PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:
2000 - 1493

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7]:
C 12 N 15/57
C 12 N 9/54
C 11 D 3/386
A 23 K 1/165

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **23.10.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **23.10.1997 23.10.1997 23.10.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/956323 1997/956324 1997/956564**

(33) Země priority: **US US US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.11.2001**
(Věstník č. 11/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/US98/22590**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/20771**

(71) Přihlašovatel:
GENENCOR INTERNATIONAL, INC., Palo Alto, CA, US;

(72) Původce:
Poulose Ayrookaran J., Belmont, CA, US;
Schellenberger Volker, Burlingame, CA, US;
Kellis James T. Jr., Portola Valley, CA, US;
Paech Christian, Palo Alto, CA, US;
Nadherny Joanne, San Francisco, CA, US;
Naki Donald P., San Francisco, CA, US;
Caldwell Robert M., Redwood City, CA, US;
Collier Katherine D., Redwood City, CA, US;

(74) Zástupce:
Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Vícenásobně substituované varianty proteáz se změněným nábojemm, které je možné použít jako detergenty

(57) Anotace:

Popisují se nové proteázové varianty získané ze sekvencí DNA přirozeně se vyskytujících nebo rekombinantních proteáz, které nepochází z člověka. Varianty proteáz se v obecném případě získaly modifikací in vitro prekurzorové sekvence DNA kódující přirozeně se vyskytující nebo rekombinantní proteázu, aby došlo k substituci velkého množství aminokyselinových zbytků v aminokyselinové sekvenci prekurzorové proteázy. Připravují se varianty proteáz, které obsahují substituce aminokyselin v jedné nebo více polohách tak, že substituce mění náboj v této poloze tak, aby byl více negativní nebo méně pozitivní ve srovnání s prekurzorovou proteázou a tak proteázová varianta ve srovnání s prekurzorovou proteázou je více účinná v systému s nízkou koncentrací detergentu. Popisují se také varianty proteáz obsahující substituce aminokyselin v jedné nebo více polohách zbytků tak, že substituce mění náboj v uvedené poloze tak, že se stává více pozitivní nebo méně negativní ve srovnání s prekurzorovou proteázou a tak varianta proteázy je účinnější v systému s vysokou koncentrací detergentu ve srovnání s prekurzorovou proteázou.

CZ 2000 - 1493 A3

03.07.00
PV 2000-1493
98644

Vícenásobně substituované varianty proteáz se změněným nábojem, které je možné použít jako detergenty

Oblast techniky

Serinové proteázy jsou podskupiny karbonylových hydroláz. Obsahují diverzní skupinu enzymů, které vykazují široké rozmezí specifit a biologických funkcí (popisuje se v publikaci Stroud, R. Sci. Amer., 131: 74-88). Navzdory jejich funkční diverzitě katalitického mechanizmu serinových proteáz se dosáhlo alespoň u dvou geneticky odlišných rodin enzymů: 1) subtilizíny a 2) serinové proteázy příbuzné savčímu chymotrypsinu a homologní bakteriální serinové proteázy (například trypsin a trypsin *S. gresius*). Tyto dvě rodiny serinových proteáz vykazují značně stejné mechanizmy katalýzy (popisuje se v publikaci Kraut, J. (1977), Annu. Rev. Biochem., 46: 331-358. Dále, ačkoli proteázy nemají příbuznou primární strukturu, terciální struktura těchto dvou enzymatických rodin tvoří konzervativní katalytickou triádu aminokyselin, které obsahují serin, histidin a aspartát.

