応混合物を空のF底プレートに移し、ヘッドライヤーで脱泡した後に、MTP読み取り機で405nmにて吸光度を読み取る。微小標本を1又は2つと、参照プロテアーゼ含有サンプルを添加していない洗剤と、を含有するブランク対照も試験に包含する。

20

## 【0673】

得られた吸光度値をブランク値（酵素を除く基質）について補正し、加水分解活性を測定する。各サンプル（変異体）に関し、性能指数を算出する。性能指数は、同様のタンパク質濃度下で変異体性能（実測値）と標準酵素性能（理論値）とを比較する。加えて、標準酵素のLangmuir等式のパラメーターを用いることで、理論値が算出できる。

30

## 【0674】

## ステンレス鋼上の卵黄シミ

これらの実験に使用されるステンレス鋼シート（10×15cm、片面ブラッシング処理）を、高アルカリ性の市販の洗剤（例えば、ECOLAB（登録商標）洗剤、Henkelを用）いてラボラトリー食器洗浄機で95にて十分に洗浄して、きれいでグリースのないシートを得る。第一回目の使用に先立って、これらのシートは、まくれを取り除いておく。シートを熱キャビネットにおいて80にて30分にわたって乾燥させ、その後、卵黄で汚す。ブラッシング処理される表面は、汚れを付ける前には触れない。また、表面上にいかなる水シミ又は毛羽立ちも許容しない。冷却したシートを汚れを付ける前に計量する。

40

## 【0675】

およそ10～11個の卵の卵黄（200gの卵黄）を卵白から分離することにより、卵黄を調製する。卵黄をガラスピーカーの中でフォークで攪拌して、卵黄懸濁液を均質化する。次に、卵黄を裏漉し（およそ0.5mmのメッシュ）して、粗い粒子及びあらゆる卵殻片を除去する。

## 【0676】

平らなブラシ（2.5"（6.4cm））を使用して、汚れをつけていない約1cm幅の周縁部を残して（必要であれば接着テープを使用する）、ステンレス鋼シートのブラッシング処理するそれぞれの面上の140cm<sup>2</sup>の面積にわたって、可能な限り均質に1.0±0.1g卵黄懸濁液を塗布する。汚れの付いたシートを水平にして（シートの周縁部

50

上に液滴が形成するのを防止するために)、室温にて4時間(最大24時間)にわたって乾燥させる。

【0677】

変性させるために、沸騰している脱塩水の中にシートを30秒にわたって浸漬させる(必要であれば、把持装置を用いる)。次に、シートを80℃にて30分にわたって再び乾燥させる。乾燥及び冷却後、シートを計量する。計量後、シートを少なくとも24時間にわたって(20%、40~60%の相対湿度)置いておき、その後、これらを洗浄試験にかける。試験要件を満たすように、 $500 \pm 100 \text{ mg} / 140 \text{ cm}^2$ (変性後の卵黄)を有するシートのみを試験に用いる。洗浄試験を行った後、シートを熱キャビネット内で80℃にて30分にわたって乾燥させ、冷却後再び計量する。(洗浄により剥離した卵黄の $\text{mg} \times 100$ )を(変性した塗布済み卵黄の $\text{mg}$ )で除算することにより、洗浄性能パーセントを決定する。

10

【0678】

磁器プレート上の挽肉

これらの実験のために、EN 50242、基準1495、第0219に従う直径19cmのデザート皿(Arzberg、白色施釉磁器)を使用する。豚肉及び牛肉(半分ずつ)の赤身225gを、目に見える脂肪を除去した後に細かく刻み、冷却する。この混合物を肉挽き機に2回かける。温度が35℃以上に上昇させることは避ける。次に、225gの挽肉を75gの卵(卵白及び卵黄は一緒に混合した)と共に混合する。調製物を、使用に先立って、最大三カ月-18℃にて冷凍する。豚肉が入手できない場合には、牛肉を使用する。

20

【0679】

挽肉と卵の混合物(300g)を室温に上昇させ、80mLの合成水と共に混合する。次に、2分にわたってキッチンハンドミキサーを用いてこの混合物を均質化する。次に、フォークを使用して、周縁部付近の約2cm幅の汚れのない辺縁を残して、3gの挽肉/卵/水混合物を各白色磁器プレート上に広げる。塗布される量は、 $11.8 \pm 0.5 \text{ mg} / \text{cm}^2$ である。プレートを予熱した熱キャビネット内で120℃にて2時間にわたってプレートを乾燥させた。プレートは冷却されればすぐに使用可能である。プレートは、各プレート間に紙タオルを挟んで積み重ねる。

【0680】

洗浄後、挽肉の残渣の同定を良好に行うために、プレートにニンヒドリン溶液(1%エタノール)を噴霧する。色反応を促進するために、プレートを熱キャビネットにおいて80℃にて10分にわたって加熱する。IKW写真カタログ(IKW)を参照しながら挽肉残渣の色反応を目視することにより、洗浄性能の評価を行う。

30

【0681】

ステンレス鋼上の卵/ミルクシミ

これらの実験に使用されるステンレス鋼シート(10×15cm、片面ブラッシング処理)を、高アルカリ性の市販の洗剤を用いてラボラトリー食器洗浄機で95℃にて十分に洗浄して、グリースを除去してシートをクリーニングする。シートをセルロース布で磨き、乾燥させる。ブラッシング処理される表面は、汚れを付ける前には触れない。また、表面上にいかなる水シミ又は毛羽立ちも許容しない。汚れを付ける前に、シートを熱キャビネット内に80℃にて30分にわたって置いておく。汚れを付ける前に冷却したシートを計量する。

40

【0682】

生の全卵の卵黄及び卵白(3~4個の卵、160g/卵)をボウル内に配置し、卵泡立て器で叩く。次に、50mLの準脱脂UHT(1.5%脂肪分、超高温、均質化)ミルクを混合物に添加する。ミルク及び卵を泡が生じないように混合する。平坦なブラシを使用して、ステンレス鋼シートのブラッシング処理された面に $1.0 \text{ g} \pm 0.1 \text{ g}$ の卵/ミルク混合物を均一に分布させ、均一に塗れたか秤を用いて確かめる。およそ1.0cmの周辺部をシートの短辺の周りに残す。汚れの付いたシートを水平にして(シートの周縁部上

50



に液滴が形成するのを防止するために)、室温にて4時間(最大24時間)にわたって乾燥させる。

#### 【0683】

次に、シートを沸騰している脱塩水の中に30秒にわたって浸漬させる(必要であれば、把持装置を用いる)。次に、シートを80℃にて30分にわたって再び乾燥させる。乾燥及び冷却後、シートを計量する。計量後、シートを少なくとも24時間にわたって(20%、40~60%の相対湿度)置いておき、その後、これらを洗浄試験にかける。試験要件を満たすように、 $190 \pm 10$  mgの卵黄の付いたシートのみを使用する。

#### 【0684】

洗浄試験を行った後、シートを熱キャビネット内で80℃にて30分にわたって乾燥させ、冷却後再び計量する。(洗浄により剥離した卵/ミルクのmg  $\times$  100)を(塗布済み卵/ミルクのmg)で除算することにより、洗浄性能百分率を決定する。

#### 【0685】

磁器プレート上のスパゲッティ混合ジミの調製

パスタソース(390g)を150gのゆでたスパゲッティパスタ、25gの挽肉(改善されたIKW組成-225グラムの無脂肪挽肉及び75グラム卵黄)並びに50gのGrozzette Formaggioチーズと混合する。スプーンを使用して、周縁部付近の約2cm幅の汚れのない辺縁を残して、この混合物3gを各白色磁器プレート(Arzberg、直径19cm、白色、施釉磁器、EN 50242、基準1495、第0219に従う)上に広げる。これらをオーブン内で120℃にて2時間にわたって焼くことにより、プレートを乾燥させる。プレートは冷却されればすぐに使用可能である。プレートは、保管する際各プレート間に紙タオルを挟んで積み重ねる。洗浄後、炭水化物残渣の同定を良好に行うために、プレートにヨウ素溶液(0.05N)を噴霧する。IKW写真カタログ(IKW)を参照しながら炭水化物残渣の色反応を目視することにより、洗浄性能の評価を行い、0~10の尺度で評価する(10がきれいである)。

#### 【0686】

性能指数

性能指数は、同じタンパク質濃度下で変異体性能(実測値)と標準酵素性能(理論値)とを比較する。加えて、理論値は、標準プロテアーゼの性能用量応答曲線(performance dose response curve)のパラメーターを用いて算出することができる。以下に示される様々な用語は変異体を記載するために使用される: 有害でない変異体は $PI > 0.05$ であり、有害な変異体は $PI = 0.05$ であり、組み合わせ可能な変異体は少なくとも1つの特性について性能指数が0.2以上であり、かつすべての特性について $> 0.05$ である変異体である。組み合わせ可能な変異体は、1つ以上の所望の特性について適切な性能指数を有する送達タンパク質と組み合わせることができる。これらのデータは、任意のサブチリシン/サブチラーゼを設計するために使用される。サブチラーゼが、特定の位置でサブチリシンGG36と異なるアミノ酸を有するように設計された場合でさえも、これらのデータは、GG36野生型のアミノ酸の置換を含む最良の置換の選択を特定することにより、所望の特性を変更する置換を発見するのに使用される。

#### 【0687】

(実施例2)

部位評価ライブラリ(SEL)を用いるGG36単独変異体の生産

本実施例に記載のGG36SELの構築は、その適切な方法、並びに遺伝子最適化、遺伝子合成、ライブラリ作成、及び解析のための技術基盤を用いGENEARTにより実施された(国際公開第2004/059556(A3)号、欧州特許番号第0200362号及び同第0201184号、並びに米国特許第4,683,195号、同第4,683,202号及び同第6,472,184号)。GG36SELは、枯草菌(*B. subtilis*)発現プラスミドpHPLT-GG36(図6を参照)を用い、本発明者らにより予め選択された位置で作成した。この枯草菌(*B. subtilis*)発現プラスミドは、以下に示すGG36発現カセットを含有する: パチルス・リケニホルミス(*B. licheniform*

10

20

30

40

50

is) のLATプロモーター (Plat)、並びにレプリカーゼ遺伝子 (reppUB)、ネオマイシン/カナマイシン耐性遺伝子 (neo) 及びブレオマイシン耐性マーカ (bleo) が挙げられる、pUB110由来の更なる要素 (McKenzie et al., Plasmid, 15:93~103, 1986) (米国特許第6,566,112号、図4)。pHPLT-GG36プラスミドマップを図6に提供する。GG36発現カセット配列は以下に提供されるものである。

## 【0688】

GG36のDNA配列 (シグナル配列は小文字で示され、プロペプチドは下線の引かれている小文字で示され、及びGG36成熟配列は大文字で示される) は以下に提供されるものである :

## 【配列表3】

## 【0689】

Gtgagaagcaaaaaattgtgatcgtcgcgtcgaccgactactcatttctgttgccttcagttcatcgcgcgcgctgctgaagaagcaaaaagaaaa  
atatttaattggccttaattgagcaggaagctgtcagtgagttgtagaacaagtagaggcaaatgacgaggtcggcattctctctgagggaagaggaagtcg  
aaattgaattgcttcatgaattgaaacgattcctgttttatccgttgagtttaagcccagaagatgtgacgcgctttagctcgatccagcgatttctatattg  
aagaggatgcagaagtaacgacaatgGCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGCCGTGTGCAAGCCCCAGC  
 TGCCCATAACCGTGGATTGACAGGTTCTGGTGTAAAAGTTGCTGTCCTCGATACAGGTATTT  
 CCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTTGTACCAGGGGAACCATCCACT  
 CAAGATGGGAATGGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGACGATTGCTGCTTTAAACAATTCGA  
 TTGGCGTTCTTGGCGTAGCGCCGAGCGCGGAACATAACGCTGTAAAGTATTAGGGGCGAG  
 CGGTTTCAGGTTTCGGTCAGCTCGATTGCCCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATGGCATG  
 CACGTTGCTAATTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCAAGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTAA  
 TAGCGCGACTTCTAGAGGCGTTCTTGTGTAGCGGCATCTGGAAATTCAGGTGCAGGCTCAA  
 TCAGCTATCCGGCCCCGTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGACCAAAAACAACAA  
 CCGCGCCAGCTTTTTCACAGTATGGCGCAGGGCTTGACATTGTCGCACCAGGTGTAAACGTGC  
 AGAGCACATAACCCAGGTTCAACGTATGCCAGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCAT  
 GTTGCAGGTGCAGCAGCCCTTGTTAAACAAAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTACAAATCCG  
 CAATCATCTAAAGAATACGGCAACGAGCTTAGGAAGCACGAACCTGTATGGAAGCGGACTT  
 GTCAATGCAGAAGCTGCAACTCGTTAA (配列番号756)

GG36のタンパク質配列 (シグナル配列は小文字で示され、プロペプチドは下線の引かれている小文字で示され、及びGG36成熟型プロテアーゼ配列は大文字で示される) は以下に提供されるものである :

## 【配列表4】

## 【0690】

vrskklwivastallisvafssiasaaeeakkyliqfneqevsefveqveandevailseeeeveieillhefetipvlsvlspedvdaleldpaisy  
ieedaevttmAQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPSTQD  
 GNGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVA  
 NLSLGSPSPSATLEQAVNSATSRGVLVVAASGNSGAGSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASF  
 QYGAGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNVQIRNHLKN  
 TATSLGSTNLYGSLVNAEAATR (配列番号757)

変異誘発の方法は、所望の部位に縮重コドン、NNS ((A、C、T又はG)、(A、C、T又はG)、(C又はG)) を含有する順方向及び逆方向変異原性プライマーを用い、所望の特定のコドンにすべての可能なアミノ酸置換を同時に生成する、コドン特異的な変異法に基づくものであった。各GG36SELを構築するために、3種のPCR反応

