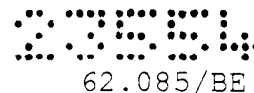


P9600667

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**



74222

K I V O N A T

**Csökkentett adszorpciójú és megnövelt hidrolizáló képességű
szubtilizin BPN' variánsok**

THE PROCTER & GAMBLE COMPANY, CINCINNATI, Ohio, . US

A bejelentés napja: 1994.08.31.

Elsőbbségei: 1993.09.15. (US 08/121,437)

1994.08.11. (US 08/287,461)

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US94/10020

A nemzetközi közzététel száma: WO 95/07991

A találmány tárgyát számos tisztító készítményben alkalmazható új szubtilizin BPN' enzimvariánsok, az ezeket kódoló gének, valamint ezeket a szubtilizin enzimvariánsokat tartalmazó tisztító készítmények képezik.

A találmány szerinti szubtilizin enzimek a vad típusú enzimhez képest oldhatatlan szubsztráton csökkent mértékben adszorbeálódnak, és azt jobban hidrolizálják. A találmány szerinti feenzimvariánsokat adalékanyagként mosodai mosószer készítményekben alkalmazva a szennyezett ruhaneműből történő fehérjetartalmú foltok eltávolítása lényegesen javul.

A találmány tárgyát képezik különböző felületek tisztítására szolgáló olyan készítmények is, amelyek ilyen szubtilizin BPN' variánsokat tartalmaznak.

alkalmazható
szubtilizin

P9600667

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**



S.B.G. & K.

Nemzetközi

Szabadalmi Iroda

H-1062 Budapest, Andrássy út 113.

Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

62.085/BE

**Csökkentett adszorpciójú és megnövelt hidrolizáló képességű
szubtilizin BPN' variánsok**

THE PROCTER & GAMBLE COMPANY, CINCINNATI, Ohio, US

Feltalálók:

BRODE Philip Frederick III, CINCINNATI, OH, US

BARNETT Bobby Lee, CINCINNATI, OH, US

RUBINGH Donn Nelton, CINCINNATI, OH, US

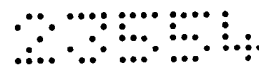
A bejelentés napja: 1994.08.31.

Elsőbbségei: 1993.09.15. (US 08/121,437)

1994.08.11. (US 08/287,461)

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US94/10020

A nemzetközi közzététel száma: WO 95/07991



A találmány tárgyát számos tisztító készítményben alkalmazható új enzimvariánsok és az ilyen enzimvariánsokat kódoló gének képezik.

Az enzimek a természetesen előforduló fehérjék legnagyobb csoportját alkotják. Minden enzimcsoport általában másfajta kémiai reakciót katalizál (a reakciót elhasználódás nélkül gyorsítja). Az enzimek proteázokként ismert csoportját arról a képességéről ismerjük, hogy más fehérjék hidrolízisére (a hasított kémiai kötés mindkét oldalán egy vízmolekula hidrogén- és hidroxirészének felvételével, egy vegyületnek kettő vagy több, egyszerűbb vegyületre való lebontására) képesek. A természetesen előforduló és fehérje irányítottaságú proteázokat adalékanyagként beletéve mosodai mosószer készítményekbe, ezt a fehérjét hidrolizáló képességet előnyösen hasznosítjuk. A ruhákon sok folt fehérjetartalmú, és a nagyon specifikus proteázok lényegesen javíthatják az ilyen foltok eltávolítását.

Sajnos ezeknek a fehérjéknek természetes, bakteriális környezetükben mutatott hatékonysága gyakran nem tevődik át a viszonylag természetellenes mosási környezetre. Különösen az olyan proteáz tulajdonságok, mint a hőstabilitás, pH stabilitás, oxidatív stabilitás és szubsztrát specifikusság, nem szükségszerűen optimalizáltak az enzimnek természetes környezetén kívül történő hasznosítására.

A proteáz tulajdonságait aminosavszekvenciája határozza meg. A proteáz aminosavszekvenciájának változtatása eltérő mértékben megváltoztathatja az enzim tulajdonságait, sőt az aminosavszekvencia-változás helyétől, természetétől és/vagy mértékétől füg-



gően még inaktiválhatja is azt. Egy tulajdonságaik javítására tett kísérletben, a proteázok mosási környezetben mutatott hatékonyságának növelése céljából néhány megközelítésben megkísérelték a proteázok eredeti aminosavszekvenciáját megváltoztatni. Ezek a megközelítések teljesen változó körülmények között az aminosavszekvenciának a hőstabilitás növelésére és az oxidációs stabilitás javítására irányuló megváltoztatását tartalmazzák.

A technika állásában közölt számos megközelítés ellenére folyamatosan fennáll az igény különféle felületek tisztítására alkalmazható új, hatékony proteáz variánsokra.

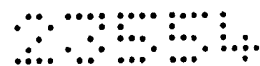
A találmány tárgyát képezik az enzim vad típusához képest jobb hidrolizáló képességű szubtilizin enzimvariánsok.

A találmány tárgyát képezik ezeket a szubtilizin enzimvariánsokat tartalmazó tisztító készítmények is.

A találmány tárgyát olyan szubtilizin BPN' variánsok képezik, amelyek legalább egy, kettő vagy három, a természetesen előforduló szubtilizin BPN' -től specifikusan azonosított helyeken eltérő aminosavat tartalmaznak (azaz szubsztituáltak), ami által a természetesen előforduló szubtilizin BPN' -hez képest a BPN' variáns csökkent mértékben adszorbeálódik egy oldhatatlan szubsztráthoz, és azt jobban hidrolizálja. Szintén a találmány tárgyát képezik az ilyen szubtilizin BPN' variánsokat kódoló gének. A találmány tárgyát képezik azok a különböző felületek tisztítására szolgáló készítmények is, amelyek ilyen szubtilizin BPN' variánsokat tartalmaznak.

I. Szubtilizin variánsok

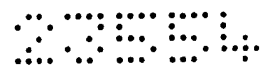
A találmány tárgyát olyan szubtilizin enzimek – különösen



BPN' – képezik, amelyeket, az enzimet kódoló különböző nukleotid szekvenciák mutációjával módosítunk, ezáltal módosítva az enzim aminosavszekvenciáját. A találmány szerinti módosított szubtilizin enzimek (a későbbiekben „BPN' variánsok”) a természetesen előforduló szubtilizin BPN' -hez képest egy oldhatatlan szubsztráton csökkent mértékben adszorbeálódnak, és azt jobban hidrolizálják. A találmány tárgyát képezik az ilyen BPN' variánsokat kódoló mutáns gének is.

A találmány szerinti szubtilizin enzimek a proteázokként ismert enzimcsoportozáshoz tartoznak. A proteáz a peptidkötések hasítására szolgáló katalizátor. A proteáz egyik típusa a szerin-proteáz. A szerin-proteázot az jellemzi, hogy az aktív helyen alapvetően egy szerin-maradék van.

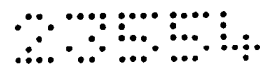
Jól dokumentált az a megfigyelés, hogy az enzimkoncentrációval nő egy enzim oldható-szubsztrátokat hidrolizáló sebessége. Lehetségesnek tűnik ennél fogva, hogy felületen kötött szubsztrátokra, például amilyenekkel sok tisztítási alkalmazásnál számolhatunk, a felületi koncentrációval a hidrolízis sebessége nő. Láthatóan ez az eset áll fenn. [Brode, P.F. III és D.S. Rauch, LANGMUIR; „Szubtilizin BPN' : Aktivitás egy rögzített szubsztráton”, Vol.8., 1325-1329 (1992)]. Valójában oldhatatlan szubsztrátokra lineáris összefüggést találtunk a sebesség és a felületi koncentráció között, amennyiben az enzim felületi koncentrációja változik. [Rubingh, D.N. és M.D. Bauer; „Hidrolízis katalizálása proteázokkal a fehérjeoldat határfelületen” című publikációja az I. Noda és D. N. Rubingh által szerkesztett; POLYMER SOLUTIONS, BLENDS AND INTERFACES-ben, Elsevier, 464 ol-



dal (1992)]. Meglepő módon nem tapasztaltuk, hogy a fokozottabban adszorbeálódó enzimek teljesítménye jobb, amikor ezt az alapelvet óhajtottuk alkalmazni jobb tisztítási teljesítményt nyújtó enzimvariánsok kutatásánál. Valójában meglepve tapasztaltuk, hogy ellenkező a helyzet: egy szubsztráthoz csökkent adszorpciójú enzim eredményezett jobb szubsztrát hidrolízist (azaz jobb tisztító hatást).

Anélkül, hogy elmélethez kívánnánk kötődni, úgy véljük, hogy egyik variánsnak a másikkal történő összehasonlításánál, a jobb teljesítmény annak a ténynek eredménye, hogy azok az enzimek, amelyek kevésbé adszorbeálódnak, kevésbé szorosan kötöttek, és ennél fogva nagyobb mozgékonyaságúak azon a felületen, amelyről az oldhatatlan fehérjeszubsztrátot el kell távolítani. Hasonló enzimoldat koncentrációknál ez a mozgékonyaság szükséges bármilyen lényeges előnyhöz, amelyet nagyobb koncentrációjú enzimnek a felületre való szállításával biztosítunk.

A találmányban közölt mutációkat úgy terveztük, hogy az enzimnek felületen kötött szennyeződésekre történő adszorbeálódását megváltoztassák (azaz csökkentésük). BPN'-ben az aminosavak, a 220 helytől a 220 helyig, egy nagyobb külső hurkot formálnak az enzim molekulán. Felismertük, hogy ez a hurok jelentős szerepet játszik az enzim molekulának egy felülethez kötött peptidre való adszorpciójában, és ebben a hurokban levő specifikus mutációk jelentős hatást gyakorolnak erre az adszorpcióra. Anélkül, hogy elmélethez kívánnánk kötődni, úgy véljük, hogy ez a hurok legalább két okból fontos a BPN' molekula adszorpciójában. Először, azok az aminosavak, amelyeket ez a külső hurok tartalmaz,



szoros kapcsolatot létesíthetnek bármilyen felületekkel, amelyek hatásának a molekulát kitesszük. Másodsor, ennek a huroknak az aktív hellyel és a BPN' molekula kötő bemélyedésével való szomszédossága biztosít szerepet az enzimnek a felülethez kötött szubsztrátokra (peptidek/fehérje szennyeződések) való katalitikusan produktív adszorpciójában.

Az itt használt értelmezés szerint a „variáns” a vad típus-tól eltérő aminosavszekvenciájú enzimet jelent.

Az itt használt értelmezés szerint a „mutáns BPN' gén” egy BPN' variánst kódoló gént jelent.