Subtilizíny jsou serinové proteázy (s přibližnou molekulovou hmotností 27 500), které se vylučují ve velkém množství z širokého rozmezí druhů *Bacillus* a jiných mikroorganizmů. Proteinová sekvence subtilizínu se stanovila alespoň z devíti různých druhů *Bacillus* (Markand, F. S., et al., (1983), Hoppe-Seyler´s Z. Physiol. Chem. 364: 1537-1540). V literatuře se zmiňuje trojrozměrná krystalografická struktura subtilizínů z mikroorganizmu *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* a několik přirozených variant mikroorganizmu *B. lentus*. Tyto studie ukazují, že ačkoli subtilizín není geneticky příbuzný se savčími serinovými proteázami, vykazuje podobnou aktivní místní strukturu. Analýza krystalických struktur subtilizínu pomocí X-záření, přičemž subtilizín obsahuje kovalentně vázané peptidové inhibitory (popisuje se v publikaci Robertus, J. D.,

03.07.00

et al., (1972), Biochemistry, 11: 2439-2449) nebo komplexy produktů (popisuje se v publikaci Robertus, J. D. et al., (1976), J. Biol. Chem. 251: 1097-1103), poskytuje také informace o aktivním místě a putativním vazebném štěpení substrátu subtilizínu. Publikuje se velké množství studií kinetických a chemických úprav molekul (popisuje se v publikaci Svedsen, B., (1976) Cerlsberg Res. Commun., 41: 237-291, Markland, F. S. Id.) a existuje alespoň jedna zpráva, kde vedlejší řetězec methioninu subtilizínu s 222 zbytky se přeměnil peroxidem vodíku na methioninsulfoxid (popisuje se v publikaci Stauffer, D. C., et al., (1965), J. Biol. Chem., 244: 5333-5338) a provedla se rozsáhlá místně specifická mutageneze (Wells and Estell (1988) TIBS 13: 291-297).

Běžným problémem vývoje proteázové varianty vhodné pro použití v detergentové formulaci jsou různé podmínky promytí zahrnující různé detergentové formulace, kde se mohou použít proteázová varianty. Detergentové formulace užívané v různých oblastech mají různé koncentrace různých relevantních komponent přítomných v promývací vodě. Například Evropský detergentový systém v typickém případě obsahuje přibližně 4 500 až 5 000 ppm detergentových komponentů v prací vodě, zatímco Japonský detergentový systém v typickém případě obsahuje v prací vodě přibližně 667 ppm detergentových komponentů. V Severní Americe, zvláště pak ve Spojených státech, vykazuje detergentový systém v prací vodě přibližně 975 ppm detergentových komponentů. Překvapivě, se vyvinul způsob detailního projektu varianty proteáz vhodné pro použití v systému s nízkou koncentrací detergentu, systému s vysokou koncentrací detergentu a/nebo systému se střední koncentrací detergentu, stejně jako ve všech třech typech systému koncentrací detergentu.

Podstata vynálezu

03.07.00

Vynález popisuje proteázové varianty obsahující substituce aminokyselin v jedné nebo ve více pozicích zbytků tak, že substituce mění náboj v této poloze na více negativní nebo méně pozitivní ve srovnání prekurzorovou proteázou a tak proteázová varianta je více účinná v systému s nízkou koncentrací detergentu ve srovnání s prekurzorovou proteázou. Systém s nízkou koncentrací detergentu je promývací systém, který obsahuje méně než přibližně 800 ppm komponentů detergentu přítomných v prací vodě.

Dále vynález popisuje proteázové varianty obsahující substituce aminokyselin v polohách jednoho nebo více zbytků tak, že substituce mění náboj v této poloze tak, že náboj je více pozitivní nebo méně negativní ve srovnání s prekurzorovou proteázou a tak proteázová varianta je více účinná v systému s vysokou koncentrací detergentu ve srovnání s prekurzorovou proteázou. Systém s vysokou koncentrací detergentu je promývací systém, který má obsah detergentových komponentů vyšší než přibližně 2 000 ppm detergentových komponent přítomných v prací vodě.