10

20

30

40

50

を実施した：2種の変異誘発反応（一次PCR1及びPCR2）では、NNS順方向及び逆方向変異原性プライマー（25～45ヌクレオチド長）を用い、成熟GG36DNA配列中に所望の成熟コドンを導入し、第三の反応では2つの変異誘発PCR産物を一緒に融合させて、成熟GG36配列中に所望の変異コドンを含むpHPLT-GG36発現ベクターを構築する。

【0691】

本実施例で使用されるプライマー配列は以下に提供されるものである：

【表45】

表2-1. プライマー	
配列	プライマー名
CGCGCTT <b>GAGCTC</b> GATCCAGCGATTTTC(配列番号758)	SacI-Fw
GTCTCCA <b>AAGCTT</b> TAACGAGTTGCAG(配列番号759)	HindIII-RV
GCAATTC <b>AGATCT</b> TCCTTCAGGTTATGACC(配列番号760)	pHPLT-BgIII-Fw
GCATCGA <b>AGATCT</b> GATTGCTTAACTGCTTC(配列番号761)	pHPLT-BgIII-RV

10

【0692】

すべてのPCRにPhusion High-Fidelity DNAポリメラーゼ（Finnzymesカタログ番号F-530L）を使用し、ポリメラーゼを供給している製造元のプロトコルに従い反応を実施した。具体的には、一次PCR1では、1μL（10μM）の各pHPLT-BgIII-Fwプライマー及びNNS逆方向変異原性プライマーを使用し、一次PCR2では、1μL（10μM）のpHPLT-BgIII-RVプライマー及びNNS順方向変異導入プライマーを使用した。また、各反応には、1μLのpHPLT-GG36プラスミドテンプレートDNA（0.1～1ng/μL）を含んだ。PCRには、MJ Research PTC-200 Peltier thermal cyclerを使用した。この反応は、対象とするGG36コドン挟んでおよそ30ヌクレオチドが重複している、およそ2～3kbの断片を2種生成した。得られた断片を、1μLの一次PCR1反応混合物、1μLの一次PCR2反応混合物、及び1μL（10μM）の各順方向及び逆方向SacI-Fw及びHindIII-RVプライマーを用い、上記のものと同様の第三PCRで融合させた。GG36変異体遺伝子をコードしている、増幅させた線状の859bpの断片を精製し（QIAGEN（登録商標）Qiagquick PCR精製キットを用いた）、SacI及びHindIII制限酵素で消化して融合断片の両端に接着端を作製した。SacI及びHindIIIで消化した後、約50ngのプラスミドpHPLT-GG36も精製し、3.9kbのベクター主鎖断片を得た。接着端をクローニングするための製造元のプロトコルに従い、T4 DNAリガーゼ（Invitrogen）を用い、消化したベクター断片を、変異体酵素をコードしている消化した859bp断片50ngとライゲーションした。続いて、ライゲーション混合物を使用して枯草菌（*B. subtilis*）細胞を国際公開第2002/014490号に記載のように形質転換した（*aprE*, *nprE*, *oppA*, *spoIIIE*, *degUHy32*, *amyE* :: [*xyLR*, *pxyLA-comK*]）。

20

30

【0693】

更なる生化学的解析のために変異体タンパク質を発現させるべく、GG36変異体プラスミドを保持している枯草菌（*B. subtilis*）株を、10μg/mLのネオマイシンを添加した150μLのルリアブロス培地を含有しているマイクロタイタープレートに接種した。マイクロタイタープレートにEnzyScreen lid（EnzyScreen）を用い、プレートを37℃、80%湿度にて、300rpmで振盪させながら一晚増殖させた。10μg/mLのネオマイシンを添加した190μLのMBD培地（MOPS系合成培地）を含有している新しいマイクロタイタープレートに、一晚培養プレートから10マイクロリットル接種した。NH<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>、FeSO<sub>4</sub>、及びCaCl<sub>2</sub>を基本培地から除外したこと、3mMのK<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>を用いたこと、並びに、60mMの尿素、及び、210g/Lのグルコースと350g/Lマルトデキストリンとから作製した100mL

40

50

の溶液を含有させたこと、を除き、MBD培地は本質的に当該技術分野において既知であるように調製した(Neidhardt et al., J. Bacteriol. 119: 736~747 [1974]を参照されたい)。微量栄養素は、400mgの $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、100mgの $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、100mgの $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、50mgの $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、100mgの $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、100mgの $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、100mgの $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 、10mLの1Mの $\text{CaCl}_2$ 、及び10mLの0.5Mのクエン酸ナトリウムを1リットル中に含有している、100X原液として調製した。タンパク質発現を測定するために、EnzyScreen lids (EnzyScreen)を用いて、MBD培地を含有しているマイクロタイタープレートで、37℃、80%湿度にて、300rpmで、68時間にわたって増殖させた。翌日、培養物をマイクロフィルタプレート(0.22 $\mu\text{m}$ 、Millipore)で濾過し、得られた濾液を生化学的解析に使用した。洗剤組成物7~11のTCA及びBMI微小標本アッセイを、実施例1に記載のように実施した。性能指数も、実施例1記載のBMIアッセイに記載のように算出した。これらは、表2-2中でGG36と比較して示される。以下の表中で、洗剤組成物は、上記表Dに示されるものと対応する。同様に、記載のように、アミノ酸位置はBPN'の番号付けに従って列挙される。

【表 4 6 - 1】

表2-2. 16°Cでの洗剤7~11でのTCA又はBMI微小標本クリーニングのいずれかにおいて、GG36と比較して、少なくとも0.2の性能指数を有するGG36の単独変異体		
GG36アミノ酸位置 (BPN'番号付け)	野生型残基	変異型残基
1	A	R
2	Q	A
2	Q	R
2	Q	S
2	Q	M
2	Q	W
3	S	R
4	V	R
4	V	S
4	V	C
8	I	A
9	S	W
9	S	F
9	S	A
10	R	A
10	R	M
10	R	S
10	R	H
12	Q	F
12	Q	R
14	P	F
14	P	K
14	P	Q
15	A	R
15	A	F
16	A	S
17	H	R
17	H	F
17	H	M
18	N	R
18	N	K
20	G	R
20	G	K
20	G	F
22	T	R
22	T	Q
22	T	L

表2-2. 16°Cでの洗剤7~11でのTCA又はBMI微小標本クリーニングのいずれかにおいて、GG36と比較して、少なくとも0.2の性能指数を有するGG36の単独変異体		
22	T	V
22	T	W
22	T	Y
22	T	A
23	G	A
23	G	S
23	G	F
24	S	R
24	S	W
24	S	H
24	S	L
24	S	Q
24	S	F
25	G	R
25	G	F
25	G	V
26	V	F
27	K	R
27	K	L
27	K	V
27	K	F
28	V	A
28	V	E
28	V	N
29	A	T
30	V	E
31	L	F
33	T	S
33	T	G
33	T	D
34	G	P
35	I	M
36	S	T
36	S	F
36	S	R
38	T	R
38	T	F
38	T	L
40	P	H
40	P	W

10

20

30

【表 4 6 - 2】

(上記表の続き)

表2-2. 16°Cでの洗剤7~11でのTCA又はBMI微小標本クリーニングのいずれかにおいて、GG36と比較して、少なくとも0.2の性能指数を有するGG36の単独変異体		
GG36アミノ酸位置 (BPN'番号付け)	野生型残基	変異型残基
40	P	R
40	P	N
40	P	T
40	P	L
42	L	I
43	N	R
43	N	A
43	N	S
43	N	W
43	N	F
43	N	I
43	N	D
43	N	M
45	R	T
46	G	R
48	A	R
50	F	C
51	V	W
51	V	F
51	V	H
52	P	F
52	P	N
52	P	E
55	P	Y
57	T	R
59	Q	A
59	Q	F
59	Q	R
60	D	P
60	D	A
60	D	Q
62	N	Q
62	N	E
63	G	S
63	G	A
63	G	M
63	G	V
63	G	T
63	G	H
63	G	Q

【0694】

(上記表の続き)

表2-2. 16°Cでの洗剤7~11でのTCA又はBMI微小標本クリーニングのいずれかにおいて、GG36と比較して、少なくとも0.2の性能指数を有するGG36の単独変異体		
63	G	I
63	G	D
63	G	E
63	G	P
64	H	F
64	H	T
68	V	A
68	V	C
69	A	N
69	A	T
69	A	W
69	A	P
71	T	G
72	I	C
74	A	C
75	L	R
75	L	A
75	L	E
75	L	F
78	S	R
78	S	I
78	S	N
79	I	Q
79	I	W
81	V	R
82	L	R
82	L	T
82	L	M
82	L	F
82	L	V
85	A	M
86	P	W
86	P	I
86	P	L
89	E	P
89	E	W
89	E	T
89	E	I
89	E	H
89	E	V
89	E	F
89	E	L

10

20

30

40

【表 4 6 - 3】

(上記表の続き)

表2-2. 16°Cでの洗剤7~11でのTCA又はBMI微小標本クリーニングのいずれかにおいて、GG36と比較して、少なくとも0.2の性能指数を有するGG36の単独変異体		
GG36アミノ酸位置 (BPN'番号付け)	野生型残基	変異型残基
89	E	W
89	E	G
91	Y	F
91	Y	N
92	A	F
94	K	N
99	S	F
99	S	T
99	S	M
99	S	G
99	S	P
100	G	I
100	G	S
100	G	N
100	G	Q
101	S	N
101	S	G
101	S	T
101	S	A
101	S	D
101	S	F
101	S	D
101	S	E
101	S	P
102	G	A
102	G	N
102	G	T
102	G	E
102	G	H
103	S	N
103	S	G
103	S	D
104	V	L
104	V	I
104	V	E
104	V	D
105	S	T
105	S	Q
105	S	E
106	S	V

表2-2. 16°Cでの洗剤7~11でのTCA又はBMI微小標本クリーニングのいずれかにおいて、GG36と比較して、少なくとも0.2の性能指数を有するGG36の単独変異体		
106	S	G
106	S	T
106	S	A
106	S	E
106	S	D
106	S	F
107	I	F
107	I	M
108	A	I
108	A	G
109	Q	M
111	L	V
111	L	I
112	E	V
112	E	L
112	E	Q
114	A	G
115	G	R
115	G	K
116	N	L
116	N	A
116	N	K
117	N	F
118	G	I
118	G	R
119	M	C
120	H	A
120	H	F
120	H	R
121	V	E
121	V	F
123	N	G
123	N	E
124	L	S
128	S	N
128	S	M
128	S	H
128	S	Q
128	S	I
128	S	F
128	S	L
128	S	D

10

20

30

【0695】

(上記表の続き)

40

【表 4 6 - 4】

(上記表の続き)

表2-2. 16°Cでの洗剤7~11でのTCA又はBMI微小標本クリーニングのいずれかにおいて、GG36と比較して、少なくとも0.2の性能指数を有するGG36の単独変異体		
GG36アミノ酸位置 (BPN'番号付け)	野生型残基	変異型残基
129	P	E
132	S	A
132	S	E
138	A	G
144	S	R
147	V	L
148	L	I
158	A	E
159	G	C
159	G	E
160	S	D
166	S	E
166	S	D
167	Y	W
175	M	V
177	V	C
181	D	A
182	Q	R
183	N	D
183	N	R
183	N	I
183	N	F
183	N	M
185	N	I
185	N	E
185	N	V
186	R	H
186	R	K
188	S	R
188	S	E
188	S	D
192	Y	W
192	Y	H
194	A	V
194	A	F
194	A	E
197	D	F
198	I	L
198	I	F
203	V	E

表2-2. 16°Cでの洗剤7~11でのTCA又はBMI微小標本クリーニングのいずれかにおいて、GG36と比較して、少なくとも0.2の性能指数を有するGG36の単独変異体		
203	V	C
208	T	S
209	Y	N
209	Y	S
209	Y	F
209	Y	T
209	Y	H
209	Y	L
209	Y	G
209	Y	E
210	P	V
210	P	R
210	P	L
211	G	R
211	G	Q
212	S	I
212	S	F
212	S	M
213	T	A
214	Y	F
215	A	F
215	A	N
215	A	H
215	A	E
215	A	D
216	S	F
216	S	A
217	L	E
217	L	N
217	L	D
218	N	P
218	N	E
218	N	D
224	T	A
224	T	G
227	V	I
230	A	E
231	A	I
231	A	C
233	L	C
234	V	F
235	K	F

【0696】

(上記表の続き)

10

20

30

40



【表 4 6 - 5】

(上記表の続き)

表2-2. 16°Cでの洗剤7~11でのTCA又はBMI微小標本クリーニングのいずれかにおいて、GG36と比較して、少なくとも0.2の性能指数を有するGG36の単独変異体		
GG36アミノ酸位置 (BPN'番号付け)	野生型残基	変異型残基
236	Q	N
236	Q	F
238	N	R
238	N	K
238	N	L
239	P	R
239	P	S
239	P	R
239	P	H
239	P	N
239	P	K
239	P	T
239	P	F
239	P	G
240	S	R
241	W	R
242	S	R
242	S	L
243	N	R
243	N	F
244	V	R
246	I	S
248	N	I
248	N	V
248	N	R
249	H	R
249	H	T
250	L	I
251	K	R
251	K	S
252	N	R
252	N	F
252	N	H
252	N	I
253	T	R
253	T	F
253	T	I
254	A	C
256	S	N
258	G	R

表2-2. 16°Cでの洗剤7~11でのTCA又はBMI微小標本クリーニングのいずれかにおいて、GG36と比較して、少なくとも0.2の性能指数を有するGG36の単独変異体		
260	T	V
260	T	I
262	L	H
262	L	D
263	Y	F
265	S	F
267	L	N
267	L	M
267	L	V
269	N	R
269	N	I
270	A	C
271	E	T
271	E	V
271	E	L
271	E	H
271	E	F
271	E	P
271	E	A
271	E	M
271	E	I
272	A	F
272	A	R
273	A	I
273	A	F
274	T	G