Az itt használt értelmezés szerint a „vad típusú szubtilizin BPN'” egy 1. számú aminosavszekvencia által megadott szubtilizin enzimet jelent. Szubtilizin BPN'-re az aminosavszekvenciát továbbá Wells, J.A.E. Ferrari, D.J. Henner, D.A. Estell és E.Y. Chen; Nucleic Acids Research, II.kötet, 7911-7925 (1983) című munkában közlik, amelyet a leírásban hivatkozásként tekintünk.

Az itt használt értelmezés szerint a „vad típusú aminosavszekvencia” kifejezés 1. számú aminosavszekvenciát, valamint az aminosavszekvenciában a 199-220 helyek bármelyikétől eltérő helyeken módosításokkal rendelkező 1. számú aminosavszekvenciát jelent.

A jelen értelmezés szerint a „hidrofilebb” kifejezés bármilyen aminosavat jelent, amelynek hidrofilitása nagyobb, mint egy, a következő hidrofilitási táblázatban bemutatott aminosav. A következő hidrofilitási táblázat (1.táblázat) az aminosavakat a hidrofilitás-növekedés csökkenő sorrendjében sorolja fel [lásd Hopp, T.P. és Woods, K.R.; „Protein antigén determinánsok



előbecslése az aminosavszekvenciákból”, Proceedings of the National Academy of Science USA, 78, 3824-3828, (1981), amelyet a leírásban hivatkozásként tekintünk].

1.táblázat

Aminosav	Hidrofilitási érték
Trp	-3,4
Phe	-2,5
Tyr	-2,3
Leu, Ile	-1,8
Val	-1,5
Met	-1,3
Cys	-1,0
Ala, His	-0,5
Thr	-0,4
Pro, Gly	-0,0
Gln, Asn	0,2
Ser	0,3
Arg ⁺ , Lys ⁺ , Glu ⁻ , Asp ⁻	3.0

Az 1.táblázat azt is jelzi, hogy mely aminosavak hordoznak töltést (ez a jellemző körülbelül 8-9 pH értéken alapul). A pozitív töltésű aminosavak az Arg és Lys, a negatív töltésű aminosavak pedig Glu és Asp, és a többi aminosav semleges. A találmány egy előnyös megvalósításában a szubsztituálós aminosav vagy semleges vagy negatív töltésű, még előnyösebben negatív töltésű (azaz Glu vagy Asp).

Így például az az állítás, hogy „Gln-t egy azonos vagy hid-

rofilebb, semleges vagy negatív töltésű aminosavval helyettesítünk", azt jelenti, hogy Gln-t Asn-nal (amely Gln-nal azonos hidrofilitású) vagy Ser-nel, Glu-nal vagy Asp-nal (amelyek Gln-nál hidrofilebbek) kell helyettesíteni; amelyek mindegyike semleges vagy negatív töltésű, és Gln-hez képest nagyobb hidrofilitási értékű. Az az állítás, hogy „Pro-t egy semleges vagy negatív töltésű, hidrofilebb aminosavval helyettesítjük”, hasonlóan azt jelenti, hogy Pro-t Gln-nal, Asn-nel, Ser-nel, Glu-val vagy Asp-nal kell helyettesíteni.

A. Legalább egy aminosav szubsztitúciót tartalmazó variánsok

A találmány egyik megvalósításában a BPN' variáns olyan vad típusú aminosavszekvenciát tartalmaz, amelyben a vad típusú aminosavszekvencia a 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 218, 219 vagy 220 helyek közül egy vagy több helyen szubsztituált, ami által a vad típusú szubtilizin BPN'-hez képest a BPN' variáns csökkent adszorpciójú és oldhatatlan szubsztráton megnövekedett hidrolizáló képességű lesz. A szubsztituált aminosavat tartalmazó helyek előnyösen a 199, 200, 201, 202, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, vagy 215; még előnyösebben a 200, 201, 202, 205, vagy 207 helyek.

A 199 helyre a szubsztituáló aminosav előnyösen Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 200 helyre a szubsztituáló aminosav előnyösen His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 201 helyre a szubsztituáló aminosav előnyösen Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.



A 202 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Pro, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 203 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Met, Cys, His, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 204 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Glu.

A 205 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Leu, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 206 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Pro, Asn vagy Ser.

A 207 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Asp vagy Glu.

A 208 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 209 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 210 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

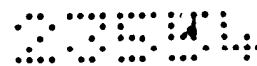
A 211 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Ala, Pro, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 212 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 213 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Trp, Phe, Tyr, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 214 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Phe, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Pro, Gly, Gln, Asn, Asp vagy Glu.

A 215 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Thr, Pro,



Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 216 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 218 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Glu.

A 219 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Pro, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 220 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Pro, Gly, Gln, Asn, Asp vagy Glu.

Még előnyösebben a 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 219 és 220 helyek bármelyikére az 1. táblázatnak megfelelően semleges vagy negatív töltésű és ugyanolyan hidrofíls vagy hidrofílebb, előnyösen hidrofílebb a szubsztituálós aminosav, mint a vad típusú szubtilizin BPN'-ben, az illetős helyen levős aminosav.

Még ennél is előnyösebben a szubsztituálós aminosav a 199, 200, 201, 202, 203, 205, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 219 és 220 helyek bármelyikére Asp vagy Glu; és a szubsztituálós aminosav a 204 vagy 218 helyekre Glu.

B. Legalább két aminosav szubsztituciós tartalmazós variánsok

A találmány egy másík megvalósításában a BPN' variáns olyan vad típusú aminosavszekvenciát tartalmaz, amelyben a vad típusú aminosavszekvenciát a 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219 vagy 220 helyek közül két vagy több helyen helyettesítjük, ami által a vad típusú szubtilizin BPN'-hez képest a BPN' variáns csökkent adszorpciósú és oldhatatlan szubsztráton megnövekedett hidrolizálós képességű lesz. Szubsztituált aminosavat tartalmazós

helyek előnyösen a 199, 200, 201, 202, 205, 207, 208, 209, 210, 211, 212, vagy 215; még előnyösebben a 200, 201, 202, 205, vagy 207 helyek.

A 199 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 200 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 201 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 202 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Pro, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 203 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 204 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Asp vagy Glu.

A 205 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Leu, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 206 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Pro, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 207 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Asp vagy Glu.

A 208 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 209 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 210 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Ala, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.



A 211 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Ala, Pro, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 212 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Gln, Ser, Asp vagy Glu.

A 213 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Trp, Phe, Tyr, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 214 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Phe, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 215 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Thr, Pro, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 216 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

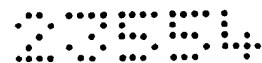
A 217 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 218 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Gln, Ser, Asp vagy Glu.

A 219 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 220 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

Még előnyösebben a 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219 és 220 helyek bármelyikére az 1. táblázatnak megfelelően semleges vagy negatív töltésű és ugyanolyan hidrofíls vagy hidrofílebb,



előnyösen hidrofílebb a szubsztituáló aminosav, mint a vad típusú szubtilizin BPN' -ben az illető helyen levő aminosav.

Még ennél is előnyösebben a szubsztituáló aminosav a 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219 és 220 helyek bármelyikére Asp vagy Glu.

C. Legalább három aminosav szubsztitúciót tartalmazó variánsok – A találmány másik megvalósításában a BPN' variáns olyan természetes típusú aminosavszekvenciát tartalmaz, amelyben a természetes típusú aminosavszekvencia a 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219 vagy 220 helyek közül három vagy több helyen szubsztituált, ami által a vad típusú szubtilizin BPN' -hez képest a BPN' variáns csökkent adszorpciójú és oldhatatlan szubsztráton megnövekedett hidrolizáló képességű lesz. Szubsztituált aminosavat tartalmazó helyek előnyösen a 199, 200, 201, 202, 205, 207, 208, 209, 210, 211, 212, vagy 215; még előnyösebben a 200, 201, 202, 205, vagy 207 helyek.

A 199 helyre a szubsztituáló aminosav előnyösen Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 200 helyre a szubsztituáló aminosav előnyösen His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 201 helyre a szubsztituáló aminosav előnyösen Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 202 helyre a szubsztituáló aminosav előnyösen Pro, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 203 helyre a szubsztituáló aminosav előnyösen Met, Cys,

Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 204 helyre a szubsztituálós aminosavat előnyösen Asp-ból vagy Glu-ból álló csoportból választjuk ki.

A 205 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Leu, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 206 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Pro, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 207 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Asp vagy Glu.

A 208 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 209 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 210 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Ala, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 211 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Ala, Pro, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 212 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Gln, Ser, Asp vagy Glu.

A 213 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Trp, Phe, Tyr, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 214 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Phe, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 215 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Thr, Pro, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 216 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 217 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 218 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Gln, Ser, Asp vagy Glu.

A 219 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

A 220 helyre a szubsztituálós aminosav előnyösen Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

Még előnyösebben a 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219 és 220 helyek bármelyikére az 1. táblázatnak megfelelően semleges vagy negatív töltésű és ugyanolyan hidrofil vagy hidrofílebb, előnyösen hidrofílebb a szubsztituálós aminosav, mint a vad típusú szubtilizin BPN' -ben az illető helyen levő aminosav.

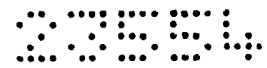
Még ennél is előnyösebben a szubsztituálós aminosav a 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219 és 220 helyek bármelyikére Asp vagy Glu.

D. Enzimvariánsok előállítása

1. példa

Mutáns BPN' gének

Egy vad típusú szubtilizin BPN' géneket tartalmazó fágmidot (pSS-5) [Mitchinson, C. és J.A. Wells; „Protein Engineering of