10

20

30

40

【0 6 9 7】

(上記表の続き)

【表 4 7】

表2-3. 32°Cでの洗剤7でのGG36 BMI微小標本 クリーニングと比較して、少なくとも1.5の 性能指数を有するGG36の単独変異体
GG36変異体
N62E
A158E
G159E

【表 4 8】

表2-4. 32°Cでの洗剤10でのGG36 BMI微小標本 クリーニングと比較して、少なくとも1.2の 性能指数を有するGG36単独変異体
GG36変異体
A1R
S78R
V244R
N269R
E271L

10

20

## 【0698】

(実施例3)

GG36変異体のNHJ1及びWCE1のセットの構築及びクリーニング性能  
本明細書に記載の、上記の枯草菌 (*B. subtilis*) 発現プラスミド pHPLT-GG36 (図6) を用い、GG36変異体のNHJ1及びWCE1セットをDNA2.0により構築した。変異体を実施例2に記載のように枯草菌 (*B. subtilis*) 細胞で発現させ (遺伝子型: aprE, nprE, amyE::xy1RPxy1AcomK-phleo)、更に、実施例1に記載のようにタンパク質含量を測定するためのTCAアッセイ、LAS/EDTA安定性アッセイ、及びBMI微小標本クリーニングアッセイを用いて特

30

【表 4 9 - 1】

表3-1. 16℃での、洗剤7、8又は9での、TCA、LAS/EDTA安定性、又はBMI微小標本クリーニングのうちの任意の一つにおいて、GG36と比較して少なくとも0.25の性能指数を有するNHJ1変異体	
GG36変異体 (BPN' 番号付け)	
N062E-A158E	
S103G-A158E	
S128N-A158E	
A016S-A158E	10
V104L-A158E	
E089P-A158E	
L111V-A158E	
T022A-A158E	
S101A-A158E	
L148I-A158E	
P129E-A158E	
T022A-E089P	
A016S-E089P	
N062E-E089P	
N062E-E271F	20
A158E-E271F	
R186H-E271F	
P129E-E271F	
L111V-E271F	
Y209E-E271F	
A016S-E271F	
S188D-E271F	
T022A-E271F	
G159E-E271F	
V104L-E271F	
S101A-E271F	30
E089P-E271F	
S128N-E271F	
S103G-E271F	
L148I-E271F	
H249R-E271F	
N062E-G159E	
A016S-G159E	
S128N-G159E	
L148I-G159E	
L111V-G159E	
E089P-G159E	40
T022A-G159E	
P129E-G159E	

## 【表 4 9 - 2】

(上記表の続き)

表3-1. 16℃での、洗剤7、8又は9での、TCA、LAS/EDTA安定性、又はBMI微小標本クリーニングのうちの任意の一つにおいて、GG36と比較して少なくとも0.25の性能指数を有するNHJ1変異体	
GG36変異体 (BPN' 番号付け)	
S103G-G159E	
V104L-G159E	
A158E-G159E	10
S101A-G159E	
A158E-H249R	
L111V-H249R	
P129E-H249R	
N062E-H249R	
A016S-H249R	
R186H-H249R	
L148I-H249R	
G159E-H249R	
S101A-H249R	
S188D-H249R	20
V104L-H249R	
Y209E-H249R	
T022A-H249R	
S128N-H249R	
S103G-H249R	
E089P-H249R	
T022A-L111V	
S101A-L111V	
A016S-L111V	
V104L-L111V	
N062E-L111V	30
S103G-L111V	
E089P-L111V	
A016S-L148I	
N062E-L148I	
T022A-L148I	
P129E-L148I	
V104L-L148I	
S103G-L148I	
S128N-L148I	
S101A-L148I	
E089P-L148I	
L111V-L148I	40
A016S-N062E	

## 【 0 6 9 9 】

(上記表の続き)

【表 4 9 - 3】

(上記表の続き)

表3-1. 16℃での、洗剤7、8又は9での、TCA、LAS/EDTA安定性、又はBMI微小標本クリーニングのうちの任意の一つにおいて、GG36と比較して少なくとも0.25の性能指数を有するNHJ1変異体	
GG36変異体 (BPN' 番号付け)	
T022A-N062E	
N062E-P129E	
T022A-P129E	10
S128N-P129E	
A016S-P129E	
S101A-P129E	
V104L-P129E	
E089P-P129E	
S103G-P129E	
L111V-P129E	
N062E-R186H	
S128N-R186H	
S101A-R186H	
T022A-R186H	20
A016S-R186H	
A158E-R186H	
E089P-R186H	
P129E-R186H	
G159E-R186H	
S103G-R186H	
V104L-R186H	
L111V-R186H	
L148I-R186H	
N062E-S101A	
T022A-S101A	
A016S-S101A	30
E089P-S101A	
N062E-S103G	
T022A-S103G	
A016S-S103G	
S101A-S103G	
E089P-S103G	
N062E-S128N	
A016S-S128N	
T022A-S128N	
S101A-S128N	
V104L-S128N	40
E089P-S128N	
S103G-S128N	

【 0 7 0 0】

(上記表の続き)

【表 4 9 - 4】

(上記表の続き)

表3-1. 16℃での、洗剤7、8又は9での、TCA、LAS/EDTA安定性、又はBMI微小標本クリーニングのうちの任意の一つにおいて、GG36と比較して少なくとも0.25の性能指数を有するNHJ1変異体	
GG36変異体 (BPN' 番号付け)	
L111V-S128N	
L111V-S188D	
N062E-S188D	10
A016S-S188D	
L148I-S188D	
T022A-S188D	
S128N-S188D	
S101A-S188D	
V104L-S188D	
E089P-S188D	
P129E-S188D	
G159E-S188D	
R186H-S188D	
S103G-S188D	20
A158E-S188D	
A016S-T022A	
A016S-V104L	
T022A-V104L	
S101A-V104L	
N062E-V104L	
S103G-V104L	
E089P-V104L	
G159E-Y209E	
L111V-Y209E	
S101A-Y209E	
A016S-Y209E	30
S128N-Y209E	
L148I-Y209E	
P129E-Y209E	
N062E-Y209E	
T022A-Y209E	
S103G-Y209E	
A158E-Y209E	
S188D-Y209E	
V104L-Y209E	
E089P-Y209E	
R186H-Y209E	40
GG36	

【0701】

(上記表の続き)

【表 5 0 - 1】

表3-2. 16℃での、洗剤10又は11での、TCA、LAS/EDTA安定性、又はBMI微小標本クリーニングのうちの任意の一つにおいて、GG36と比較して少なくとも0.2の性能指数を有するWCE1変異体	
GG36変異体(BPN'番号付け)	
N018R-W241R	
G020R-W241R	
S024R-W241R	
S009A-W241R	10
G020R-W241R	
V004R-W241R	
N043R-W241R	
S078R-W241R	
T022R-W241R	
G115R-W241R	
A001R-W241R	
S212F-W241R	
L082R-W241R	
N018R-V244R	
S024R-V244R	20
S078R-V244R	
G020R-V244R	
S212F-V244R	
S009A-V244R	
L082R-V244R	
A001R-V244R	
N043R-V244R	
T022R-V244R	
V004R-V244R	
G115R-V244R	
W241R-V244R	30
S242R-V244R	
A001R-V004R	
S009A-T022R	
N018R-T022R	
G020R-T022R	
V004R-T022R	
A001R-T022R	
S024R-S242R	
N018R-S242R	
V004R-S242R	40
G020R-S242R	
S212F-S242R	

## 【表 5 0 - 2】

(上記表の続き)

表3-2. 16℃での、洗剤10又は11での、TCA、LAS/EDTA安定性、又はBMI微小標本クリーニングのうちの任意の一つにおいて、GG36と比較して少なくとも0.2の性能指数を有するWCE1変異体	
GG36変異体(BPN'番号付け)	
L082R-S242R	
S078R-S242R	
A001R-S242R	10
S009A-S242R	
T022R-S242R	
G115R-S242R	
N043R-S242R	
W241R-S242R	
N018R-S212F	
T022R-S212F	
V004R-S212F	
S024R-S212F	
A001R-S212F	
G115R-S212F	20
G020R-S212F	
S009A-S212F	
N043R-S212F	
S078R-S212F	
L082R-S212F	
S009A-S078R	
G020R-S078R	
S024R-S078R	
T022R-S078R	
N018R-S078R	
V004R-S078R	30
A001R-S078R	
N043R-S078R	
T022R-S024R	
G020R-S024R	
N018R-S024R	
A001R-S024R	
V004R-S024R	
S009A-S024R	
V004R-S009A	
A001R-S009A	
S242R-N269R	40
S024R-N269R	
G020R-N269R	
T022R-N269R	
H249R-N269R	

## 【0702】

(上記表の続き)



## 【表 5 0 - 3】

(上記表の続き)

表3-2. 16℃での、洗剤10又は11での、TCA、LAS/EDTA安定性、又はBMI微小標本クリーニングのうちの任意の一つにおいて、GG36と比較して少なくとも0.2の性能指数を有するWCE1変異体	
GG36変異体(BPN'番号付け)	
S212F-N269R	
N043R-N269R	
V244R-N269R	10
A001R-N269R	
N018R-N269R	
S078R-N269R	
S009A-N269R	
G115R-N269R	
W241R-N269R	
V004R-N269R	
L082R-N269R	
N018R-N043R	
G020R-N043R	
V004R-N043R	20
T022R-N043R	
S009A-N043R	
A001R-N043R	
S024R-N043R	
S009A-N018R	
V004R-N018R	
A001R-N018R	
S024R-L082R	
S009A-L082R	
N018R-L082R	
A001R-L082R	30
S078R-L082R	
G020R-L082R	
T022R-L082R	
V004R-L082R	
N043R-L082R	
N043R-H249R	
G020R-H249R	
V004R-H249R	
N018R-H249R	
S009A-H249R	
S212F-H249R	40
T022R-H249R	
S024R-H249R	
G115R-H249R	
A001R-H249R	

## 【0703】

(上記表の続き)

## 【表 5 0 - 4】

(上記表の続き)

表3-2. 16℃での、洗剤10又は11での、TCA、LAS/EDTA安定性、又はBMI微小標本クリーニングのうちの任意の一つにおいて、GG36と比較して少なくとも0.2の性能指数を有するWCE1変異体	
GG36変異体(BPN' 番号付け)	
L082R-H249R	
S242R-H249R	
W241R-H249R	10
V244R-H249R	
S078R-H249R	
N018R-G115R	
G020R-G115R	
T022R-G115R	
S078R-G115R	
S009A-G115R	
V004R-G115R	
A001R-G115R	
L082R-G115R	
N043R-G115R	20
S024R-G115R	
S009A-G020R	
N018R-G020R	
V004R-G020R	
A001R-G020R	
S009A-E271L	
G020R-E271L	
S024R-E271L	
V244R-E271L	
W241R-E271L	
N043R-E271L	30
T022R-E271L	
H249R-E271L	
S212F-E271L	
G115R-E271L	
S242R-E271L	
S078R-E271L	
V004R-E271L	
N269R-E271L	
A001R-E271L	
N018R-E271L	
L082R-E271L	40
GG36	

## 【0704】

(上記表の続き)

(実施例4)

GG36変異体のNHJ4セットの構築及びクリーニング性能

下表4-4に記載のGG36変異体のNHJ4セットを、以下に記載するように、融合PCR又はQUIKCHANGE(登録商標)Multi Site-Directed Mutagenesis Kit(「QCMSキット」、Stratagene)を使用し、枯草菌(B. subtilis)発現プラスミドpHPLT-GG36(図6)を用い構築

した。

【0705】

a) QUIKCHANGE (登録商標) Multi Site - Directed Mutagenesisによる、NHJ4変異体の構築

QUIKCHANGE (登録商標) Multi Site - Directed Mutagenesisを用いて生成した変異体を表4-1に示す。製造元からの取扱説明書に従って、2マイクログラムのDNA及びDamメチラーゼ (NEB)を用い、親プラスミドpHPLT-GG36 (テンプレートDNA)をメチル化した。部位特異的な変異体を、製造元のプロトコルに従って、QuikChange (登録商標) Multi Site - Directed Mutagenesis Kit (「QCMSキット」、Stratagene)により作成した。以下の変異を親プラスミドに導入した：S101A-S103G-V104L, G159E, T22A, Y209E, E271F, S101A, S103G, L111V, S128N, N62E, 及びS188D。枯草菌 (*B. subtilis*)を効率的に形質転換するため、Illustra TempliPhiキット (GE Healthcare)を用い、ローリング・サークル型増幅 (RCA)によりQCMS反応混合物からDNAを増幅させ、製造元のプロトコルに従い反応を実施した。1マイクロリットルの、10倍希釈した増幅DNAを使用して、コンピテントな枯草菌 (*B. subtilis*)細胞 (遺伝子型: aprE, nprE, amyE::xyLRPxyLAcomK-phleo) 50 $\mu$ Lを形質転換させた。形質転換混合物を37 $^{\circ}$ Cにて1時間にわたって振盪した。形質転換混合物の10マイクロリットルアリコートをし、10 $\mu$ g/mLのネオマイシン (Teknova)を添加したスキムミルク (1.6%) Luria寒天プレートに蒔いた。続いて、プラスミドDNAを抽出するため (QIAprep Spinミニプレップキット、Qiagen)、ハローを生じたコロニーを10 $\mu$ g/mLのネオマイシンを含有している120 $\mu$ LのLB培地に接種した。抽出したプラスミドを配列決定して、所望の変異が存在しているか確認した。

【0706】

b) 伸長PCRによるNHJ4変異体の構築

伸長PCRにより、GG36のコンピナトリアル変異体を10種作成した。pHPLTプラスミドに含有させたGG36遺伝子に導入した変異のリストは、T22A, N62E, S103G, S103G-L111V, S101G-S103A-V104I, S101A-S103G-V104L, S101A, S128N, G159D, G159E, Y209E, 及びL111Vであった。各変異を生成するために、変異原性プライマー並びに順方向及び逆方向プライマーを用い、所望の変異を含有しているPCR断片を増幅させることでGG36変異体全体を増幅させた。各PCR増幅反応物には、30pmolの各変異原性プライマー及び100ngのDNAテンプレート、pHPLT-GG36プラスミドを含有させた。増幅はVent DNAポリメラーゼ (NEB)を用いて実施した。PCR反応 (20 $\mu$ L)は、まず始めに95 $^{\circ}$ Cで2.5分加熱した後、続いて94 $^{\circ}$ Cで15秒の変性、55 $^{\circ}$ Cで15秒のアニーリング、及び72 $^{\circ}$ Cで1分の伸長を30サイクル行った。増幅させた後、各変異体につき2~4種のPCR断片をQIAGEN (登録商標) ゲルバンド精製用キットを用いゲル精製し、混合した (各断片につき50ng)。これらの混合物は、完全長の遺伝子フラグメントを生成するための伸長PCR用のDNAテンプレートとして用いた。伸長工程を72 $^{\circ}$ Cで2分にわたって実施したことを除き、PCR条件は上記の条件と同様のものであった。完全長のDNAフラグメントをQIAGEN (登録商標) ゲルバンド精製用キットを用いてゲル精製し、制限酵素BamHI及びHindIIIを用いて消化し、同様の制限酵素で消化したpHPLT-GG36とライゲーションした。Illustra TempliPhiキットでローリング・サークル型増幅法を用い、1マイクロリットルのライゲーション混合物を製造元 (GE Healthcare)からの取扱説明書に従って増幅させることで、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)に形質転換させるための多量体DNAを生成した。ローリング・サークル型増幅産物を100倍希釈し、*B. subtilis*細胞の形質転換に用いた (遺伝子型: aprE, n

pre, amyE::xyLRPxyLAcomK-phleo)。形質転換混合物のアリコート、1.6%のスキムミルク及び10µg/mLのネオマイシンを含有しているLBプレートに蒔き、37℃で一晩インキュベートした。続いて、プラスミドDNAを抽出するため(QIAprep Spinミニプレップキット、Qiagen)、ハローを生じたコロニーを10µg/mLのネオマイシンを含有している120µLのルリアプロス培地に接種した。抽出したプラスミドを配列決定して、所望の変異が存在しているか確認した。伸長PCRにより生成される変異体は、表4-1に示される。

【0707】

更なる生化学的解析のためにNHJ4セットの変異体タンパク質を発現させるべく、変異体プラスミドを保持している枯草菌(*B. subtilis*)株を、10µg/mLのネオマイシンを添加した150µLのルリアプロス培地を含有しているマイクロタイタープレートに接種した。実施例2に記載のようにタンパク質を発現させるために培養物を増殖させ、培養物を実施例2に記載のようにマイクロタイタープレート(0.22µm、Millipore)で濾過した。得られた濾液を生化学的解析に使用した。様々な洗剤で試験した、タンパク質含量を測定するためのエグリンC阻害アッセイ及びBMI微小標本アッセイを、実施例1に記載されるように実施した。同様に、実施例1に記載のBMIアッセイで記載されるように、性能指数も算出する。表4-1は、これらの多重変異体に関する情報、及びこれらに関し得られる結果を提供する。PI値はGG36に対するものである。以下の表中で、洗剤組成物は、上記表Dに示されるものと対応する。同様に、記載のように、アミノ酸位置はBPN'の番号付けに従って列挙される。

【表51】

表4-1. 16°C下で、洗剤7、8又は9において、GG36と比較して、少なくとも0.2のBMIクリーニング性能指数を有する多重変異体NHJ4		
変異体名	作成方法	変異体(BPN'番号付け)
		GG36
NHJ4-1	伸長PCR	S101G S103A V104I
NHJ4-10	伸長PCR	T22A S101A Y209E
NHJ4-11	伸長PCR	S103G L111V G159E
NHJ4-12	伸長PCR	T22A S103G G159E
NHJ4-13	QCMS	T22A L111V G159E
NHJ4-14	QCMS	T22A S128N E271F Y209E
NHJ4-15	QCMS	T22A S103G L111V
NHJ4-16	QCMS	N62E L111V S128N
NHJ4-17	QCMS	T22A L111V S128N
NHJ4-18	伸長PCR	T22A N62E L111V
NHJ4-19	QCMS	S101A S103G V104L S188D
NHJ4-2	伸長PCR	S101G S103A V104I G159D
NHJ4-20	伸長PCR	S101A S103G V104L S128N
NHJ4-24	QCMS	T22A S101A G159E
NHJ4-3	伸長PCR	S101A S103G V104L
NHJ4-4	伸長PCR	S101A S103G V104L G159E
NHJ4-5	伸長PCR	T22A S101A S103G V104L
NHJ4-6	QCMS	S101A S103G V104L Y209E
NHJ4-7	QCMS	T22A Y209E E271F
NHJ4-8	QCMS	T22A S101A E271F
NHJ4-9	QCMS	S101A Y209E E271F

【0708】

(実施例5)

## GG36 変異体のNHJ3セットの構築及びクリーニング性能

本明細書に記載の変異体のNHJ3セットは、次の変異：S101G, S103A, V104I, G159D, A232V, Q236H, Q245R, N248D, 及びN252K (BPN'番号付け)、を含有しているGG36の変異体 (GG36-9として参照) に基づく。これらの変異は、DNAテンプレートとしてpRA68プラスミド (図7を参照) を使用し、QUIKCHANGE (登録商標) Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis (QCLDSキット、Stratagene) を用いることで生成した。プラスミドpRA68は、pBN3ベクター (Babe et al., Biotech. Appl. Biochem. 27: 117~124 [1998] を参照) から誘導した。

【0709】

GG36-9変異体のDNA配列 (シグナル配列は小文字で示され、プロペプチドは下線の引かれている小文字で示され、及びGG36-9成熟配列は大文字で示される) は以下に提供されるものである：

【配列表5】

【0710】

Gtgagaagcaaaaattgtggatcgtcgcgtcgaccgcactactcatttctgttgccttttagtcatcgcgcgcgcgctgctgaagaagcaaaagaaaa  
 atatttaattggctttaatgagcaggaagctgtcagtgagttgtagaacaagtagaggcaaatgacgaggtcgccattctctctgaggaagaggaagtcg  
 aaattgaattgcttcatgaattgaaacgattcctgtttatccgttgagtaagcccagaagatgtggacgcgcttgaactcgatccagcgatttcttatattga  
 agaggatgcagaagtaacgacaatgGCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGCCGTGTGCAAGCCCCGGCT  
 GCCCATAACCGTGGATTGACAGGTTCTGGTGTAAAAGTTGCTGTCCTCGATACAGGTATTTTC  
 CACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTTGTACCAGGGGAACCATCCACTC  
 AAGATGGGAATGGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGACGATTGCTGCTCTAAACAATTCGAT  
 TGGCGTACTTGGCGTAGCGCCGAGCGCGGAACATAACGCTGTTAAAGTATTAGGGGCGAGC  
 GGTGGGGGCGCCATCAGCTCGATTGCCCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATGGCATGC  
 ACGTTGCTAATTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCAAGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAAT  
 AGCGCGACTTCTAGGGGCGTTCTTGTGTAGCGGCATCTGAAAATTCGGGTGCAGACTCAAT  
 CAGCTATCCGGCCCCGTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGACCAAAAACAACAAC  
 CGCGCCAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGGCTTGACATCGTCGCCACCAGGTGTAAACGTGCA  
 GAGCACATAACCAGGTTCAACGTATGCCAGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATG  
 TTGCAGGTGCAGCAGTCCTTGTAAACATAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTACGAATCCGC  
 GATCATCTAAAGAAAACGGCAACGAGCTTAGGAAGCACGAACTTGTATGGAAGCGGACTTG  
 TCAATGCCGAAGCTGCAACTCGTTAA (配列番号762)

GG36-9変異体のタンパク質配列 (シグナル配列は小文字で示され、プロペプチドは下線の引かれている小文字で示され、及びGG36-9成熟型プロテアーゼ配列は大文字で示される) は以下に提供されるものである：

【配列表6】

【0711】

vrskklwivastallisvafssiasaaeeakekyligfneqevavsefveqveandevailseeveieillhefetipvlsvlspedvdaleldpaisy  
 ieedaevttmAQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPSTQD  
 GNGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGGGAISSIAQGLEWAGNNGMHVAN  
 LSLGSPSPSATLEQAVNSATSRGVLVVAASGNSGADSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFSQ  
 YGAGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAVLVKHKNPSWSNVIRRDHLKKA  
 TSLGSTNLYGSGLVNAEAATR (配列番号763)

10

20

30

40

50

QCLSDキットを用いてNHJ3変異体を生成するために、製造元のプロトコルに従い、各変異体用に変異原性プライマーを設計した。各変異体のための変異誘発反応物は次のもの、0.5 μLの10X緩衝液、0.5 μLのpRA68プラスミドDNA(168 ng/μL)、0.5 μLの順方向変異原性プライマー(25 μM)、0.5 μLの逆方向変異原性プライマー(25 μM)、1 μLのdNTP(QCLSDキットに供給)、1.5 μLのQuik溶液(QCLMSキットに供給)、1 μLの酵素ブレンド(QCLSDキットに供給)、及び40 μLの滅菌脱イオン水からなっており、製造元の取扱説明書の通りに反応容量50 μLになるよう作製した。サイクルプログラムは次の通りであった：95 で2分を1サイクル、95 で20秒、60 で10秒及び68 で3分22秒を18サイクル、並びに68 で5分間の最終サイクルであった。次に、キットに供給されている1 μLのDpnI制限酵素を使用して反応物中のプラスミドDNAを消化し、次に2 μLの反応物を使用して上位10位の大腸菌(*E. coli*)コンピテント細胞(*In Vitro*)を形質転換した。37 で一晩増殖させた後、50 μg/mL(ppm)カルベニシリンを含有しているルリアブロス培地プレート上で大腸菌(*E. coli*)形質転換体を選択した。QIAprep spinミニプレップキット(Qiagen)を用い、50 μg/mL(ppm)カルベニシリンを含有しているLA培地で増殖させた4~8個の大腸菌(*E. coli*)コロニーからプラスミドDNAを抽出した。プラスミドを配列決定して、所望の変異が存在しているか確認した。次いで実施例2に記載のように枯草菌(*B. subtilis*)細胞を変異体プラスミドで形質転換した。エグリンC阻害アッセイ(実施例1)及びBMI微小標本クリーニングアッセイ(実施例1)を用いタンパク質含量を決定するなどといった、更なる生化学的解析を行うため、実施例2に記載のように枯草菌(*B. subtilis*)変異体株を増殖させた。結果を下表5-1及び5-2に提供する。PIはGG36と比較した値である。以下の表中で、洗剤組成物は、上記表Dに示されるものと対応する。同様に、記載のように、アミノ酸位置はBPN'の番号付けに従って列挙される。

【表52】

表5-1. 16°Cでの洗剤7、8又は9の、GG36と比較して少なくとも1.1のBMIクリーニング性能指数を有するNHJ3多重変異体	
変異体	配列GG36と比較した変異体配列(BPN'番号付けを使用)
	GG36
NHJ3-1	S103A-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-2	S101G-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-3	S101G-S103A-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-4	S101G-S103A-V104L-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-5	S101G-S103A-V104L-G159D-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-6	S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-7	S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-N248D-N252K
NHJ3-8	S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N252K
NHJ3-9	S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D

【表 5 3】

表5-2. 16°Cでの洗剤10又は11の、GG36と比較して少なくとも0.3の BMIクリーニング性能指数を有するNHJ3多重変異体	
変異体	配列GG36と比較した変異体配列(BPN'番号付けを使用)
GG36	
NHJ3-1	S103A-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-2	S101G-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-3	S101G-S103A-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-4	S101G-S103A-V104L-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-5	S101G-S103A-V104L-G159D-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-6	S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-7	S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-N248D-N252K
NHJ3-8	S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N252K
NHJ3-9	S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D

10

## 【0712】

(実施例6)

GG36変異体のNHJ5セットの構築及びクリーニング性能

本明細書に記載の変異体のNHJ5セットは、次の変異：S101G, S103A, V104I, G159D, A232V, Q245R, N248D, 及び(BPN'番号付け)、を含有しているGG36の変異体(GG36-7として参照)に基づく。pRA96プラスミド(図8を参照)をDNAテンプレートとして使用し、部位特異的な変異導入キットQUIKCHANGE(登録商標)Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit(QCLMSキット)を用いることで、これらの変異を生成した。組み込まれた変異としては、H243R(H249R)、E265F(E271F)、D157E(D159E)、A156E(A158E)、A156E-D157G(A158E-D159E)、T22A, N60E(N62E)、N232R(N238R)、D242R(D248R)、T247R(T253R)、S24R, N74D(N76D)が挙げられ、GG36番号付け及びBPN'番号付けを括弧付して示す。

20

30

## 【0713】

変異体は実施例5に記載の方法を用いて生成された。エグリンc阻害アッセイ(実施例1)及びBMI微小標本クリーニングアッセイ(実施例1)を用いたタンパク質含量を決定するなどといった、更なる生化学的解析を行うため、実施例2に記載のように枯草菌(B. subtilis)変異体株を増殖させた。結果を下表6-1に提供する。PI値はGG36に対するものである。以下の表中で、洗剤組成物は、上記表Dに示されるものと対応する。同様に、記載のように、アミノ酸位置はBPN'の番号付けに従って列挙される。

## 【0714】

GG36-7変異体のDNA配列(シグナル配列は小文字で示され、プロペプチドは下線の引かれている小文字で示され、及びGG36-7成熟配列は大文字で示される)は以下に提供されるものである：