Disulfide Bonds in Subtilisin BPN' ; Diszulfid-kötések fehérje elrendezése a szubtilizin BPN'-ben", *Biochemistry*, 28., 4807-4815 (1989)] *Escherichia coli* unq CJ236 törzsben kifejezünk, és egyszálas uraciltartalmú DNS mintát állítunk elő a VCSM13 segédfág alkalmazásával [Kunkel, T.a., Roberts, J.D. és Zakour, R.A.; „Gyors és hatékony, helyre specifikus mutagenesis fenotípus szelekció nélkül”, *Methods in Enzymology*, 154., 367-382 (1987); Yuckenberg, P.D., Witney, F., Geisselsoder, J. és McClary, J. módosítása szerint, „Uraciltartalmú DNS-t és fágmid vektorokat alkalmazó helyre irányuló *in vitro* mutagenesis”, *Directed Mutagenesis - A Practical Approach*, szerkesztette M.J. McPherson; 27-48. oldal (1991); mindkettőt hivatkozásként tekintjük a leírásban]. Az összes mutáns előállítása [alapvetően, ahogyan Yuckenberg és munkatársai (1991) leírták; lásd az előzőekben] Zoller és Smith egyetlen primer helyre irányuló mutagenesis módszerének [Zoller, M.J. és Smith, M. „Oligonukleotid irányítású mutagenesis M13-ból származó vektorok alkalmazásával: hatékony és általános eljárás pontmutációk előállítására bármilyen DNS töredékben”, *Nucleic Acids Research*, 10, 6487-6500 (1982), amelyet hivatkozásként tekintünk a leírásban] módosításával történt. Az oligonukleotidokat egy Applied Biosystem Inc. 380B DNS szintetizátor alkalmazásával állítjuk elő. A mutagenizálási reakció termékeit *Escherichia coli* MM294 törzsben (American Type Culture Collection E, Coli. 33625) fejezzük ki. Az összes mutáns helyességét DNS szekvenálással megerősítjük, és az izolált DNS-t transzformáljuk a *Bacillus subtilis* BG2036 kifejező törzsbe [Yang, M.Y., Ferrari, E. és Henner, D.J.; „Bacil-

lus subtilis semleges proteázgénjének klónozása és a klónozott gén alkalmazása egy in-vitro-származtatott deléciós mutáns alkotására", *Journal of Bacteriology*, 160, 15-21 (1984)]. A mutánsok közül néhányhoz egy módosított, a 217. aminosavnál egy leolvasás eltolási (frameshift) stop kodon mutációt tartalmazó pSS-5-öt alkalmazunk az uracil templát előállítására. Az oligonukleotidokat úgy terveztük, hogy a 217 helyen a megfelelő leolvasási rendet helyreállítsák, és a 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219 és 220 helyeken a véletlenszerű (random) szubsztitúciók kódolását is (ezeknél a kodonoknál mind a három bázisra mind a négy nukleotid ekvimoláris és/vagy változó keverékei). Kazeinbontó képességükkel azonosítjuk azokat a mutációkat, amelyek megfelelőek a leolvasás eltolási stophoz, és egy működőképes enzimet állítanak elő. A véletlenszerű (random) szubsztitúciókat DNS szekvenálással határozzuk meg.

2.példa

Fermentálás

Az illető szubtilizin mutánst tartalmazó *Bacillus subtilis* sejteket (BE2036) egy liter LB-glükóz húsleves kultúrában középlogaritmikus szakaszig szaporítunk, és egy 10 liter össztérfogatú Biostat ED fermentorba (B. Braun Biotech, Inc., Allertown, Pennsylvania) beoltjuk. A fermentor-táptalaj élesztőextraktot, keményítőt, habzástgátlót, puffereket és nyomelemeket tartalmaz (lásd *Fermentation: a Practical Approach*, szerkesztő B. McNeil és L.M. Harvey; 1990). A fermentálás ideje alatt a húsleves



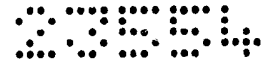
táptalajt állandó, 7,0 pH értéken tartjuk. A mutagenizált plazmid antibiotikus szelektálására kloramfenikolt adunk hozzá. A sejteket egy éjszakán át 37°C-on körülbelül 60 A_{600} értékig szaporítjuk, és learatjuk.

3.példa

Tisztítás

A fermentációs táptalajt a tiszta enzim kinyeréséhez a következő lépéseken vesszük keresztül. A táptalajt centrifugálással megtisztítjuk a *Bacillus subtilis* sejtektől, és a finom részecskének egy 100K cufoff membránnal való eltávolításával decimáljuk. Ezt egy 10K cutoff membránon végzett töményítés és áramlásos dialízis követi az ionerősség csökkentésére, majd pH-t 5,5-re állítjuk be 0,025 M MES puffer [2-(N-morfolino)-etánszulfonsav] segítségével. Az enzimet tovább tisztítjuk vagy egy kationcserélő kromatográfiás oszlopra vagy egy affinitás adszorpciós kromatográfiás oszlopra történő felvitelével és az oszlopról nátrium-klorid vagy propilén-glikol grádienssel eluálva [lásd Scopes, R.K.; Protein Purification Principles and Practice, Springer-Verlag, New-York (1984), a leírásban hivatkozásként tekintjük].

A grádiens eluálás alatt összegyűjtött frakciókra az aktív enzimkoncentráció meghatározására a pNA vizsgálatot [DelMar, E. G., Largman, J.W. és Geokas, M.C.; Anal. Biochem., 99., 316-320 oldal (1979), a leírásban hivatkozásként tekintjük] alkalmazzuk. Ez a vizsgálat azt a sebességet méri, amellyel a p-nitro-anilin felszabadul, amikor az enzim az oldható szintetikus szubsztrá-



tot, a szukcinil-alanil-alanil-prolil-fenilalanin-p-nitro-anilidet (sAAPF-pNA) hidrolizálja. A hidrolízis reakcióból a sárga szín képződési sebességét 410 nm-en mérjük egy spektrofotométerrel, és ez arányos az aktív enzimkoncentrációval. Az összes fehérjekoncentráció meghatározására ezen kívül a 280 nm-en végzett abszorbanca vizsgálatokat alkalmazzuk. Az enzimtisztaságot az aktív enzim/összes fehérje arány adja, és ezt alkalmazzuk az egyesített oldatba összegyűjtendő frakciók vizsgálatára.

Az enzim tárolás alatti autolízisének elkerülésére a kromatográfiás oszlopból nyert, összegyűjtött frakciókhoz azonos mennyiségű propilén-glikolt adunk. A tisztítási eljárás befejezése után az enzim alapoldatot SDS-PAGE [nátrium-dodecilszulfát/poliakrilamid gélelektroforézis] segítségével ellenőrizzük, és az abszolút enzimkoncentrációt egy aktív-hely titrálásos eljáráson keresztül, II-T típusú tripszin inhibitor alkalmazásával – Sigma Chemical Company-tól (St. Louis, Missouri) vásárolt pulykatojás fehérje – határozzuk meg. A mért konverziós tényezők mutatják, hogy az oldható pNA szubsztráttal szemben, a vad típusúhoz képest megnövekedett aktivitású enzim variánst, az enzim molekulában különböző helyeken végrehajtott, milyen változtatások eredményezik.

Az enzim alapoldatot alkalmazásra való előkészítésnél egy Sephadex-G25 (Pharmacia, Piscataway, New Jersey) töltetű elválasztó oszlopon keresztül eluáljuk a propilén-glikol eltávolítására és a puffer cseréjére. Az enzim alapoldatban levő MES puffert 0,01 M kalcium-kloridot tartalmazó 0,1 M Trisz-pufferre [trisz(hidroxi-metil)-amino-metán] cseréljük, és a pH értéket



sósav oldattal 8,6-re állítjuk be. Az összes kísérletet 8,6 pH értéken, Trisz pufferben, 25°C-on termosztálva végezzük.

E. Az enzim variánsok jellemzése

4.példa

Modellfelület előállítása

A CPG Inc.-től (Fairfield, New Jersey) vásárolt amino-propil-végcsoportos szabályozott pórusú üveget (CPG) használunk a Bachem, Inc.-től (Torrance, Kalifornia) vásárolt kovalens kötésű sAAPF-pNA szubsztrát hordozójaként. A reakciót dimetil-szulfoxidban végezzük, és kapcsoló ágensként 3-[3-(dimetil-amino)-propil]-1-etil-karbodiimid-hidrokloridot (EDC) használunk. A reakció teljes végbemenetele után (pNA vizsgálat jelzi) az oldószer felesleget eltávolítjuk, és a CPG:sAAPF-pNA-t dimetil-szulfoxiddal (DMSO) és kétszer desztillált vízzel öblítjük. Ezt szárítószekrényben, N₂ áramban, körülbelül 70°C-on végzett szárítás követi. A reakció tervezését és a rögzített szubsztrát előállítását a Brode, P.F.III és Rauch, D.S. által közöltek [„Szubtilizin BPN^v: aktivitás rögzített szubsztráton” – Langmuir, 8, 1325-1329 (1992); a leírásban hivatkozásként tekintjük] szerint végezzük.

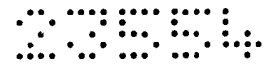
A CPG felület 62000 ± 7000 pNA molekula/μm²-t tartalmaz. A felszíni terület a CPG Inc. által a CPG-re közölt 50,0 m²/g értékhez képest változatlan marad. Ez azt sugallja, hogy az sAAPF-pNA-nak CPG-hez való kapcsolására alkalmazott eljárás nem károsítja a pórusszerkezetet (átlagos átmérő 48,6 nm).

5. példa

Felületi hidrolízis-vizsgálat

CPG:sAAPF-pNA alkalmazásával egyetlen kísérletben meghatározhatjuk egy enzimvariáns adszorpcióját és egy CPG kötésű peptid hidrolízisét. Kis mennyiségű enzimvariáns alapoldatot töltünk egy Trisz puffert és gáztalanított CPG: sAAPF-pNA-t tartalmazó lombikba. A lombikot 90 percig rázatjuk egy lengő mozgású rázógépen, amely idő alatt a rázógépet különböző időközönként (például az adszorpciós hidrolízis korai szakaszaiban minden két percben – például az első 20 percben – és a kísérlet vége felé minden 10 percben) leállítjuk. A CPG: sAAPF-pNA-t hagyjuk leülepedni, és az oldatot megmintázzuk. Mind a kísérleti eljárást, mind az adszorpció és hidrolízis számítását Brody és munkatársai (1992) előzőekben említett közlése szerint vezetjük.

Az összes enzimet ellenőrizzük autolízissel szembeni stabilitásra, és ezen kísérlet folyamán nem tudtunk észlelhető autolízis veszteséget kimutatni. Az enzim adszorpciót ennél fogva az oldatkimerülés mérésével határozhatjuk meg. A kezdeti enzimvariáns koncentráció és az egyes időpontoknál mért koncentrációk közötti különbség megadja az adszorbeált enzimvariáns mennyiségét. A felületről hidrolizált pNA mennyiséget alikvot mintarészeknek 410 nm-en végzett abszorbancia leolvasásaival mérjük. Az összes hidrolizált pNA mennyiséget a mintamennyiség és a lombikban maradó mennyiség összeadásával számítjuk ki. Ezt az értéket korrigáljuk az enzim jelenléte nélkül, 8,6 pH értéken Trisz pufferrel hidrolizált pNA mennyiség kivonásával. Ez az alaphidrolízis az enzim hatékonyságától függően a teljes hidrolízisnek 7-29 %-át



teszi ki.

6.példa

Oldható szubsztrát kinetikai analízis

Az sAAPF-pNA oldható szubsztrát hidrolízisének sebességét az adszorbancia növekedésnek az idő függvényeként, 410 nm-en, egy DU-70 spektrofotométeren történő mérésével ellenőrizzük. Az enzimkoncentrációt állandó értéken tartjuk, és az sAAPF-pNA-t 90 - 700 μM között változtatjuk az egyes kinetikai meghatározásoknál. Egy 900 másodperces időtartam alatt minden másodpercben felveszünk egy adszorbancia adatpontot, és az adatokat átvisszük egy LOTUSTM adatlapra (Lotus Development Corporation, Cambridge, Massachusetts). A kinetikai paraméterek analízisét a standard Lineweaver Burk analízissel végezzük, amelyben a görbe kezdeti szakaszán levő adatokat (általában az első perc) egy lineáris regressziós görbéhez illesztjük v_0 megadásához. K_M és k_{cat} nyeréséhez a v_0 és s_0 adatokat standard inverz módon ábrázoljuk.