40

## 【配列表7】

## 【0715】

gtgagaagcaaaaattgtggtcgtcgctgaccgactactatttctgttcttttagttcatcgcgcgcgcgctgctgaagaagcaaaagaaaaa  
tatttaattgctttaatgagcaggaagctgtcagtgagttttagaacaagtagaggcaaatgacgaggtcgccattctcttgaggaaagagggaagtcga  
aattgaattgcttcatgaatttgaacgattcctgttttaccgttgaagtaagccagaagatgtgacgcgcttgaactcgcaccagcatttcttatattgaa  
gaggatgcagaagtaacgacaatgGCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGCCGTGTGCAAGCCCCGGCTG  
 CCCATAACCGTGGATTGACAGGTTCTGGTGTAAAAGTTGCTGTCTCGATACAGGTATTTCC  
 ACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTTGTACCAGGGGAACCATCCACTCA  
 AGATGGGAATGGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGACGATTGCTGCTCTAAACAATTCGATT  
 GGCGTACTTGGCGTAGCGCCGAGCGCGGAACCTATACGCTGTAAAGTATTAGGGGCGAGCG  
 GTGGGGGGCGCCATCAGCTCGATTGCCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCA  
 CGTTGCTAATTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCAAGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATA  
 GCGCGACTTCTAGGGGCGTTCTTGTGTAGCGGCATCTGGAAATTCGGGTGCAGACTCAATC  
 AGCTATCCGGCCCGTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGACCAAAAACAACAACC  
 GCGCCAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGGCTTGACATCGTCGCACCAGGTGTAAACGTGCA  
 GAGCACATAACCCAGGTTCAACGTATGCCAGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATG  
 TTGCAGGTGCAGCAGTCCTTGTAAACAAAAGAACCATCTTGGTCCAATGTACGAATCCGC  
 GATCATCTAAAGAATACGGCAACGAGCTTAGGAAGCACGAACTTGTATGGAAGCGGACTTG  
 TCAATGCCGAAGCTGCAACTCGT (配列番号764)

10

20

GG36-7変異体のタンパク質配列（シグナル配列は小文字で示され、プロペプチドは下線の引かれている小文字で示され、及びGG36-7成熟配列は大文字で示される）は以下に提供されるものである：

【配列表8】

【0716】

vrskklwivastallisvafsssiasaaeeeakekyligfneqavsefveqveandevailseeeveieillhefetipvlsvlspedvdaleldpaisy  
ieedaevttmAQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPSTQD  
 GNGHGHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGGGAISSIAQGLEWAGNNGMHVAN  
 LSLGSPSPSATLEQAVNSATSRGVLVVAASGNSGADSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFSQ  
 YGAGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAVLVKQKNPSWSNVRIRDHLKNTA  
 TSLGSTNLYGSGLVNAEAATR (配列番号765)

30



【表 5 4】

表6-1:16°Cでの洗剤7~11の、GG36と比較して少なくとも0.6の BMIクリーニング性能指数を有するNHJ5多重変異体	
変異体	配列GG36と比較した変異体配列(BPN'番号付けを使用)
	GG36
GG36-7	S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D
NHJ5-1	S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F
NHJ5-2	S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N238R
NHJ5-3	S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N248R
NHJ5-4	S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-T253R
NHJ5-5	S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-S24R
NHJ5-6	S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N76D
NHJ5-7	S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R
NHJ5-8	S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-E271F
NHJ5-9	S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R
NHJ5-10	S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-E271F
NHJ5-11	T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R
NHJ5-12	T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F
NHJ5-13	N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R
NHJ5-14	N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F

10

20

## 【0717】

(実施例7)

NHJ2コンビナトリアルライブラリの構築

本実施例は、次の変異：A16S, T22A, S101A, S103G, V104L, L111V, S128N, 及びL148I (BPN'番号付け)のうちの1つ以上を伴うGG36コンビナトリアルライブラリの構築を記述する。NHJ2コンビナトリアルライブラリの作成のため、pHPLT-GG36枯草菌(*B. subtilis*)発現プラスミドをDNA 2.0 Inc. に提供した。枯草菌(*B. subtilis*)株(遺伝子型: aprE, nprE, amyE: : xy1RPxy1AcomK-phleo)で形質転換するために、構築済みのNHJ2ライブラリのライゲーション反応物が、DNA 2.0, Inc. から提供された。これらの変異を1つ以上含有するよう生成された変異体を、本明細書に記載の方法及び洗剤組成物を用い、冷水クリーニング適用について試験する。

30

## 【0718】

(実施例8)

更なるライブラリ及びGG36変異体の構築

次の組の変異：A1R, A230E, E271L, G115R, G20R, H249R, K235F, K27V/F/L, L75E, L82R, N18R, N269R, N43D, N43R, N76D, R45T, S212F, S242R, S24R, S78R, S9A, T22R, V121E, V244R, V28E, V30E, V4R, W241R (BPN'番号付け)を用いて、更なるライブラリ及び変異体を構築する。これらの変異を1つ以上含有するよう生成された変異体を、本明細書に記載の方法及び洗剤組成物を用い、冷水クリーニング適用について試験する。

40

## 【0719】

次のもの：G20R-N43R-H249R, G20R-T22R-N43R, G20R-N43R-S242R, G20R-N43R-E271L, G20R-N43R-V244R, G20R-S24R-N43R-S242R, S9A-T22R-S78R-S212F-W241R, S9A-G20R-N43R-S212F, S9A-N43R-S212F, G20R-N43R-S212F, G20R-T22R-N43R-S2

50

1 2 F , S 2 4 R - S 7 8 R - S 2 1 2 F , S 9 A - N 4 3 R - S 7 8 R , S 9 A - N 4 3 R - S 7 8 R - S 2 4 2 R , S 9 A - G 2 0 R - N 4 3 R - S 7 8 R , G 2 0 R - S 2 4 R - N 4 3 R - S 7 8 R - S 2 4 2 R , T 2 2 R - S 2 4 R - S 7 8 R - S 2 1 2 F , S 9 A - G 2 0 R - N 4 3 R - S 7 8 R - S 2 4 2 R , G 2 0 R - N 4 3 R - S 7 8 R - H 2 4 9 R , G 2 0 R - N 4 3 R - S 7 8 R , S 9 A - S 7 8 R - S 2 1 2 F , S 9 A - T 2 2 R - N 4 3 R - S 7 8 R , S 9 A - G 2 0 R - S 2 4 R - N 4 3 R , S 9 A - T 2 2 R - S 7 8 R - S 2 1 2 F , V 4 R - S 9 A - T 2 2 R - S 7 8 R - S 2 1 2 F , G 2 0 R - S 2 4 R - N 4 3 R , A 1 R - S 9 A - N 4 3 R , G 2 0 R - S 2 4 R - N 4 3 R - G 1 1 5 R , S 9 A - S 2 4 R - N 4 3 R , G 2 0 R - T 2 2 R - S 2 4 R - N 4 3 R , A 1 R - S 2 4 R - N 4 3 R , S 9 A - G 2 0 R - S 2 4 R - N 4 3 R - S 2 4 2 R , S 9 A - G 2 0 R - T 2 2 R - S 7 8 R - S 2 1 2 F , S 9 A - S 2 4 R - N 4 3 R - V 2 4 4 R , S 9 A - S 2 4 R - N 4 3 R - S 2 4 2 R , V 4 R - S 9 A - T 2 2 R - S 2 4 R - S 2 1 2 F , 及び T 2 2 R - S 2 4 R - N 4 3 R ( B P N ' 番号付け ) が挙げられる、G G 3 6 変異体の更なる組を構築し、本明細書に記載の方法及び洗剤組成物を用い、冷水クリーニング適用について試験する。

10

## 【 0 7 2 0 】

( 実施例 9 )

G G 3 6 ライブラリ W C E 2 の構築及びクリーニング性能

W C E 2 コンピナトリアルライブラリは、p H P L T - G G 3 6 枯草菌 ( *B. subtilis* ) 発現プラスミドを用い、DNA 2 . 0 , I n c . により生成されたものである。枯草菌 ( *B. subtilis* ) 株 ( 遺伝子型 : a p r E , n p r E , a m y E : : x y 1 R P x y 1 A c o m K - p h l e o ) で形質転換するために、構築済み W C E 2 ライブラリのライゲーション反応物が、DNA 2 . 0 , I n c . から提供された。W C E 2 ライブラリを生成するために使用される変異の組は、A 2 3 0 E , G 2 0 R , H 2 4 9 R , N 1 8 R , N 4 3 R / D , N 7 6 D , R 4 5 T , S 2 4 2 R , 及び S 2 4 R ( B P N ' 番号付け ) である。これらの変異を 1 つ以上含有するよう生成された変異体を、本明細書に記載の方法及び洗剤組成物を用い、冷水クリーニング適用について試験する。

20

## 【 0 7 2 1 】

( 実施例 1 0 )

G G 3 6 変異体の W C E 3 セットの構築及びクリーニング性能

本実施例は、G G 3 6 変異体、G G 3 6 - 7 ( 実施例 5 ) 及び G G 3 6 - 9 ( 実施例 4 ) に基づく変異の W C E 3 セットを記述する。これらの変異は、S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I - A 2 3 2 V - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 4 5 R , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I - G 1 5 9 R - A 2 3 2 V - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 D , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I - G 1 5 9 D - A 2 3 2 V - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 R , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I - A 2 3 2 V - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 R , S 1 0 1 G - S 1 0 3 A - V 1 0 4 I - G 1 5 9 R - A 2 3 2 V - Q 2 4 5 R - N 2 4 8 R , 並びに、S 1 0 1 G , S 1 0 3 A , V 1 0 4 I , A 2 3 2 V , Q 2 3 6 H , Q 2 4 5 R , 及び N 2 5 2 K である。p R A 9 6 プラスミドを実施例 5 に記載の DNA テンプレートとして使用し、QuikChange ( 登録商標 ) L i g h t n i n g M u l t i S i t e - D i r e c t e d M u t a g e n e s i s K i t ( Q C L M S キット、S t r a t a g e n e ) を用いて、これらを生成した。生成した変異体は、本案件に記載の方法及び洗剤組成物を用い、冷水クリーニング適用について試験する。

30

40

## 【 0 7 2 2 】

( 実施例 1 1 )

G G 3 6 の更なるライブラリ及び変異体の構築

本実施例は、枯草菌 ( *B. subtilis* ) 発現プラスミド ( 例えば、p H P L T - G G 3 6 、図 6 ) を用い、次の変異 : A 1 6 S , T 2 2 A , S 2 4 R , N 6 2 E , N 7 6 D , E 8

50

9 P , S 1 0 1 A / G 、 S 1 0 3 G / A 、 V 1 0 4 L / I 、 L 1 1 1 V , S 1 2 8 N , P 1 2 9 E , A 2 3 2 V , L 1 4 8 I , A 1 5 8 E , G 1 5 9 D / E 、 S 1 6 6 D , R 1 8 6 H , S 1 8 8 D , Y 2 0 9 E , Q 2 3 6 H , N 2 3 8 R , Q 2 4 5 R , N 2 4 8 D / R 、 H 2 4 9 R , N 2 5 2 K / R 、 T 2 5 3 R , E 2 7 1 F ( B P N ' 番号付け ) の 1 つ以上を使用して G G 3 6 変異体及びライブラリを構築することを記述する。これらの変異を 1 つ以上含有するよう生成された変異体を、本明細書に記載の方法及び洗剤組成物を用い、冷水クリーニング適用について試験する。

【 0 7 2 3 】

( 実施例 1 2 )