F. BPN' variánsok példái

A következőkben, a 2.táblázatban mutatjuk be a csökkent adszorpciójú és a felülethez kötött szubsztrátokhoz képest jobb hidrolizáló képességű, találmány szerinti BPN' variánsokat. A jellemző mutációk leírásában először a természetesen előforduló, eredeti aminosavat adjuk meg, a második a pozíciószám és a harmadik a szubsztituált aminosav.

2. táblázat**BPN' variánsok példái**

- Egyes mutáció -

Lys213Glu

Ala216Glu

Ala216Asp

Ala216Gly

Ser204Glu

Val203Glu

- Kétszeres mutáció -

Lys213Glu + Tyr217Leu

Ile205Leu + Ala216Glu

Ile205Leu + Ala216Asp

Pro210Ala + Gly215Thr

Lys213Glu + Ala216Glu

Tyr214Phe + Tyr217Asn

Gln206Glu + Ala216Glu

Ala216Glu + Tyr217Leu

Gln206Glu + Tyr217Leu

Gln206Glu + Lys213Glu

- Háromszoros mutáció -

Gln206Pro + Gly211Ala + Ala216Glu

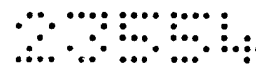
Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu

Ile205Val + Pro210Ala + Lys213Glu

Gln206Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu

Gln206Glu + Lys213Glu + Tyr217Leu

- Négyeszes mutáció -



Pro210Ala + Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu

Gln206Glu + Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu

Ser204Glu + Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu

-Ötszörös mutáció -

Ile205Leu + Pro210Ala + Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu

Ser204Glu + Gln206Glu + Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu

II. Tisztító készítmények

A találmány másik megvalósításában a találmány szerinti egy vagy több enzimvariáns hatékony mennyiségét, fehérjetartalmú folt eltávolítását igénylő különböző felületek tisztítására alkalmazható készítményekbe tesszük bele. Ilyen tisztító készítmények a kemény felületek tisztítására szolgáló bármilyen formájú (például folyékony és granulált) mosószer készítmények; kelme-tisztításra való bármilyen formájú (például granulált, folyékony és rúd készítmények) mosószer készítmények; mosogatószer készítmények (bármilyen formájúak); bármilyen formájú (például fogápolószer, fogpaszta és szájöblítőszer) szájtisztító készítmények; bármilyen formájú (például folyékony, tablettá) műfogsor tisztító készítmények; és bármilyen formájú (például folyadék, tablettá) kontaktlencse tisztító készítmények. Jelen értelmezés szerint az „enzimvariáns hatékony mennyisége” annak az enzimvariáns mennyiségnek felel meg, amely a jellemző tisztító készítményben az enzimaktivitás eléréséhez szükséges. Ilyen hatékony mennyiségeket a szakember gyorsan meghatároz, és ezek sok tényezőtől, például az alkalmazott jellemző enzimvariánstól, a tisztítási alkalmazástól, a tisztító készítmény jellemző összetéte-

létől és attól, hogy folyékony vagy száraz (például granulátum, rúd) készítmény szükséges-e, és hasonlóktól függenek. A találmány szerinti tisztító készítmények előnyösen körülbelül 0,0001-10 %, még előnyösebben körülbelül 0,001-1, még ennél is előnyösebben körülbelül 0,01-0,1 % mennyiségben tartalmaznak egy vagy több találmány szerinti enzimvariánst. A leírásban a következőkben különböző tisztító készítmények néhány olyan példáját részletesen tárgyaljuk, amelyekben a találmány szerinti enzimvariánsok alkalmazhatók. A leírásban alkalmazott összes rész, százalék és arány tömeg szerinti, amennyiben más módon nem határozzuk meg.

Jelen értelmezés szerint a „nem kelmetisztító készítmények” kemény felületet tisztító készítmények, mosogató készítmények, szájtisztító készítmények, műfogsor tisztító készítmények és kontaktlencse tisztító készítmények.

A. Kemény felületekhez, edényekhez és kelmékhez alkalmazható tisztító készítmények

A találmány szerinti enzimeket bármilyen, nagy habzást és jó oldhatatlan anyag eltávolítást igénylő mosószer készítményben alkalmazhatjuk. A találmány szerinti enzimvariánsokat így alkalmazhatjuk különböző hagyományos alkotórészekkel együtt, kemény felület tisztítószer, mosogatószer készítmény, kelmemosó készítmény és hasonló késztermékek biztosításához. Az ilyen készítmények folyékony, granulált, rúd és hasonló formájúak lehetnek. Az ilyen készítményeket korszerű, „koncentrált” mosószerekként is kialakíthatjuk, amelyek 30-60 tömeg% felületaktív anyagot tartalmaznak.



A találmány szerinti tisztító készítmények adott esetben és előnyösen különböző anionos, nemionos, ikerionos, stb. felületaktív anyagokat tartalmaznak. Az ilyen felületaktív anyagok jellemzően körülbelül 5-35 % mennyiségben vannak jelen a készítményekben.

A találmányban alkalmazható felületaktív anyagok nem korlátozó példái a hagyományos (11-18 szénatomos alkil)-benzolszulfonátok és a primer és véletlen (random) alkil-szulfátok, a 10-18 szénatomos, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x(\text{CHOSO}_3^- \text{M}^+) \text{CH}_3$ és $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_y(\text{CHOSO}_3^- \text{M}^+) \text{CH}_2\text{CH}_3$ általános képletű — amely képletben x és $(y+1)$ értéke egész szám, legalább körülbelül 7, előnyösen legalább 9, és M jelentése egy vízben való oldhatóságot elősegítő kation, különösen nátrium — szekunder 2,3-alkil-szulfátok, a 10-18 szénatomos alkil-alkoxi-szulfátok (különösen az 1-5 EO etoxi-szulfátok), 10-18 szénatomos alkil-alkoxi-karboxilátok (különösen az 1-5 EO etoxi-karboxilátok), a 10-18 szénatomos alkil-poliglükózidok és megfelelő szulfatált poliglükózidjaik, 12-18 szénatomos α -szulfonált zsírsav-észterek, 12-18 szénatomos alkil- és alkil-fenol-alkoxilátok (különösen az etoxilátok és a kevert etoxi/propoxi-származékok), 12-18 szénatomos betainok és szulfo-betainok („szultainok”), 10-18 szénatomos amin-oxidok és hasonlóak. A találmányban előnyösek az alkil-alkoxi-szulfátok (AES) és alkil-alkoxi-karboxilátok (AEC). (Az ilyen felületaktív anyagoknak az előzőekben említett amin-oxid és/vagy betain vagy szultain felületaktív anyagokkal kombinált alkalmazása szintén előnyös, a gyártó kívánalmaitól függően). Egyéb hagyományosan alkalmazható felületaktív anyagokat standard művekben sorolnak

fel. Különösen hasznos felületaktív anyagok az U.S.P. 5 194 639 számú (Connor et al), a leírásban hivatkozásként tekintett szabadalmi iratban közölt 10-18 szénatomos N-metil-glükamidok.

A találmány szerinti készítményekbe a tisztító hatású mosószer készítményekben alkalmazható egyéb alkotórészek széles választékát tehetjük bele, beleértve egyéb aktív alkotórészeket, hordozókat, hidrotropokat, kezelési segédanyagokat, festékeket vagy pigmenteket, a folyékony készítményekhez oldószereket, stb. A készítményekbe habfokozószereket, például 10-16 szénatomos alkol-amidokat, jellemzően körülbelül 1-10 % mennyiségben beletehetünk, amennyiben a habzás további növelése kívánatos. Az ilyen habfokozó szerek jellemző csoportját a 10-14 szénatomos mono- etanol- és dietanol-amidok alkotják. Az ilyen habfokozó szereknek az előzőekben közölt nagyon habzó kiegészítő felületaktív anyagokkal, például amin-oxidokkal, betainokkal és szultainokkal való alkalmazása szintén előnyös. További habzás biztosításához, amennyiben kívánatos, oldható magnéziumsókat, például magnézium-kloridot, magnézium-szulfátot és hasonlót, jellemzően körülbelül 0,1-2 % mennyiségben adhatunk hozzá.

A találmány szerinti folyékony mosószer készítmények hordozóként vizet és egyéb oldószereket tartalmazhatnak. Megfelelőek a kis molekulatömegű primer vagy szekunder alkoholok, például metil-alkohol, etil-alkohol, propil-alkohol és izopropil-alkohol. A felületaktív anyagok oldhatóvá tételére előnyösek az alkohol-monohidrátok, alkalmazhatjuk azonban a polioloikat, például a körülbelül 2-6 szénatomos és körülbelül 2-6 hidroxicsoportot tartalmazó (azaz 1,3-propándiolt, etilén-glikolt, glicerint és

1,2-propándiolt) is. Az ilyen hordozókból a készítmények körülbelül 5-90 %-ot, jellemzően körülbelül 10-50 %-ot tartalmazhatnak.

A találmány szerinti mosószer készítményeket kialakíthatjuk oly módon, hogy vizes tisztítási műveletekben alkalmazva, a mosóvíz körülbelül 6,8-11,0 közötti pH értékű legyen. A késztermékeket így jellemzően ebben a tartományban alakítjuk ki. Az ajánlott alkalmazási mennyiségeknél a pH szabályozási módszerek között pufferek, lúgok, savak, stb. szerepelnek, és ezek a szakember számára jól ismertek.

A találmány szerinti kemény felületi tisztító készítmények és kelmetisztító készítmények kialakításakor a gyártó különböző szennylebegtetők alkalmazását, körülbelül 5-50 tömeg% mennyiségben igényelheti. Jellemző szennylebegtetők az 1-10 μm -es zeolitok, polikarboxilátok, például citrát és oxi-diszukcinátok, rétegelt szilikátok, foszfátok és hasonlóak. Egyéb hagyományos szennylebegtetőket standard szövegekben sorolnak fel.

A gyártó, hasonló módon alkalmazni kívánhat ilyen készítményekben különböző további enzimeket, például cellulázokat, lipázokat, amilázokat és proteázokat, jellemzően körülbelül 0,001-1 tömeg% mennyiségben. A mosodai mosószer szakmában jól ismertek különböző tisztító hatású és kelmegondozó enzimek.

Ilyen készítményekben jellemzően körülbelül 1-15 tömeg% mennyiségben alkalmazhatunk különböző fehérítő vegyületeket, például perkarbonátokat, perborátokat és hasonlókat. Az ilyen készítmények, amennyiben kívánatos, tartalmazhatnak fehérítő aktivátorokat, például tetraacetyl-etylén-diamint, (nonanoil-oxi)-



-benzolszulfonátot és hasonlókat is, amelyek szintén ismertek a technika állásában. Az alkalmazott mennyiségek jellemzően körülbelül 1-10 tömeg% közöttiek.

Ilyen készítményekben különböző szennyeződést kioldó szereket, különösen az amino-foszfátokat és etilén-diamin-diszukcinátokat, különböző agyag szennyeződést eltávolító szereket, különösen etoxilezett tetraetilén-pentamint, különböző diszpergálószeret, különösen poliakrilátokat és poliaszparátokat, különböző színélénkítő szereket, különösen anionos színélénkítő szereket, különböző habzsgátló szereket, különösen szilikonokat és szekunder alkoholokat, különböző kelmelágyító szereket, különösen smektit agyagokat és hasonlókat, körülbelül 1-35 tömeg% közötti mennyiségben mind alkalmazhatunk. Az ilyen hagyományos anyagok többszörös, részletes leírásait standard szövegek és nyilvánosságra hozott szabadalmi leírások tartalmazzák.

A találmány szerinti tisztító készítményekben enzim stabilizálószeret is alkalmazhatunk. Ilyen enzim stabilizálószer a propilén-glikol (előnyösen körülbelül 1-10 %), nátrium-formiát (előnyösen körülbelül 0,1-1 %) és kalcium-formiát (előnyösen körülbelül 0,1-1 %).

1. Kemény felületi tisztító készítmények

Jelen értelmezés szerint a „Kemény felület(et) tisztító készítmény” kemény felületek, például padozatok, falak, fürdőszobai csempe és hasonlók tisztítására szolgáló folyékony és granulált mosószer készítményeknek felel meg. A találmány szerinti kemény felület tisztító készítmények találmány szerinti, egy vagy több enzim variáns hatékony mennyiségét, előnyösen körülbe-



lül 0,0001-10 tömeg%, még előnyösebben körülbelül 0,1-5 tömeg%, még ennél is előnyösebben körülbelül 0,5-1 tömeg% készítménybeli aktív enzimet tartalmaznak. Az ilyen kemény felület tisztító készítmények azon kívül, hogy egy vagy több találmány szerinti enzimvariánst tartalmaznak, magukban foglalnak egy felületaktív anyagot és egy vízben oldható komplexképző szennylebegtetőt is. Bizonyos specializált termékekben, például a permetezősz ablaktisztítóknál, azonban néha nem alkalmazunk felületaktív anyagokat, mivel azok filmszerű/egyenetlen maradványt képezhetnek az üvegfelületen.

A találmány szerinti készítmények 0,1 % mennyiségű felületaktív anyagkomponenst tartalmazhatnak, amennyiben jelen van, azonban a készítmények jellemzően körülbelül 0,25-10 %, még előnyösebben körülbelül 1-5 % felületaktív anyagot tartalmaznak.

A készítmények jellemzően körülbelül 0,5-50 %, előnyösen körülbelül 1-10 % tisztító hatású szennylebegtetőt tartalmaznak.

A pH értéknek előnyösen körülbelül 8-12 közötti tartományban kell lennie. Hagyományos pH beállító szereket, például nátrium-hidroxidot, nátrium-karbonátot vagy sósav oldatot alkalmazhatunk a pH beállítására, amennyiben szükséges.

A készítmények tartalmazhatnak oldószereket. Alkalmazható oldószerek, bár az alkalmazható oldószerek nem korlátozódnak csak ezekre, a glikol-éterek, például dietilén-glikol-monohexil-éter, dietilén-glikol-monobutil-éter, etilén-glikol-monobutil-éter, etilén-glikol-monohexil-éter, propilén-glikol-monobutil-éter, dipropilén-glikol-monobutil-éter és diolok, például 2,2,4-trimetil-1,3-pentándiol és 2-etil-1,3-hexándiol. Alkalmazásuk



esetén az oldószerek jellemzően körülbelül 0,5-15 %, előnyösen körülbelül 3-11 % mennyiségben vannak jelen.

A találmány szerinti készítményekben, a készítménynek e felületről való gyorsabb elpárolgásának elősegítésére alkalmazhatunk továbbá nagyon illékony oldószereket, például izopropil-alkoholt vagy etanolt is, amikor a felületet a „teljes erősségű” készítmény alkalmazása után nem öblítjük le. Az illékony oldószerek – amennyiben a készítményekben alkalmazzuk azokat – jellemzően körülbelül 0,5-15 %, előnyösen körülbelül 3-11 % mennyiségben vannak jelen.

A találmány szerinti kemény felület tisztító készítmény megvalósítását a következő példákkal szemléltetjük.

7-12.példák

Folyékony, kemény felületi tisztító készítmények

Komponens	A minta száma					
	7	8	9	10	11	12
Lys213Glu	0,05	0,50	0,02	0,03	0,10	0,03
Ile205Leu + Ala216Asp	-	-	-	-	0,20	0,02
Na ₂ DIDA*						
EDTA**	-	-	2,90	2,90	-	-
nátrium-citrát	-	-	-	-	2,90	2,90
12 szénatomos alkil-benzolszulfonát-nátriumsó	1,95	-	1,95	-	1,95	-
12 szénatomos alkil-szulfát-nátriumsó	-	2,20	-	2,20	-	2,20

Nátrium-dodecil-szulfát	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Nátrium-hidroxid	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80
Szilikát (nátrium)	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Illatanyag	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
Víz	Kiegészítés 100 %-ra					

Termék pH érték körülbelül 7.

A 13-16.példákban többek között a 2.táblázatban ismertetett BPN' variánsokkal helyettesítjük Lys213Glu + Tyr217Leu-t, lényegében hasonló eredményekkel.

A 17-18.példákban többek között a 2.táblázatban ismertetett BPN' variánsokkal helyettesítjük Lys213Glu + Tyr217Leu-t és Ala216Glu-t, lényegében hasonló eredményekkel.

2. Mosogatószer készítmények

A találmány egy további megvalósításában a találmány szerinti egy vagy több enzimvariánst mosogatószer készítmények tartalmaznak. Jelen értelmezés szerint a „mosogatószer készítmény” edények tisztítására szolgáló készítmények minden formáját jelenti, beleértve a granulált és folyékony formákat, de nem korlátozódva ezekre. A találmány szerinti mosogatószer készítményeket a következő példákkal szemléltetjük.

19-24.példák

Mosogatószer készítmény

Komponens	A minta száma					
	19	20	21	22	23	24
Glu206Pro + Gly211Ala						
+ Ala216Glu	0,05	0,50	0,02	0,40	0,10	0,03

Ile205Leu + Ala216Asp	-	-	-	-	0,40	0,02
12-14 szénatomos N-metil-						
-glükamid	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90
12 szénatomos etoxi(1)-						
-szulfát	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00
2-metil-undekánsav	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50
12 szénatomos etoxi(2)-						
-karboxiolát	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50
12 szénatomos alkohol-						
-etoxilát (4)	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
12 szénatomos amin-oxid	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Nátrium-kumol-szulfonát	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Etanol	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Mg ⁺⁺ (magnézium-kloridként)	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Ca ⁺⁺ (kalcium-kloridként)	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Víz	Kiegészítés 100 %-ra					

Termék pH értékét 7-re állítjuk be.

A 19-22.példákban többek között a 2.táblázatban ismertetett BPN' variánsok bármilyen kombinációjával helyettesítjük Gly211Ala + Ala216Glu-t, lényegében hasonló eredményekkel.

A 23-24.példákban többek között a 2.táblázatban ismertetett BPN' variánskal helyettesítjük Gln206Pro + Gly211Ala + Ala216Glu-t és Ile205Leu + Ala216Asp-t, lényegében hasonló eredményekkel.

3. Kelmetisztító készítmények

A találmány másik megvalósításában a találmány szerinti egy vagy több enzimvariánst kelmetisztító készítmények tartalmazzák.

Jelen értelmezés szerint a „kelmetisztító készítmény” a kelmetisztításra szolgáló mindenféle formájú mosószer készítményt jelent, beleértve a granulált, folyékony és rúd formákat, de nem korlátozódva ezekre.

a. Granulált kelmetisztító készítmények

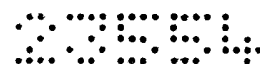
A találmány szerinti granulált kelmetisztító készítmények egy vagy több, találmány szerinti enzimvariáns hatékony mennyiségét, a készítmény tömegére előnyösen körülbelül 0,001-10 %, még előnyösebben körülbelül 0,005-5 %, még előnyösebben körülbelül 0,01-1% aktív enzimet tartalmaznak. A granulált kelmetisztító készítmények egy vagy több találmány szerinti enzimvariánson kívül jellemzően legalább egy felületaktív anyagot, egy vagy több szennylebegtetőt és néhány esetben egy fehérítőszert is tartalmaznak.

A találmány szerinti granulált kelmetisztítószer készítmény megvalósítását a következő példákkal szemléltetjük.

25-28.példák

Granulált kelmetisztító készítmény

Komponens	A minta száma			
	25	26	27	28
Ala216Asp	0,10	0,20	0,03	0,05
Ala216Gly	-	-	0,02	0,05
13 szénatomos lineáris alkil-				
-benzolszulfonát	22,00	22,00	22,00	22,00
Foszfát (nátrium-tripolifoszfát-				
ként)	23,00	23,00	23,00	23,00



Nátrium-karbonát	23,00	23,00	23,00	23,00
Nátrium-szilikát	14,00	14,00	14,00	14,00
Zeolit	8,20	8,20	8,20	8,20
Kelátképzőszer (dietylén-triamin- -pentaecetsav)	0,40	0,40	0,40	0,40
Nátrium-szulfát	5,50	5,50	5,50	5,50
Víz	Kiegészítés 100 %-ra			

A 25-26.példákban többek között a 2.táblázatban ismertetett BPN' variánsokkal helyettesítjük Ala216Asp-t, lényegében hasonló eredményekkel.

A 27-28.példákban többek között a 2.táblázatban ismertetett BPN' variánsok bármilyen kombinációjával helyettesítjük Ala216Asp + Ala216Glu-t, lényegében hasonló eredményekkel.

29-32.példák

Granulált kelmetisztító készítmény

Komponens	A minta száma			
	29	30	31	32
Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu	0,10	0,20	0,03	0,05
Ile205Val + Pro210Ala + Lys213Glu	-	-	0,02	0,05
12 szénatomos alkil-benzolszulfonát	12,00	12,00	12,00	12,00
Zeolite A (1-10 µm)	26,00	26,00	26,00	26,00
2-butyl-kaprilsav	4,00	4,00	4,00	4,00
12-14 szénatomos szekunder (2,3)- -alkil-szulfát nátriumsó	5,00	5,00	5,00	5,00
Optikai színélénkítőszer	0,10	0,10	0,10	0,10
Víz és egyéb alkotórészek	Kiegészítés 100 %-ra			

A 29-30.példákban többek között a 2.táblázatban ismertetett BPN' variánsokkal helyettesítjük Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu-t, lényegében hasonló eredményekkel.