G G 3 6 の更なるライブラリ及び変異体の構築

本実施例は、次の変異：A 1 R , Q 2 S , Q 2 M , Q 2 A , Q 2 R , Q 2 W , S 3 R , V 4 R , V 4 S , V 4 C , I 8 A , S 9 A , S 9 F , S 9 W , R 1 0 S , R 1 0 A , R 1 0 H , R 1 0 M , Q 1 2 F , Q 1 2 R , P 1 4 K , P 1 4 F , P 1 4 Q , A 1 5 R , A 1 5 F , A 1 6 S , H 1 7 R , H 1 7 M , H 1 7 F , N 1 8 R , N 1 8 K , G 2 0 F , G 2 0 K , G 2 0 R , T 2 2 A , T 2 2 R , T 2 2 Y , T 2 2 V , T 2 2 Q , T 2 2 L , T 2 2 W , G 2 3 A , G 2 3 S , G 2 3 F , S 2 4 R , S 2 4 F , S 2 4 W , S 2 4 Q , S 2 4 H , S 2 4 L , G 2 5 V , G 2 5 F , G 2 5 R , V 2 6 F , K 2 7 L , K 2 7 F , K 2 7 R , K 2 7 V , V 2 8 A , V 2 8 N , V 2 8 E , A 2 9 T , V 3 0 E , L 3 1 F , T 3 3 S , T 3 3 G , T 3 3 D , G 3 4 P , I 3 5 M , S 3 6 T , S 3 6 F , S 3 6 R , T 3 8 L , T 3 8 F , T 3 8 R , P 4 0 N , P 4 0 L , P 4 0 T , P 4 0 W , P 4 0 H , P 4 0 R , L 4 2 I , N 4 3 A , N 4 3 F , N 4 3 I , N 4 3 S , N 4 3 R , N 4 3 M , N 4 3 W , N 4 3 D , R 4 5 T , G 4 6 R , A 4 8 R , F 5 0 C , V 5 1 W , V 5 1 F , V 5 1 H , P 5 2 F , P 5 2 E , P 5 2 N , P 5 5 Y , T 5 7 R , Q 5 9 A , Q 5 9 F , Q 5 9 R , D 6 0 P , D 6 0 Q , D 6 0 A , N 6 2 E , N 6 2 Q , G 6 3 V , G 6 3 M , G 6 3 T , G 6 3 I , G 6 3 A , G 6 3 S , G 6 3 H , G 6 3 Q , G 6 3 D , G 6 3 E , G 6 3 P , H 6 4 F , H 6 4 T , V 6 8 A , V 6 8 C , A 6 9 N , A 6 9 T , A 6 9 P , A 6 9 W , T 7 1 G , I 7 2 C , A 7 4 C , L 7 5 A , L 7 5 F , L 7 5 E , L 7 5 R , N 7 6 D , S 7 8 R , S 7 8 N , S 7 8 I , I 7 9 W , I 7 9 Q , V 8 1 R , L 8 2 F , L 8 2 T , L 8 2 V , L 8 2 R , L 8 2 M , A 8 5 M , P 8 6 W , P 8 6 L , P 8 6 I , E 8 9 P , E 8 9 T , E 8 9 G , E 8 9 H , E 8 9 L , E 8 9 V , E 8 9 W , E 8 9 F , E 8 9 I , Y 9 1 N , Y 9 1 F , A 9 2 F , K 9 4 N , S 9 9 F , S 9 9 T , S 9 9 P , S 9 9 G , S 9 9 M , G 1 0 0 S , G 1 0 0 N , G 1 0 0 Q , G 1 0 0 I , S 1 0 1 A , S 1 0 1 N , S 1 0 1 G , S 1 0 1 T , S 1 0 1 D , S 1 0 1 E , S 1 0 1 P , S 1 0 1 F , G 1 0 2 A , G 1 0 2 T , G 1 0 2 N , G 1 0 2 H , G 1 0 2 E , S 1 0 3 G , S 1 0 3 N , S 1 0 3 D , S 1 0 3 A , V 1 0 4 L , V 1 0 4 I , V 1 0 4 E , V 1 0 4 D , S 1 0 5 T , S 1 0 5 E , S 1 0 5 Q , S 1 0 6 G , S 1 0 6 T , S 1 0 6 E , S 1 0 6 D , S 1 0 6 A , S 1 0 6 V , S 1 0 6 F , I 1 0 7 M , I 1 0 7 F , A 1 0 8 I , A 1 0 8 G , Q 1 0 9 M , L 1 1 1 V , L 1 1 1 I , E 1 1 2 V , E 1 1 2 L , E 1 1 2 Q , A 1 1 4 G , G 1 1 5 K , G 1 1 5 R , N 1 1 6 K , N 1 1 6 A , N 1 1 6 L , N 1 1 7 F , G 1 1 8 R , G 1 1 8 I , M 1 1 9 C , H 1 2 0 A , H 1 2 0 F , H 1 2 0 R , V 1 2 1 F , V 1 2 1 E , N 1 2 3 G , N 1 2 3 E , L 1 2 4 S , S 1 2 8 D , S 1 2 8 F , S 1 2 8 L , S 1 2 8 N , S 1 2 8 H , S 1 2 8 M , S 1 2 8 I , S 1 2 8 Q , P 1 2 9 E , S 1 3 2 A , S 1 3 2 E , A 1 3 8 G , S 1 4 4 R , V 1 4 7 L , L 1 4 8 I , A 1 5 8 E , G 1 5 9 D , G 1 5 9 E , G 1 5 9 C , S 1 6 0 D , S 1 6 6 D , S 1 6 6 E , Y 1 6 7 W , M 1 7 5 V , V 1 7 7 C , D 1 8 1 A , Q 1 8 2 R , N 1 8 3 I , N 1 8 3 D , N 1 8 3 M , N 1 8 3 F , N 1 8 3 R , N 1 8 5 E , N 1 8 5 V , N 1 8 5 I , R 1 8 6 H , R 1 8 6 K , S 1 8 8 E , S 1 8 8 D , S 1 8 8 R , Y 1 9 2 H , Y 1 9 2 W , A 1 9 4 E , A 1 9 4 V , A 1 9 4 F , D 1 9 7 F , I 1 9 8 L , I 1 9 8 F , V 2 0 3 E , V 2 0 3 C , T 2 0 8 S , Y 2 0 9 S , Y 2 0 9 N , Y 2 0 9 F , Y 2 0 9 T , Y 2 0 9 E , Y 2 0 9 H , Y 2 0 9 G , Y 2 0 9 L , P 2 1 0 R , P 2 1 0 V , P 2 1 0 L , G 2

10

20

30

40

50

1 1 Q , G 2 1 1 R , S 2 1 2 I , S 2 1 2 M , S 2 1 2 F , T 2 1 3 A , Y 2 1 4 F ,  
 A 2 1 5 N , A 2 1 5 D , A 2 1 5 E , A 2 1 5 H , A 2 1 5 F , S 2 1 6 F , S 2 1 6  
 A , L 2 1 7 E , L 2 1 7 N , L 2 1 7 D , N 2 1 8 D , N 2 1 8 P , N 2 1 8 E , T 2  
 2 4 A , T 2 2 4 G , V 2 2 7 I , A 2 3 0 E , A 2 3 1 I , A 2 3 1 C , A 2 3 2 V ,  
 L 2 3 3 C , V 2 3 4 F , K 2 3 5 F , Q 2 3 6 F , Q 2 3 6 N , Q 2 3 6 H , N 2 3 8  
 R , N 2 3 8 K , N 2 3 8 L , P 2 3 9 K , P 2 3 9 G , P 2 3 9 R , P 2 3 9 H , P 2  
 3 9 T , P 2 3 9 N , P 2 3 9 S , P 2 3 9 F , S 2 4 0 R , W 2 4 1 R , S 2 4 2 L ,  
 S 2 4 2 R , N 2 4 3 F , N 2 4 3 R , V 2 4 4 R , Q 2 4 5 R , I 2 4 6 S , N 2 4 8  
 D , N 2 4 8 V , N 2 4 8 I , N 2 4 8 R , H 2 4 9 R , H 2 4 9 T , L 2 5 0 I , K 2  
 5 1 R , K 2 5 1 S , N 2 5 2 I , N 2 5 2 F , N 2 5 2 R , N 2 5 2 K , N 2 5 2 H , 10  
 T 2 5 3 I , T 2 5 3 R , T 2 5 3 F , A 2 5 4 C , S 2 5 6 N , G 2 5 8 R , T 2 6 0  
 V , T 2 6 0 I , L 2 6 2 D , L 2 6 2 H , Y 2 6 3 F , S 2 6 5 F , L 2 6 7 V , L 2  
 6 7 N , L 2 6 7 M , N 2 6 9 I , N 2 6 9 R , A 2 7 0 C , E 2 7 1 I , E 2 7 1 V ,  
 E 2 7 1 H , E 2 7 1 M , E 2 7 1 L , E 2 7 1 P , E 2 7 1 A , E 2 7 1 F , E 2 7 1  
 T , A 2 7 2 F , A 2 7 2 F , A 2 7 2 R , A 2 7 3 F , A 2 7 3 I , 及び T 2 7 4 G (  
 B P N ' 番号付け) の 1 つ以上を使用して枯草菌 (*B. subtilis*) の G G 3 6 変異体及び  
 ライブラリを構築することを記述する。これらの変異を 1 つ以上含有するよう生成された  
 変異体を、本明細書に記載の方法及び洗剤組成物を用い、冷水クリーニング適用について  
 試験する。

#### 【 0 7 2 4 】

( 実施例 1 3 )

##### 自動食器洗浄性能試験

本実施例では、一部の市販の食器洗剤を用いてプロテアーゼの洗浄性能を判定するため  
 に使用される方法を説明する。これらのプロテアーゼ変異体を様々な条件下で試験する。  
 これらの洗剤は W F K から市販されており、以下に提供される名称により呼ぶ。シミのタ  
 イプの各々についてのプロトコル ( 挽肉、卵黄及びミルクと一緒に卵黄 ) は下記に提供さ  
 れる。それぞれのタイプの汚れを試験食器に塗布する前に、食器は十分に洗浄しなければ  
 ならない。前回の試験から特定のこびりついたシミの残渣が依然として食器上に存在する  
 場合があることから、この洗浄は特に必要である。新しい食器も、試験での第一回目に使  
 用される前に三回十分な洗浄にかけられた。

#### 【 0 7 2 5 】

洗浄試験は、典型的には、上記のように汚れた食器及びステンレス鋼シートを装填した  
 自動食器洗浄機 ( 例えば、Miele : G 6 9 0 S C ) で行われる。以下の結果の表に示  
 すように、規定の量の洗剤を使用する。一部の試験では、試験される温度は、45、5  
 5 及び 6 5 である。一部の試験では、水硬度は、9 ° 又は 2 1 ° G H ( ドイツ硬度 )  
 ( 3 7 4 p p m C a ) である。

#### 【 0 7 2 6 】

上記のように、挽肉又はパスタ / ソース / 肉 / チーズで汚したプレートは、洗浄後、0  
 ~ 1 0 の写真評価尺度を用いて目視により査定され、ここで、「0」は完全に汚いプレ  
 ートを指し、「10」はきれいなプレートを指す。これらの結果は、酵素含有洗剤のシミ又  
 は汚れ除去 ( S R ) 能力に対応する。

#### 【 0 7 2 7 】

洗浄した、卵黄及び / 又は卵黄ミルクで汚れたステンレス鋼プレートは、重力測定的に  
 分析し、洗浄後の残渣の量を判定する。

#### 【 0 7 2 8 】

一部の代表的洗剤を以下に提供する。

【表 5 5】

リン酸塩を含まない洗剤、IEC-60436 WFK Type B(3g/LでpH=10.4)	
構成成分	重量%
クエン酸ナトリウム二水和物	30.0
マレイン酸／アクリル酸コポリマーナトリウム塩(SOKALAN(登録商標)CP5、BASF)	12.0
過ホウ酸ナトリウム一水和物	5.0
TAED	2.0
ニケイ酸ナトリウム:Protil A(Cognis)	25.0
直鎖脂肪族アルコールエトキシレート	2.0
炭酸ナトリウム無水物	100%まで加えた

10

【表 5 6】

リン酸塩含有洗剤:IEC-60436 WFK Type C(3g/LでpH=10.5)	
構成成分	重量%
トリポリリン酸ナトリウム	23.0
クエン酸ナトリウム二水和物	22.3
マレイン酸／アクリル酸コポリマーナトリウム塩	4.0
過ホウ酸ナトリウム一水和物	6.0
TAED	2.0
ニケイ酸ナトリウム:Protil A(Cognis)	5.0
直鎖脂肪族アルコールエトキシレート	2.0
炭酸ナトリウム無水物	100%まで加えた

20

【0729】

(実施例14)

顆粒及び／又はタブレット洗濯組成物

この実施例は、顆粒及び／又はタブレット洗濯洗剤のための様々な配合物を提供する。顆粒又はタブレットの形態であり得る以下の本発明の洗濯組成物が下記に提供される。これらの配合物のそれぞれにおいて、本明細書で提供される少なくとも1つのプロテアーゼ変異体は、約0.0001～約10重量%の濃度で含まれる。一部の代替的な態様では、必要性に応じ、配合者により決定されるものとして、他の濃度での使用も見出される。

30

【表 5 7】

表14-1: 顆粒及び/又はタブレット洗濯組成物					
化合物	配合物				
	I	II	III	IV	V
ベース製品					
C <sub>14</sub> ~C <sub>15</sub> AS又はTAS	8.0	5.0	3.0	3.0	3.0
LAS	8.0	—	8.0	—	7.0
C <sub>12</sub> ~C <sub>15</sub> AE <sub>3</sub> S	0.5	2.0	1.0	—	—
C <sub>12</sub> ~C <sub>15</sub> E <sub>5</sub> 又はE <sub>3</sub>	2.0	—	5.0	2.0	2.0
QAS	—	—	—	1.0	1.0
ゼオライトA	20.0	18.0	11.0	—	10.0
SKS-6(乾燥添加)	—	—	9.0	—	—
MA/AA	2.0	2.0	2.0	—	—
AA	—	—	—	—	4.0
クエン酸三ナトリウム・2H <sub>2</sub> O	—	2.0	—	—	—
クエン酸(無水物)	2.0	—	1.5	2.0	—
DTPA	0.2	0.2	—	—	—
EDDS	—	—	0.5	0.1	—
HEDP	—	—	0.2	0.1	—
PB1	3.0	4.8	—	—	4.0
過炭酸塩	—	—	3.8	5.2	—
NOBS	1.9	—	—	—	—
NACA OBS	—	—	2.0	—	—
TAED	0.5	2.0	2.0	5.0	1.00
BB1	0.06	—	0.34	—	0.14
BB2	—	0.14	—	0.20	—
無水炭酸ナトリウム	15.0	18.0	—	15.0	15.0
硫酸塩	5.0	12.0	5.0	17.0	3.0
ケイ酸塩	—	1.0	—	—	8.0
nprE(任意)	0.03	—	0.1	0.06	—
PMN	—	0.05	—	—	0.1
プロテアーゼB(任意)	—	0.01	—	—	—
プロテアーゼC(任意)	—	—	—	0.01	—
リパーゼ	—	0.008	—	—	—
アミラーゼ	0.001	—	—	—	0.001
セルラーゼ	—	0.0014	—	—	—
ペクチンリナーゼ	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
アルドースオキシダーゼ	0.03	—	0.05	—	—
PAAC	—	0.01	—	—	0.05
100%までの残部水分及び/又は微量成分*					

【0730】

\* 香料、染料、増白剤 / SRP1 / カルボキシメチルセルロースナトリウム / 光漂白剤 / MgSO<sub>4</sub> / PVPVI / 抑泡剤 / 高分子量PEG / 粘土。

【0731】

(実施例15)

タブレット洗剤組成物

10

20

30

40

50

この実施例は、様々なタブレット洗剤配合物を提供する。以下の本発明のタブレット洗剤組成物は、標準的な12ヘッドロータリープレスを用いて、13 KN/cm<sup>2</sup>の圧力にて顆粒食器洗浄洗剤組成物を圧縮することにより、調製される。これらの配合物のそれぞれにおいて、本明細書で提供される少なくとも1つのプロテアーゼ変異体は、約0.0001~約10重量%の濃度で含まれる。一部の代替的な態様では、必要性に応じ、配合者により決定されるものとして、他の濃度での使用も見出される。