A 31-32.példákban többek között a 2.táblázatban ismertetett BPN' variánsok bármilyen kombinációjával helyettesítjük Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu-t és Ile205Val +Pro210Ala + Lys213Glu-t, lényegében hasonló eredményekkel.

b. Folyékony kelmetisztító készítmények

A találmány szerinti folyékony kelmetisztító készítmények egy vagy több, találmány szerinti enzimvariáns hatékony mennyiségét, a készítmény tömegére előnyösen körülbelül 0,005-5 %, még előnyösebben körülbelül 0,01-1% aktív enzimet tartalmaznak. Az ilyen folyékony kelmetisztító készítmények továbbá jellemzően egy felületaktív anyagot, egy zsírsavat, egy vízben oldható tisztító hatású szennylebegtetők és vizet is tartalmaznak.

A találmány szerinti folyékony kelmetisztítószer készítmény megvalósítását a következő példákkal szemléltetjük.

33-37.példák

Folyékony kelmetisztító készítmények

Komponens	A minta száma				
	33	34	35	36	37
Pro210Ala + Gly215Thr	0,05	0,03	0,30	0,03	0,10
Pro210Ala + Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu	-	-	-	0,01	0,20
12-14 szénatomos alkil-szulfát nátriumsó	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00

2-butyl-kaprilsav	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Nátrium-citrát	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
10 szénatomos alkohol-etoxilát(3)	13,00	13,00	13,00	13,00	13,00
Monoetanol-amin	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
Víz/propilén-glikol/etil-alkohol(100:1:1)	Kiegészítés 100 %-ra				

A 33-35.példákban többek között a 2.táblázatban ismertetett BPN' variánsokkal helyettesítjük Pro210Ala + Gly215Tyr-t, lényegében hasonló eredményekkel.

A 36-37.példákban többek között a 2.táblázatban ismertetett BPN' variánsok bármilyen kombinációjával helyettesítjük Pro210Ala + Gly215 Tyr-t és Pro210Ala + Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu-t, lényegében hasonló eredményekkel.

c. Rúd alakú kelmetisztító készítmények

A szennyezett kelmék kézi mosására alkalmazható találmány szerinti rúd alakú kelmetisztító készítmények egy vagy több, találmány szerinti enzimvariáns hatékony mennyiségét, a készítmény tömegére előnyösen körülbelül 0,001-10 %, még előnyösebben körülbelül 0,01-1% aktív enzimet tartalmaznak.

A találmány rúd alakú kelmetisztítószer készítmény megvalósítását a következő példákkal szemléltetjük.

38-41.példák

Rúd alakú kelmetisztító készítmények

Komponens	A minta száma			
	38	39	40	41
Lys213Glu + Ala216Glu	0,3	-	0,1	0,02
Tyr214Phe +Tyr217Asn	-	-	0,4	0,03

12-16 szénatomos alkilszulfát-				
-nátriumsó	20,0	20,0	20,0	20,00
12-14 szénatomos N-metil-glükamid	5,0	5,0	5,0	5,00
11-13 szénatomos alkil-benzolszul-				
fonát-nátriumsó	10,0	10,0	10,0	10,00
Nátrium-karbonát	25,0	25,0	25,0	25,00
Nátrium-pirofoszfát	7,0	7,0	7,0	7,00
Nátrium-tripolifoszfát	7,0	7,0	7,0	7,00
Zeolite A (0,1-10 μ)	5,0	5,0	5,0	5,00
(Karboxi-metil)-cellulóz	0,2	0,2	0,2	0,20
Poliakrilát (molekulatömeg 1400)	0,2	0,2	0,2	0,20
Kókusz-monoetanol-amid	5,0	5,0	5,0	5,00
Színélénkítőszer, illatanyag	0,2	0,2	0,2	0,20
Kalcium-szulfát	1,0	1,0	1,0	1,00
Magnézium-szulfát	1,0	1,0	1,0	1,00
Víz	4,0	4,0	4,0	4,00
Töltőanyag*	Kiegészítés 100 %-ra			

*Kiválaszthatjuk hagyományos anyagokból, például kalcium-karbonátból, talkumból, agyagból, szilikátokból és hasonlókból.

A 38-39.példákban többek között a 2.táblázatban ismertetett BPN' variánsokkal helyettesítjük Lys213Glu + Ala216Glu-t, lényegében hasonló eredményekkel.

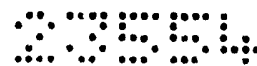
A40-41.példákban többek között a 2.táblázatban ismertetett BPN' variánsok bármilyen kombinációjával helyettesítjük Lys213Glu + Ala216Glu-t és Tyr214Phe+ Tyr217Asn-t, lényegében hasonló eredményekkel.

B. További tisztító készítmények

Az előzőekben tárgyalt kemény felületi tisztító, mosogató és kelmetisztító készítményeken kívül egy vagy több találmány szerinti enzimvariánst beletehetünk egy sor olyan egyéb tisztító készítménybe is, amelyeknél egy oldhatatlan szubsztrát hidrolízise kívánatos. Ilyen további tisztító készítmények a szájtisztító készítmények, műfogsor tisztító készítmények és kontaktlencse tisztító készítmények, azonban az ilyen készítmények nem korlátozódnak ezekre.

1. Szájtisztító készítmények

A találmány további megvalósításában egy vagy több, találmány szerinti enzimvariáns gyógyszerészetileg elfogadható mennyiségét, fogakról vagy műfogsorokról fehérjeszerű foltok eltávolítására használható készítményekben alkalmazzuk. Jelen értelmezés szerint a „szájtisztító készítmények” fogápolószereket, fogpasztákat, foggéleket, fogporokat, szájöblítőket, szájpermeteket, szájgéleket, rágógumikat, szögletes tablettákat, zacskókat, tablettákat, biogéleket, profilaktikus pasztákat, fogkezelő oldatokat és hasonlókat jelentenek. A találmány szerinti szájtisztító készítmények előnyösen körülbelül 0,0001-200 tömeg%, még előnyösebben körülbelül 0,001-10 tömeg%, még ennél is előnyösebben körülbelül 0,01-5 tömeg%, egy vagy több, találmány szerinti enzimvariánst és egy gyógyszerészetileg elfogadható hordozót tartalmaznak. Jelen értelmezés szerint a „gyógyszerészetileg elfogadható” azt jelenti, hogy azok a hatóanyagok, gyógyszerek vagy inert alkotórészek, amelyeket a kifejezés lefed, alkalmasak arra, hogy emberi és alacsonyabbrendű állati



szövetekkel érintkezve alkalmazzuk azokat anélkül, hogy toxikusak, összeférhetetlenek, labilisak, irritálóak lennének, allergiás választ és hasonlókat váltanának ki egy ésszerű előny/kockázat arányt figyelembevéve.

A szájtisztító készítmények szájtisztító komponenseinek gyógyszerészetileg elfogadható szájtisztító komponensei a készítménynek általában jellemzően körülbelül 50-99,99 tömeg%-át, előnyösen körülbelül 65-99,99 tömeg%-át, még előnyösebben körülbelül 65-99 tömeg%-át teszik ki.

A szakember számára jól ismertek azok a gyógyszerészetileg elfogadható hordozó komponensek és adott esetben alkalmazható komponensek, amelyeket a találmány szerinti szájtisztító készítményekben alkalmazhatunk. Az orális tisztító készítményekben alkalmazható készítmény típusok, hordozó komponensek és adott esetben alkalmazható komponensek széles választékát közlik az U.S.P. 5 096 700 számú (Seibel); U.S.P. 5 028 414 számú (Sam-pathkumar) és U.S.P. 5 028 415 számú (Benedict, Bush és Sunberg) szabadalmi iratokban, amelyeket mind hivatkozásként tekintünk a leírásban.

A találmány szerinti szájtisztító készítmények megvalósítását a következő példákkal szemléltetjük.



42-45.példák

Fogápolószer készítmény

Komponens	A minta száma			
	42	43	44	41
Ile205Leu + Pro210Ala + Lys213Glu+				
+ Ala216Glu + Tyr217Leu	2,000	3,500	1,500	2,000
Szorbit (70 %-os vizes oldat)	35,000	35,000	35,000	35,000
PEG-6*	1,000	1,000	1,000	1,000
Szilícium-dioxid fogdörzsölő- szer**	20,000	20,000	20,000	20,000
Nátrium-fluorid	0,243	0,243	0,243	0,243
Titán-dioxid	0,500	0,500	0,500	0,500
Szaccharin nátriumsó	0,286	0,286	0,286	0,286
Alkil-szulfát nátriumsó (27,9%-os vizes oldat)	4,000	4,000	4,000	4,000
Ízesítőszer	1,040	1,040	1,040	1,040
Karboxi-vinil polimer***	0.300	0.300	0.300	0.300
Izlandi moha****	0,800	0,800	0,800	0,800
Víz	Kiegészítés 100 %-ra			

*PEG-6 = 600 molekulatömegű polietilén-glikol.

**Zeodent 119-ként azonosított, J.M. Huber által ajánlott kicsapatott szilícium-dioxid.

***B.F. Goodrich Chemical Company által ajánlott Carbopol.

****Hercules Chemical Company által ajánlott Iota Carrageenan.

A 42-45.példákban többek között a 2.táblázatban ismertetett BPN' variánsokkal helyettesítjük Ile205Leu + Pro210Ala + Lys213Glu + Ala216Glu-t, lényegében hasonló eredményekkel.

46-49.példák

Szájöblítőszer készítmény

Komponens	A minta száma			
	46	47	48	49
Ala216Gly	3,00	7,50	1,00	5,00
SDA 40 alkohol	8,00	8,00	8,00	8,00
Ízesítőszer	0,08	0,08	0,08	0,08
Emulgeálószer	0,08	0,08	0,08	0,08
Nátrium-fluorid	0,05	0,05	0,05	0,05
Glicerín	10,00	10,00	10,00	10,00
Édesítőszer	0,02	0,02	0,02	0,02
Benzoésav	0,05	0,05	0,05	0,05
Nátrium-hidroxid	0,02	0,02	0,02	0,02
Festék	0,04	0,04	0,04	0,04
Víz	Kiegészítés 100 %-ra			

A 46-49.példákban többek között a 2.táblázatban ismertetett BPN' variánsokkal helyettesítjük Ala216Gly-t, lényegében hasonló eredményekkel.

50-53.példák

Négyszögletes tabletták készítmény

Komponens	A minta száma			
	50	51	52	53
Tyr214Phe + Tyr217Asn	0,01	0,03	0,10	0,02
Szorbit	17,50	17,50	17,50	17,50
Mannit	17,50	17,50	17,50	17,50

Keményítő	13,60	13,60	13,60	13,60
Édesítőszer	1,20	1,20	1,20	1,20
Ízesítőszer	11,70	11,70	11,70	11,70
Színezék	0,10	0,10	0,10	0,10
Kukoricaszirup	Kiegyenlítés 100 %-ra			

Az 50-53.példákban többek között a 2.táblázatban ismertetett BPN' variánsokkal helyettesítjük Tyr214Phe + Tyr217Asn-t, lényegében hasonló eredményekkel.

54-57. példák

Rágógumi készítmény

Komponens	A minta száma			
	54	55	56	57
Ile205Val + Pro210Ala + Lys213Glu	0,03	0,02	0,10	0,05
Szorbit kristályok	38,44	38,40	38,40	38,40
Paloja-T gumi alapanyag*	20,00	20,00	20,00	20,00
Szorbit (70 %-os oldat)	22,00	22,00	22,00	22,00
Mannit	10,00	10,00	10,00	10,00
Glicerín	7,56	7,56	7,56	7,56
Ízesítőszer	1,00	1,00	1,00	1,00

*L.A. Dreyfus Company-tól.

Az 54-57.példákban többek között a 2.táblázatban ismertetett BPN' variánsokkal helyettesítjük Ile205Val + Pro210Ala + Lys213Glu-t, lényegében hasonló eredményekkel.

2. Műfogsortisztító készítmények

A találmány egy még további megvalósításában egy vagy több találmány szerinti enzimvariánst műfogsorok szájüregen kívüli tisztítására szolgáló fogsortisztító készítményekben alkalmazunk. Az ilyen fogsortisztító készítmények egy vagy több találmány szerinti enzimvariáns hatékony mennyiségét, a készítménynek előnyösen körülbelül 0,0001-50 tömeg%-át, még előnyösebben 0,001-35 tömeg%-át, még ennél is előnyösebben körülbelül 0,01-20 tömeg%-át tartalmazzák. A technika állásában jól ismertek különböző fogsortisztító készítmény formátumok, például pezsgőtabletták és hasonlók [lásd például az U.S.P. 5 055 305 számú (Young) szabadalmi iratban, amelyet a leírásban hivatkozásként tekintünk], és ezek általában alkalmasak arra, hogy a fogsorokról fehérjeszerű foltok eltávolítására egy vagy több, találmány szerinti enzimvariánst beletegyünk.

A találmány szerinti fogsortisztító készítmény megvalósítását a következő példákkal szemléltetjük.

58-61.példák

Kétrétegű fogsortisztító pezsgőtabletta

Komponens	A minta száma			
	58	59	60	61
Savas réteg				
Ala216Glu	1,0	1,5	0,01	0,05
Borkősav	24,0	24,0	24,0	24,00
Nátrium-karbonát	4,0	4,0	4,0	4,00
Szulfaminsav	10,0	10,0	10,0	10,00

PEG 20,000	4,0	4,0	4,0	4,00
Nátrium-hidrogén-karbonát	24,5	24,5	24,5	24,50
Kálium-perszulfát	15,0	15,0	15,0	15,00
Savas nátrium-pirofoszfát	7,0	7,0	7,0	7,00
Pirogén szilícium-dioxid	2,0	2,0	2,0	2,00
TAED*	7,0	7,0	7,0	7,00
Ricinol-szulfo-szukcinát	0,5	0,5	0,5	0,50
Ízesítőszer	1,0	1,0	1,0	1,00
Lúgos réteg				
Nátrium-perborát-víz (1/1)	32,0	32,0	32,0	32,00
Nátrium-hidrogén-karbonát	19,0	19,0	19,0	19,00
EDTA	3,0	3,0	3,0	3,00
Nátrium-tripolifoszfát	12,0	12,0	12,0	12,00
PEG 20,000	2,0	2,0	2,0	2,00
Nátrium-perszulfát	26,0	26,0	26,0	26,00
Nátrium-karbonát	2,0	2,0	2,0	2,00
Pirogén szilícium-dioxid	2,0	2,0	2,0	2,00
Festék/ízesítőszer	2,0	2,0	2,0	2,00

*Tetraacetil-etilén-diamin.

Az 58-61.példákban többek között a 2.táblázatban ismertetett BPN' variánsokkal helyettesítjük Ala216Glu-t, lényegében hasonló eredményekkel.

3. Kontaktlencse-tisztító készítmények

A találmány egy másik további megvalósításában kontaktlencse-tisztító készítmények a találmány szerinti egy vagy több enzimvariánst tartalmaznak. Az ilyen kontaktlencse-tisztító készítmények egy vagy több, találmány szerinti enzimvariáns haté-

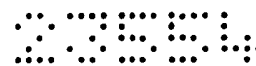
kony mennyiségét, a készítmény tömegére előnyösen körülbelül 0,01-50 %-ot, még előnyösebben körülbelül 0,01-20 %-ot, még ennél is előnyösebben körülbelül 1-5 %-ot és egy kontaktlencse-tisztító hordozót tartalmaznak. A technika állásában különböző kontaktlencse-tisztító készítmény formátumok, például tabletták, folyadékok és hasonlóak jól ismertek [lásd például az U.S.P. 4 863 627 számú (Davies, Meaken és Rees); U.S.P. Re. 32 672 számú (Huth, Lam és Kirai; U.S.P. 4 609 493 számú (Schäfer); U.S.P. 4 690 793 számú (Ogunbiyi és Smith); U.S.P. 4 614 549 számú (Ogunbiyi, Riedhammer és Smith) és U.S.P. 4 285 738 számú (Ogata) szabadalmi iratokat; amelyek mindegyikét hivatkozásként tekintjük a leírásban], és ezek általában megfelelőek arra, hogy a kontaktlencséről fehérjeszerű foltok eltávolítására egy vagy több, találmány szerinti enzimvariánst tegyünk bele.

A találmány szerinti kontaktlencse-tisztító készítmény megvalósítását a következő példákkal szemléltetjük.

62-65. példák

Enzimes kontaktlencse-tisztító oldat

Komponens	A minta száma			
	62	63	64	65
Ile205Leu + Ala216Asp	0,01	0,5	0,1	2,0
Glükóz	50,00	50,0	50,0	50,0
Nemionos felületaktív anyag (poli- oxi-etilén-polioxi-propilén kopolimer)	2,00	2,0	2,0	2,0



Anionos felületaktív anyag (poli- oxi-etilén-alkil-fenil-éter nátrium-szulfát-észter)	1,00	1,0	1,0	1,0
Nátrium-klorid	1,00	1,0	1,0	1,0
Borax	0,30	0,3	0,3	0,3
Víz	Kiegészítés 100 %-ra			

A 62-65.példákban többek között a 2.táblázatban ismertetett BPN' variánsokkal helyettesítjük Ile205Leu + Ala216Asp-t, lényegében hasonló eredményekkel.

Míg a találmány tárgyát jellemző megvalósításai leírják, nyilvánvaló, hogy a szakemberek a találmány tárgyán különböző változtatásokat és módosításokat végezhetnek anélkül, hogy eltérnének a találmány szellemétől és oltalmi körétől. A csatolt szabadalmi igénypontokkal szándékozunk lefedni az összes ilyen módosítást, amelyek a találmány oltalmi körén belül vannak.

SZEKVENCIA LISTÁK

Az 1. számú szekvencia adatai:

(i) Szekvencia jellemzők:

(A) Hosszúság: 275 aminosav

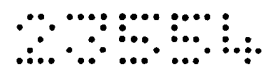
(B) típus: aminosav

(D) Topológia: lineáris

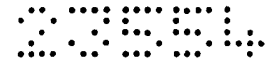
(ii) Molekulatípus: fehérje

(xi) Szekvencia leírás: 1. számú szekvencia:

Ala	Gln	Ser	Val	Pro	Tyr	Gly	Val	Ser	Gln	Ile	Lys	Ala	Pro	Ala	Leu
1			5					10					15		
His	Ser	Gln	Gly	Tyr	Thr	Gly	Ser	Asn	Val	Lys	Val	Ala	Val	Ile	Asp
		20					25					30			
Ser	Gly	Ile	Asp	Ser	Ser	His	Pro	Asp	Leu	Lys	Val	Ala	Gly	Gly	Ala
	35					40						45			
Ser	Met	Val	Pro	Ser	Glu	Thr	Asn	Pro	Phe	Gln	Asp	Asn	Asn	Ser	His
	50					55					60				
Gly	Thr	His	Val	Ala	Gly	Thr	Val	Ala	Ala	Leu	Asn	Asn	Ser	Ile	Gly
65					70					75					80
Val	Leu	Gly	Val	Ala	Pro	Ser	Ala	Ser	Leu	Tyr	Ala	Val	Lys	Val	Leu
				85					90					95	
Gly	Ala	Asp	Gly	Ser	Gly	Gln	Tyr	Ser	Trp	Ile	Ile	Asn	Gly	Ile	Glu
			100					105					110		
Trp	Ala	Ile	Ala	Asn	Asn	Met	Asp	Val	Ile	Asn	Met	Ser	Leu	Gly	Gly
		115					120					125			
Pro	Ser	Gly	Ser	Ala	Ala	Leu	Lys	Ala	Ala	Val	Asp	Lys	Ala	Val	Ala
		130				135					140				
Ser	Gly	Val	Val	Val	Val	Ala	Ala	Ala	Glu	Asn	Glu	Gly	Thr	Ser	Gly
145					150					155					160
Ser	Ser	Ser	Thr	Val	Gly	Tyr	Pro	Gly	Lys	Tyr	Pro	Ser	Val	Ile	Ala
				165					170					175	
Val	Gly	Ala	Val	Asp	Ser	Ser	Asn	Gln	Arg	Ala	Ser	Phe	Ser	Ser	Val
			180					185						190	



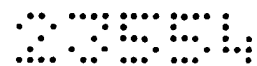
Gly Pro Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr
 195 200 205
 Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser
 210 215 220
 Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn
 225 230 235 240
 Trp Thr Asn Thr Gln Val Arg Ser Ser Leu Glu Asn Thr Thr Thr Lys
 245 250 255
 Leu Gly Asp Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala
 260 265 270
 Ala Ala Gln
 275



S Z A B A D A L M I I G É N Y P O N T O K

1. Egy vad típusú aminosavszekvenciát tartalmazó BPN' variáns, amelyben a vad típusú aminosavszekvencia a 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 218, 219 vagy 220 helyek közül egy vagy több helyen szubsztituált, ahol

- a) a szubsztituáló aminosav a 199 helyre Cys, Ala, His, Thr, Pro Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu;
- b) a szubsztituáló aminosav a 200 helyre His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu;
- c) a szubsztituáló aminosav a 201 helyre Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu;
- d) a szubsztituáló aminosav a 202 helyre Pro, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu;
- e) a szubsztituáló aminosav a 203 helyre Met, Cys, His, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu;
- f) a szubsztituáló aminosav a 204 helyre Glu;
- g) a szubsztituáló aminosav a 205 helyre Leu, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu;
- h) a szubsztituáló aminosav a 206 helyre Pro, Asn vagy Ser;
- i) a szubsztituáló aminosav a 207 helyre Asp vagy Glu;
- j) a szubsztituáló aminosav a 208 helyre Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu;
- k) a szubsztituáló aminosav a 209 helyre Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu;
- l) a szubsztituáló aminosav a 210 helyre Gly, Gln, Asn, Ser,



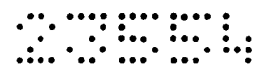
Asp vagy Glu;

- m) a szubsztituálós aminosav a 211 helyre Ala, Pro, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu;
- n) a szubsztituálós aminosav a 212 helyre Gln, Ser, Asp vagy Glu;
- o) a szubsztituálós aminosav a 213 helyre Trp, Phe, Tyr, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu;
- p) a szubsztituálós aminosav a 214 helyre Phe, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Pro, Gly, Gln, Asn, Asp vagy Glu;
- q) a szubsztituálós aminosav a 215 helyre Thr, Pro, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu;
- r) a szubsztituálós aminosav a 216 helyre His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu;
- s) a szubsztituálós aminosav a 218 helyre Glu;
- t) a szubsztituálós aminosav a 219 helyre Pro, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu; és
- u) a szubsztituálós aminosav a 220 helyre Pro, Gly, Gln, Asn, Asp vagy Glu;

azzal jellemezve, hogy a vad típusú szubtilizin BPN'-hez viszonyítva a BPN' variáns egy oldhatatlan szubsztrátra csökkentett adszorpciójú és megnövelt hidrolizáló képességű.