【表58】

化合物	配合物							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
STPP	—	48.8	44.7	38.2	—	42.4	46.1	46.0
クエン酸三ナトリウム・2H <sub>2</sub> O	20.0	—	—	—	35.9	—	—	—
炭酸ナトリウム	20.0	5.0	14.0	15.4	8.0	23.0	20.0	—
ケイ酸塩	15.0	14.8	15.0	12.6	23.4	2.9	4.3	4.2
リパーゼ	0.001	—	0.01	—	0.02	—	—	—
プロテアーゼB(任意)	0.01	—	—	—	—	—	—	—
プロテアーゼC(任意)	—	—	—	—	—	0.01	—	—
nprE(任意)	0.01	0.08	—	0.04	—	0.023	—	0.05
PMN	—	—	0.05	—	0.052	—	0.023	—
アミラーゼ	0.012	0.012	0.012	—	0.015	—	0.017	0.002
ペクチンリナーゼ	0.005	—	—	0.002	—	—	—	—
アルドースオキシダーゼ	—	0.03	—	0.02	0.02	—	0.03	—
PB1	—	—	3.8	—	7.8	—	—	4.5
過炭酸塩	6.0	—	—	6.0	—	5.0	—	—
BB1	0.2	—	0.5	—	0.3	0.2	—	—
BB2	—	0.2	—	0.5	—	—	0.1	0.2
非イオン性	1.5	2.0	2.0	2.2	1.0	4.2	4.0	6.5
PAAC	0.01	0.01	0.02	—	—	—	—	—
DETBCHD	—	—	—	0.02	0.02	—	—	—
TAED	—	—	—	—	—	2.1	—	1.6
HEDP	1.0	—	—	0.9	—	0.4	0.2	—
DETPMP	0.7	—	—	—	—	—	—	—
パラフィン	0.4	0.5	0.5	0.5	—	—	0.5	—
BTA	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	—
ポリカルボキシレート	4.0	—	—	—	4.9	0.6	0.8	—
PEG 400-30,000	—	—	—	—	—	2.0	—	2.0
グリセロール	—	—	—	—	—	0.4	—	0.5
香料	—	—	—	0.05	0.2	0.2	0.2	0.2
100%までの残部水分及び/又は微量成分*								

【0732】

\* 増白剤 / S R P 1 / カルボキシメチルセルロースナトリウム / 光漂白剤 / M g S O<sub>4</sub> / P V P V I / 抑泡剤 / 高分子量 P E G / 粘土。

【0733】

実施例14(I)~14(VII)のpHは約10~約11.5であり、14(VIII)のpHは8~10である。実施例14(I)~14(VIII)のタブレット重量は、約20グラム~約30グラムである。

【0734】

(実施例16)

10

20

30

40

50

## 液体洗濯洗剤組成物

この実施例では、液体洗濯洗剤組成物についての様々な配合物を提供する。本発明の以下の液体洗濯洗剤組成物は、下記に示すように調製される。これらの配合物のそれぞれにおいて、本明細書で提供される少なくとも1つのプロテアーゼ変異体は、約0.0001～約10重量%の濃度で含まれる。一部の代替的な態様では、必要性に応じ、配合者により決定されるものとして、他の濃度での使用も見出される。

【表59】

化合物	配合物				
	I	II	III	IV	V
LAS	24.0	32.0	6.0	3.0	6.0
NaC <sub>16</sub> ~C <sub>17</sub> HSAS	—	—	—	5.0	—
C <sub>12</sub> ~C <sub>15</sub> AE <sub>1.8</sub> S	—	—	8.0	7.0	5.0
C <sub>8</sub> ~C <sub>10</sub> プロピルジメチルアミン	2.0	2.0	2.0	2.0	1.0
C <sub>12</sub> ~C <sub>14</sub> アルキルジメチルアミンオキシド	—	—	—	—	2.0
C <sub>12</sub> ~C <sub>15</sub> AS	—	—	17.0	—	8.0
CFAA	—	5.0	4.0	4.0	3.0
C <sub>12</sub> ~C <sub>14</sub> 脂肪族アルコールエトキシレート	12.0	6.0	1.0	1.0	1.0
C <sub>12</sub> ~C <sub>18</sub> 脂肪酸	3.0	—	4.0	2.0	3.0
クエン酸(無水物)	4.5	5.0	3.0	2.0	1.0
DETPMP	—	—	1.0	1.0	0.5
モノエタノールアミン	5.0	5.0	5.0	5.0	2.0
水酸化ナトリウム	—	—	2.5	1.0	1.5
1N HCl水溶液	#1	#1	—	—	—
プロパンジオール	12.7	14.5	13.1	10.	8.0
エタノール	1.8	2.4	4.7	5.4	1.0
DTPA	0.5	0.4	0.3	0.4	0.5
ペクチンリアーゼ	—	—	—	0.005	—
アミラーゼ	0.001	0.002	—	—	—
セルラーゼ	—	—	0.0002	—	0.0001
リパーゼ	0.1	—	0.1	—	0.1
NprE(任意)	0.05	0.3	—	0.5	0.2
PMN	—	—	0.08	—	—
プロテアーゼA(任意)	—	—	—	—	0.1
アルドースオキシダーゼ	—	—	0.3	—	0.003
ZnCl <sub>2</sub>	0.1	0.05	0.05	0.05	0.02
ギ酸カルシウム	0.05	0.07	0.05	0.06	0.07
DETBCHD	—	—	0.02	0.01	—
SRP1	0.5	0.5	—	0.3	0.3
ホウ酸	—	—	—	—	2.4
キシレンスルホン酸ナトリウム	—	—	3.0	—	—
クメンスルホン酸ナトリウム	—	—	—	0.3	0.5
DC 3225C	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
2-ブチル-オクタノール	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03
増白剤1	0.12	0.10	0.18	0.08	0.10
100%までの残部香料/染料及び/又は水					

10

20

30

40

50



## 【 0 7 3 5 】

# 1 : 1 N の H C l 水溶液を添加して、配合物の正味 p H を約 3 ~ 約 5 の範囲に調整。

## 【 0 7 3 6 】

上記実施例 1 5 ( I ) ~ ( I I ) の p H は約 5 ~ 約 7 であり、1 5 ( I I I ) ~ ( V ) の p H は約 7 . 5 ~ 約 8 . 5 である。

## 【表 6 0】

化合物	配合物					
	I	II	III	IV	V	VI
LAS	11.5	11.5	9.0	—	4.0	—
C <sub>12</sub> ~C <sub>15</sub> AE <sub>2.85</sub> S	—	—	3.0	18.0	—	16.0
C <sub>14</sub> ~C <sub>15</sub> E <sub>2.5</sub> S	11.5	11.5	3.0	—	16.0	—
C <sub>12</sub> ~C <sub>13</sub> E <sub>9</sub>	—	—	3.0	2.0	2.0	1.0
C <sub>12</sub> ~C <sub>13</sub> E <sub>7</sub>	3.2	3.2	—	—	—	—
CFAA	—	—	—	5.0	—	3.0
TPKFA	2.0	2.0	—	2.0	0.5	2.0
クエン酸(無水物)	3.2	3.2	0.5	1.2	2.0	1.2
ギ酸カルシウム	0.1	0.1	0.06	0.1	—	—
ギ酸ナトリウム	0.5	0.5	0.06	0.1	0.05	0.05
ZnCl <sub>2</sub>	0.1	0.05	0.06	0.03	0.05	0.05
クメンシルホン酸ナトリウム (Na Culmene Sulfonate)	4.0	4.0	1.0	3.0	1.2	—
ホウ酸塩	0.6	0.6	1.5	—	—	—
水酸化ナトリウム	6.0	6.0	2.0	3.5	4.0	3.0
エタノール	2.0	2.0	1.0	4.0	4.0	3.0
1, 2-プロパンジオール	3.0	3.0	2.0	8.0	8.0	5.0
モノエタノールアミン	3.0	3.0	1.5	1.0	2.5	1.0
TEPAE	2.0	2.0	—	1.0	1.0	1.0
nprE(任意)	0.03	0.05	—	0.03	—	0.02
PMN	—	—	0.01	—	0.08	—
プロテアーゼA(任意)	—	—	0.01	—	—	—
リパーゼ	—	—	—	0.002	—	—
アミラーゼ	—	—	—	—	0.002	—
セルラーゼ	—	—	—	—	—	0.0001
ペクチンリアーゼ	0.005	0.005	—	—	—	—
アルドースオキシダーゼ	0.05	—	—	0.05	—	0.02
ガラクトースオキシダーゼ	—	0.04	—	—	—	—
PAAC	0.03	0.03	0.02	—	—	—
DETBCHD	—	—	—	0.02	0.01	—
SRP 1	0.2	0.2	—	0.1	—	—
DTPA	—	—	—	0.3	—	—
PVNO	—	—	—	0.3	—	0.2
増白剤1	0.2	0.2	0.07	0.1	—	—
シリコーン消泡剤	0.04	0.04	0.02	0.1	0.1	0.1
100%までの残部香料/染料及び/又は水						

## 【 0 7 3 7 】

( 実施例 1 7 )

食器手洗い用液体洗剤組成物

10

20

30

40

50

この実施例では、様々な食器手洗い用液体洗剤配合物が提供される。以下の本発明の食器手洗い用液体洗剤組成物が、下記に提供される。これらの配合物のそれぞれにおいて、本明細書で提供される少なくとも1つのプロテアーゼ変異体は、約0.0001~約10重量%の濃度で含まれる。一部の代替的な態様では、必要性に応じ、配合者により決定されるものとして、他の濃度での使用も見出される。

【表61】

化合物	配合物					
	I	II	III	IV	V	VI
C <sub>12</sub> ~C <sub>15</sub> AE <sub>1.8</sub> S	30.0	28.0	25.0	—	15.0	10.0
LAS	—	—	—	5.0	15.0	12.0
パラフィンシルホネート	—	—	—	20.0	—	—
C <sub>10</sub> ~C <sub>18</sub> アルキルジメチルアミノオキシド	5.0	3.0	7.0	—	—	—
ベタイン	3.0	—	1.0	3.0	1.0	—
C <sub>12</sub> ポリ-OH脂肪酸アミド	—	—	—	3.0	—	1.0
C <sub>14</sub> ポリ-OH脂肪酸アミド	—	1.5	—	—	—	—
C <sub>11</sub> E <sub>9</sub>	2.0	—	4.0	—	—	20.0
DTPA	—	—	—	—	0.2	—
クエン酸三ナトリウム二水和物	0.25	—	—	0.7	—	—
ジアミン	1.0	5.0	7.0	1.0	5.0	7.0
MgCl <sub>2</sub>	0.25	—	—	1.0	—	—
nprE(任意)	0.02	0.01	—	0.01	—	0.05
PMN	—	—	0.03	—	0.02	—
プロテアーゼA(任意)	—	0.01	—	—	—	—
アミラーゼ	0.001	—	—	0.002	—	0.001
アルドースオキシダーゼ	0.03	—	0.02	—	0.05	—
クメンシルホン酸ナトリウム	—	—	—	2.0	1.5	3.0
PAAC	0.01	0.01	0.02	—	—	—
DETBCHD	—	—	—	0.01	0.02	0.01
100%までの残部香料/染料及び/又は水						

## 【0738】

実施例16(I)~(VI)のpHは、約8~約11である。

## 【0739】

(実施例18)

液体自動食器洗浄洗剤組成物

この実施例では、様々な液体自動食器洗浄洗剤配合物が提供される。以下の本発明の食器手洗い用液体洗剤組成物が、下記に提供される。これらの配合物のそれぞれにおいて、本明細書で提供される少なくとも1つのプロテアーゼ変異体は、約0.0001~約10重量%の濃度で含まれる。一部の態様では、必要性に応じ、配合者により決定されるものとして、他の濃度での使用も見出される。

【表 6 2】

表18-1: 液体自動食器洗淨洗剤組成物					
化合物	配合物				
	I	II	III	IV	V
STPP	16	16	18	16	16
硫酸カリウム	—	10	8	—	10
1, 2-プロパンジオール	6.0	0.5	2.0	6.0	0.5
ホウ酸	—	—	—	4.0	3.0
CaCl <sub>2</sub> 二水和物	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
非イオン性	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
nprE(任意)	0.1	0.03	—	0.03	—
PMN	—	—	0.05	—	0.06
プロテアーゼB(任意)	—	—	—	0.01	—
アミラーゼ	0.02	—	0.02	0.02	—
アルドースオキシダーゼ	—	0.15	0.02	—	0.01
ガラクトースオキシダーゼ	—	—	0.01	—	0.01
PAAC	0.01	—	—	0.01	—
DETBCHD	—	0.01	—	—	0.01
100%までの残部香料／染料及び／又は水					

10

20

## 【 0 7 4 0 】

( 実施例 1 9 )

## 高密度食器洗淨洗剤

この実施例は、高密度食器洗淨洗剤についての様々な配合物を提供する。以下の本発明のコンパクト高密度洗剤が、下記に提供される。各配合物において、本明細書で提供される少なくとも1つのプロテアーゼ変異体は、約0.0001～約10重量%の濃度で含まれる。一部の態様では、必要性に応じ、配合者により決定されるものとして、他の濃度での使用も見出される。