2. Az 1.igénypont szerinti BPN' variáns, azzal jellemezve, hogy

- a) a szubsztituálós aminosav a 206 helyre Asn vagy Ser;
- b) a szubsztituálós aminosav a 211 helyre Pro, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu;



c) a szubsztituáló aminosav a 214 helyre Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Pro, Gly, Gln, Asn, Asp vagy Glu; és

d) a szubsztituáló aminosav a 215 helyre Pro, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu.

3. A 2.igénypont szerinti BPN' variáns, azzal jellemezve, hogy a 216 helyen Gly-t tartalmaz Ala helyett.

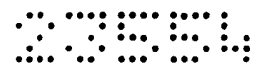
4. A 2.igénypont szerinti BPN' variáns, azzal jellemezve, hogy a 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 219 vagy 220 helyek bármelyikén a szubsztituáló aminosav Asp vagy Glu.

5. Az 1.igénypont szerinti, egyetlen aminosav szubsztitúcióval rendelkező BPN' variáns, azzal jellemezve, hogy a szubsztitúció:

- a) Glu a 213 helyen Lys helyett,
- b) Glu a 216 helyen Ala helyett,
- c) Asp a 216 helyen Ala helyett,
- d) Glu a 204 helyen Ser helyett vagy
- e) Glu a 203 helyen Val helyett.

6. Egy vad típusú aminosavszekvenciát tartalmazó BPN' variáns, azzal jellemezve, hogy a természetes aminosavszekvencia a 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219 vagy 220 helyek közül egy vagy több helyen szubsztituált, ahol

- a) a szubsztituáló aminosav a 199. helyre Cys, Ala, His, Thr, Pro Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu;
- b) a szubsztituáló aminosav a 200. helyre His, Thr, Pro Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu;



- c) a szubsztituálós aminosav a 201. helyre Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu;
- d) a szubsztituálós aminosav a 202. helyre Pro, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu;
- e) a szubsztituálós aminosav a 203. helyre Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu;
- f) a szubsztituálós aminosav a 204. helyre Asp vagy Glu;
- g) a szubsztituálós aminosav a 205. helyre Leu, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu;
- h) a szubsztituálós aminosav a 206. helyre Pro, Asn, Ser, Asp vagy Glu;
- i) a szubsztituálós aminosav a 207. helyre Asp vagy Glu;
- j) a szubsztituálós aminosav a 208. helyre Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu;
- k) a szubsztituálós aminosav a 209. helyre Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu;
- l) a szubsztituálós aminosav a 210. helyre Ala, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu;
- m) a szubsztituálós aminosav a 211. helyre Ala, Pro, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu;
- n) a szubsztituálós aminosav a 212. helyre Gln, Ser, Asp vagy Glu;
- o) a szubsztituálós aminosav a 213. helyre Trp, Phe, Tyr, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu;



- p) a szubsztituálós aminosav a 214. helyre Phe, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu;
- q) a szubsztituálós aminosav a 215. helyre Thr, Pro, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu;
- r) a szubsztituálós aminosav a 216. helyre His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu;
- s) a szubsztituálós aminosav a 217. helyre Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu;
- t) a szubsztituálós aminosav a 218. helyre Gln, Ser, Asp vagy Glu;
- u) a szubsztituálós aminosav a 219. helyre Pro, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu; és
- v) a szubsztituálós aminosav a 220. helyre Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp vagy Glu;

azzal jellemezve, hogy a vad típusú szubtilizin BPN'-hez viszonyítva a BPN' variáns egy oldhatatlan szubsztrátra csökkentett adszorpciójú és megnövekedett hidrolizáló képességű.

7. Egy kettős aminosav szubsztitúciójú, 6.igénypont szerinti BPN' variáns.

8. Egy 7.igénypont szerinti kettős aminosav szubsztitúciójú BPN' variáns, azzal jellemezve, hogy a kettős szubsztitúció:

- a) Pro helyett a 210 helyen Ala és Gly helyett a 215 helyen Thr;
- b) Tyr helyett a 214 helyen Phe és Tyr helyett a 217 helyen Asn;



- c) Gln helyett a 206 helyen Glu és Ala helyett a 216 helyen
Glu;
- d) Ala helyett a 216 helyen Glu és Tyr helyett a 217 helyen
Leu;
- e) Gln helyett a 206 helyen Glu és Tyr helyett a 217 helyen
Leu;
- f) Gln helyett a 206 helyen Glu és Lys helyett a 213 helyen
Glu;
- g) Lys helyett a 213 helyen Glu és Tyr helyett a 217 helyen
Leu;
- h) Ile helyett a 205 helyen Leu és Ala helyett a 216 helyen
Glu; vagy
- i) Ile helyett a 205 helyen Leu és Ala helyett a 216 helyen
Asp.

9. Egy 7.igénypont szerinti BPN' variáns, azzal jellemezve,
hogy

- a) a szubsztituáló aminosav a 206. helyre Asn vagy Ser;
- b) a szubsztituáló aminosav a 210. helyre Gly, Gln, Asn,
Ser, Asp vagy Glu;
- c) a szubsztituáló aminosav a 211. helyre Pro, Gln, Asn,
Ser, Asp vagy Glu;
- d) a szubsztituáló aminosav a 214. helyre Leu, Ile, Val, Met,
Cys, Ala, His, Pro, Gly, Gln, Asn, Asp vagy Glu; és
- e) a szubsztituáló aminosav a 215. helyre Pro, Gln, Asn,
Ser, Asp vagy Glu;

és egy szubsztitúció előnyösen a 199, 200, 201, 202, 205,
207, 208, 209, 210, 211, 212 vagy 215 helyek közül egy vagy több



helyen, még előnyösebben a 200, 201, 202, 205 vagy 207 helyek közül egy vagy több helyen fordul elő.

10. Egy 9.igénypont szerinti BPN' variáns, azzal jellemezve, hogy a 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219 vagy 220 helyek bármelyikére a szubsztituáló aminosav Asp vagy Glu.

11. Egy 10. igénypont szerinti BPN' variáns, azzal jellemezve, hogy Lys-t a 213 helyen Glu helyettesíti és Ala-t a 216 helyen Glu helyettesíti.

12. Egy 6.igénypont szerinti, háromszoros aminosav szubsztitúciót tartalmazó BPN' variáns.

13. Egy 12.igénypont szerinti, háromszoros aminosav szubsztitúciót tartalmazó BPN' variáns, azzal jellemezve, hogy a háromszoros szubsztitúció:

- a) Gln helyett a 206 helyen Pro, Gly helyett a 211 helyen Ala és Ala helyett a 216 helyen Glu;
- b) Ile helyett a 205 helyen Val, Pro helyett a 210 helyen Ala és Lys helyett a 213 helyen Glu;
- c) Gln helyett a 206 helyen Glu, Ala helyett a 216 helyen Glu és Tyr helyett a 217 helyen Leu;
- d) Gln helyett a 206 helyen Glu, Lys helyett a 213 helyen Glu és Tyr helyett a 217 helyen Leu;
- e) Lys helyett a 213 helyen Glu, Ala helyett a 216 helyen Glu és Tyr helyett a 217 helyen Leu.

14. Egy 6.igénypont szerinti, négy vagy öt aminosav szubsztitúciót tartalmazó BPN' variáns.

15. Egy 14.igénypont szerinti, négy aminosav szubsztitúciót



tartalmazó BPN' variáns, azzal jellemezve, hogy a négy szubsztitúció:

- a) Pro helyett a 210 helyen Ala, Lys helyett a 213 helyen Glu, Ala helyett a 216 helyen Glu és Tyr helyett a 217 helyen Leu;
- b) Gln helyett a 210 helyen Glu, Lys helyett a 213 helyen Glu, Ala helyett a 216 helyen Glu és Tyr helyett a 217 helyen Leu;
- c) Ser helyett a 204 helyen Glu, Gln helyett a 206 helyen Glu, Ala helyett a 216 helyen Glu és Tyr helyett a 217 helyen Leu.

16. Egy 14.igénypont szerinti, öt szubsztitúciót tartalmazó BPN' variáns, azzal jellemezve, hogy az öt szubsztitúció:

- a) Ile helyett a 205 helyen Leu, Pro helyett a 210 helyen Ala, Lys helyett a 213 helyen Glu, Ala helyett a 216 helyen Glu és Tyr helyett a 217 helyen Leu; vagy
- b) Ser helyett a 204 helyen Glu, Gln helyett a 206 helyen Glu, Lys helyett a 213 helyen Glu, Ala helyett a 216 helyen Glu és Tyr helyett a 217 helyen Leu.

17. Egy kemény felület tisztító készítményből, mosogatószer készítményből és szájtisztító készítményből, műfogsor tisztító készítményből és kontaktlencse tisztító készítményből álló csoportból kiválasztott tisztító készítmény, azzal jellemezve, hogy a tisztító készítmény az 1., 7., 12. vagy 14.igénypont szerinti BPN' variánst és egy tisztító készítmény hordozót tartalmaz.

18. Egy 1., 7., 12. vagy 14.igénypont szerinti BPN' variánst és egy kemény felület tisztítószer hordozót tartalmazó kemény



felület tisztító készítmény.

19. Egy 1., 7., 12. vagy 14.igénypont szerinti BPN' variánst kódoló mutáns BPN' gén.

A meghatalmazott:

ábra mellül
59 old.
László

Beliczay László
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-430. Fax: 34-24-323