30

【表 6 3】

化合物	配合物					
	I	II	III	IV	V	VI
STPP	—	45.0	45.0	—	—	40.0
クエン酸三ナトリウム・2H <sub>2</sub> O	17.0	—	—	50.0	40.2	—
炭酸ナトリウム	17.5	14.0	20.0	—	8.0	33.6
重炭酸塩	—	—	—	26.0	—	—
ケイ酸塩	15.0	15.0	8.0	—	25.0	3.6
メタケイ酸塩	2.5	4.5	4.5	—	—	—
PB1	—	—	4.5	—	—	—
PB4	—	—	—	5.0	—	—
過炭酸塩	—	—	—	—	—	4.8
BB1	—	0.1	0.1	—	0.5	—
BB2	0.2	0.05	—	0.1	—	0.6
非イオン性	2.0	1.5	1.5	3.0	1.9	5.9
HEDP	1.0	—	—	—	—	—
DETPMP	0.6	—	—	—	—	—
PAAC	0.03	0.05	0.02	—	—	—
パラフィン	0.5	0.4	0.4	0.6	—	—
nprE(任意)	0.072	0.053	—	0.026	—	0.01
PMN	—	—	0.053	—	0.059	—
プロテアーゼB(任意)	—	—	—	—	—	0.01
アミラーゼ	0.012	—	0.012	—	0.021	0.006
リパーゼ	—	0.001	—	0.005	—	—
ペクチンリアーゼ	0.001	0.001	0.001	—	—	—
アルドースオキシダーゼ	0.05	0.05	0.03	0.01	0.02	0.01
BTA	0.3	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3
ポリカルボキシレート	6.0	—	—	—	4.0	0.9
香料	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2
100%までの残部水分及び／又は微量成分*						

## 【0741】

\* 香料 / 染料 / SRP1 / カルボキシメチルセルロースナトリウム / 光漂剤 / MgSO<sub>4</sub> / PVPI / 抑泡剤 / 高分子量PEG / 粘土。

## 【0742】

実施例18(I)~(VI)のpHは、約9.6~約11.3である。

## 【0743】

(実施例20)

液体硬質表面クリーニング洗剤

この実施例は、液体硬質表面クリーニング洗剤用の様々な配合物を提供する。以下の本発明の液体硬質表面クリーニング洗剤組成物は、下記に提供される。これらの配合物のそれぞれにおいて、本明細書で提供される少なくとも1つのプロテアーゼ変異体は、約0.0001~約10重量%の濃度で含まれる。一部の態様では、必要性に応じ、配合者により決定されるものとして、他の濃度での使用も見出される。

10

20

30

40

【表 6 4】

表20-1:液体硬質表面クリーニング洗剤							
化合物	配合物						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
C <sub>9</sub> ~C <sub>11</sub> E <sub>5</sub>	2.4	1.9	2.5	2.5	2.5	2.4	2.5
C <sub>12</sub> ~C <sub>14</sub> E <sub>5</sub>	3.6	2.9	2.5	2.5	2.5	3.6	2.5
C <sub>7</sub> ~C <sub>9</sub> E <sub>6</sub>	—	—	—	—	8.0	—	—
C <sub>12</sub> ~C <sub>14</sub> E <sub>21</sub>	1.0	0.8	4.0	2.0	2.0	1.0	2.0
LAS	—	—	—	0.8	0.8	—	0.8
クメンスルホン酸ナトリウム	1.5	2.6	—	1.5	1.5	1.5	1.5
Isachem(登録商標)AS	0.6	0.6	—	—	—	0.6	—
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.6	0.13	0.6	0.1	0.2	0.6	0.2
クエン酸三ナトリウム・2H <sub>2</sub> O	0.5	0.56	0.5	0.6	0.75	0.5	0.75
NaOH	0.3	0.33	0.3	0.3	0.5	0.3	0.5
脂肪酸	0.6	0.13	0.6	0.1	0.4	0.6	0.4
2-ブチルオクタノール	0.3	0.3	—	0.3	0.3	0.3	0.3
PEG DME-2000(登録商標)	0.4	—	0.3	0.35	0.5	—	—
PVP	0.3	0.4	0.6	0.3	0.5	—	—
MME PEG(2000)(登録商標)	—	—	—	—	—	0.5	0.5
Jeffamine(登録商標)ED-2001	—	0.4	—	—	0.5	—	—
PAAC	—	—	—	0.03	0.03	0.03	—
DETBCHD	0.03	0.05	0.05	—	—	—	—
nprE(任意)	0.07	—	0.08	0.03	—	0.01	0.04
PMN	—	0.05	—	—	0.06	—	—
プロテアーゼB(任意)	—	—	—	—	—	0.01	—
アミラーゼ	0.12	0.01	0.01	—	0.02	—	0.01
リパーゼ	—	0.001	—	0.005	—	0.005	—
ペクチンリアーゼ	0.001	—	0.001	—	—	—	0.002
ZnCl <sub>2</sub>	0.02	0.01	0.03	0.05	0.1	0.05	0.02
ギ酸カルシウム	0.03	0.03	0.01	—	—	—	—
PB1	—	4.6	—	3.8	—	—	—
アルドースオキシダーゼ	0.05	—	0.03	—	0.02	0.02	0.05
100%までの残部香料/染料及び/又は水							

## 【0744】

実施例19(I)~(VII)のpHは、約7.4~約9.5である。

## 【0745】

本明細書で引用されているすべての刊行物、特許出願及び特許は、個々の刊行物、特許出願又は特許のそれぞれが特定の及び個々に参照により組み込まれるよう示されているように、参照により本明細書に組み込まれる。特に、本明細書に引用されているすべての刊行物は、本発明に関連して使用され得る組成物及び方法を、説明及び開示する目的で参照により明示的に本明細書に組み込まれる。上記発明は一部の詳細において理解の明確化の目的のために例示及び実施例により説明したが、添付の請求項の趣旨又は範囲から離れることなくこれに一定の変更及び修正を加えることができることは、本発明の教示を考慮すれば当業者であれば容易に理解される。

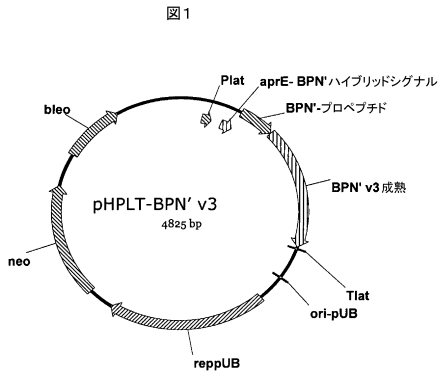
10

20

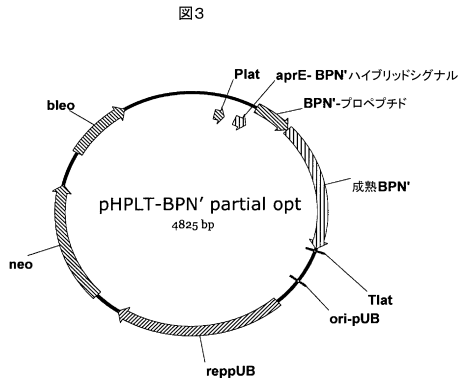
30

40

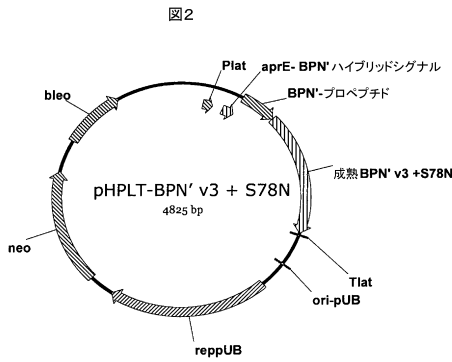
【 図 1 】



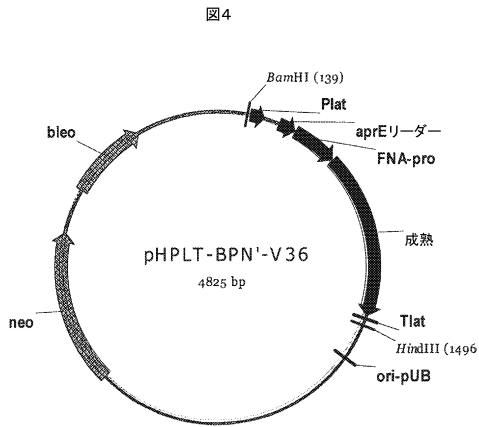
【 図 3 】



【 図 2 】



【 図 4 】

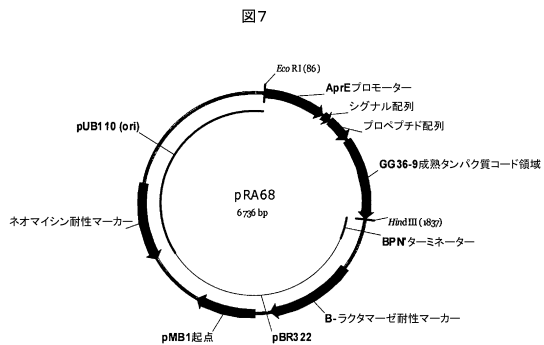


【 図 5 】

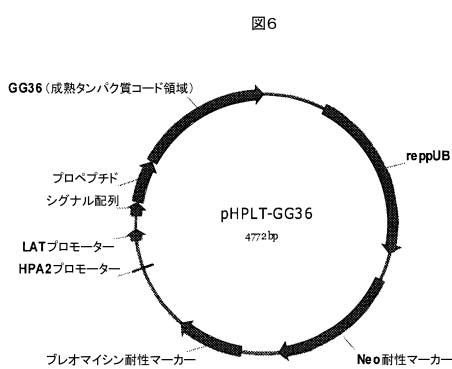
図5

BPN'	1	AQSVPYGVSQ	IKAPALHSQG	YTGSNVYKAV	IDSGIDSSH	DLKVAGGASM	VPSETNFPQD
GG36	1	AQSVPWGISR	VQAPAAINRG	LTGSGVKVAV	LDTGIS-THP	DLNIRGGASF	VPGEPEST-QD
BPN'	61	NNSHGTHVAG	TVAALNNSIG	VLGVAFSASL	YAVKVLGADG	SGQYSWIIING	IEMALANNMD
GG36	59	GNGHGTHVAG	TIAALNNSIG	VLGVAFSABL	YAVKVLGASG	SGSVSSIAQG	LEWAGNNGMH
BPN'	121	VINMSLGGPS	GSAALKAADV	KAVASGVVVV	AAAGNEGTSG	SSSTVGYPGK	YPSVIAVGAV
GG36	119	VANLSLGGPS	PSATLEQAVN	SATSRGVLVV	AASGNSGAGS	----ISYPAR	YANAMAVGAT
BPN'	181	DGSENORASF	QYGFELDYMA	PGVSIQSTLP	GNKYGAVNGT	SMASPHVAGA	AALILSKHPN
GG36	175	DQNNRASFS	QYGRGLDIYA	PGVNVQSTYP	GSTYASLNGT	SMATPHVAGA	AALVKQKNPS
BPN'	241	WNTQVRSLSL	ENTTTKLGDS	FYYGKGLINV	QAAAQ		
GG36	235	WBNVQIRNHL	KNTATSLGST	NLYGSLVNA	EAATR		

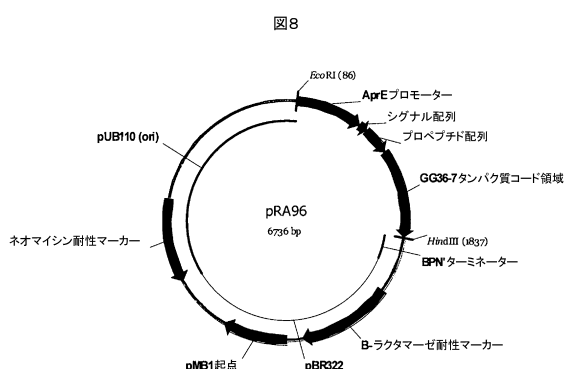
【 図 7 】



【 図 6 】



【 図 8 】



**【配列表】**

0005863666000001.app

## フロントページの続き

- (51) Int. Cl. F I  
 C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/10  
 C 1 1 D 3/386 (2006.01) C 1 1 D 3/386  
 C 1 1 D 7/42 (2006.01) C 1 1 D 7/42
- (74)代理人 100169993  
 弁理士 今井 千裕
- (74)代理人 100161539  
 弁理士 武山 美子
- (74)代理人 100166637  
 弁理士 木内 圭
- (74)代理人 100177356  
 弁理士 西村 弘昭
- (72)発明者 バスラー、ジョシュア・ロイ  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5  
 、ダニスコ・ユーエス・インク
- (72)発明者 カスカオ - ベレイラ、ルイス・グスタホ  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5  
 、ダニスコ・ユーエス・インク
- (72)発明者 エステル、デイビッド・エー  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5  
 、ダニスコ・ユーエス・インク
- (72)発明者 ケリーズ、ジェームス・ティー  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5  
 、ダニスコ・ユーエス・インク
- (72)発明者 ピサーチック、アレキサンダー  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5  
 、ダニスコ・ユーエス・インク
- (72)発明者 ポウルズ、アウルー・カラン・ジェイ  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5  
 、ダニスコ・ユーエス・インク
- (72)発明者 トレース - パズミノ・ダニエル  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5  
 、ダニスコ・ユーエス・インク

審査官 渡邊 潤也

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 0 8 / 1 5 3 9 2 5 ( W O , A 2 )  
 特表 2 0 0 5 - 5 1 9 5 9 2 ( J P , A )  
 国際公開第 2 0 0 9 / 1 4 9 1 4 4 ( W O , A 2 )  
 国際公開第 2 0 0 9 / 1 4 9 2 0 0 ( W O , A 2 )  
 Goddette, D.W. et al. , "Accession:P29599[gi:267046], Definition:RecName: Full=Subtilisin  
 BL; AltName: Full=Alkaline protease." , NCBI Entrez Protein[online]; 22-SEP-2009 uploade  
 d, NCBI, [retrieved on 19 January 2015] , Retrieved from the Internet , U R L , [http://www  
 .ncbi.nlm.nih.gov/protein/267046?sat=12&satkey=7811258](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/267046?sat=12&satkey=7811258)

- (58)調査した分野(Int. Cl. , D B 名)  
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0



C12N 9/00-9/99  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
CAplus/BIOSIS(STN)  
UniProt/GeneSeq  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
PubMed  
DWPI(Thomson Innovation)