Dále vynález popisuje proteázové varianty obsahující substituce aminokyselin v jedné nebo více polohách zbytků, které mění náboj v této poloze tak, že je více pozitivní nebo méně negativní ve srovnání s prekurzorovou proteázou, což znamená, že proteázová varianta je více účinná v systému se střední koncentrací detergentu ve srovnání s prekurzorovou proteázou. Systém se střední koncentrací detergentu je systém, který obsahuje v prací vodě přibližně 800 ppm až 2 000 ppm detergentových komponentů.

Vynález dále popisuje proteázové varianty obsahující substituce aminokyselin v polohách jednoho nebo více zbytků tak, že substituce mění náboj v této poloze tak, že náboj je více negativní nebo méně pozitivní ve srovnání s prekurzorovou proteázou a tak proteázová varianta je více účinná v systému se střední koncentrací detergentu ve srovnání prekurzorovou

03.07.00

proteázou. Systém se střední koncentrací detergentu je promývací systém, který obsahuje v prací vodě přibližně 800 ppm až přibližně 2 000 ppm detergentových komponentů.

Dále vynález popisuje sekvence DNA kódující takové proteázové varianty, stejně jako expresívní vektory obsahující takové varianty sekvencí DNA.

Vynález dále popisuje hostitelské buňky transformované takovými vektory, stejně jako hostitelské buňky, které jsou schopny exprimovat takovou DNA, aby se produkovaly proteázové varianty buď uvnitř buňky nebo vně buňky.

Dále vynález popisuje čistící kompozici obsahující proteázovou variantu podle vynálezu.

Navíc se popisuje krmení pro zvířata obsahující proteázovou variantu podle vynálezu.

Dále se popisuje kompozice vhodná pro ošetření textilií obsahující proteázovou variantu podle vynálezu.

Dále se popisuje způsob produkce proteázové varianty, která je více účinná v systému nízké, střední a vysoké koncentrace detergentu ve srovnání s prekurzorovou proteázou, která zahrnuje:

a) substituci aminokyseliny v jedné nebo více polohách zbytků, kde substituce mění náboj v této poloze tak, že činí náboj více pozitivní nebo méně negativní ve srovnání s prekurzorovou proteázou,

b) substituce aminokyseliny v jedné nebo více poloh zbytků, kde substituce mění náboj v této poloze tak, že činí náboj více negativní nebo méně pozitivní ve srovnání s prekurzorovou proteázou,

c) testovaní varianty pro stanovení její účinnosti v systému vysoké, střední a nízké koncentrace detergentu ve srovnání s prekurzorovou proteázou a

d) opakování kroků popsaných v odstavci a) až c), které jsou nezbytné k produkci proteázové varianty, která je více účinná v systému s nízkou, střední a vysokou koncentrací

03.07.00

detergentu ve srovnání s prekurzorovou proteázou, přičemž kroky a) až b) se mohou provést v libovolném pořadí.

Jak se uvádí shora v textu, jistá zeměpisná místa vykazují jisté podmínky praní a různé typy detergentů. Například v Japonsku používají systém s nízkou koncentrací detergentu, zatímco v Evropě používají systém s vysokou koncentrací detergentu. Jak se diskutuje shora v textu ve Spojených státech se používá systém se střední koncentrací detergentu. Zjistilo se, že různé proteázové varianty působí v těchto různých detergentových formulacích optimálně. Avšak na základě tohoto pozorování se předpokládá, že bude obtížné nalézt proteázu, která bude dobře fungovat ve všech třech typech detergentů. Překvapivě, není tomu tak. Vyvinul se způsob rozumně navržené proteázové varianty, která se použije buď v systému s nízkou koncentrací detergentu nebo v systému s vysokou koncentrací detergentu nebo dokonce v systému se střední koncentrací detergentu nebo dále pracuje ve všech systémech uvedených třech koncentrací.

Zjistilo se, že za účelem produkovat proteázovou variantu, která je účinnější v systému s nízkou koncentrací, je nezbytné nahradit pozitivně nabitý zbytek nebo zbytky buď negativně nabitým zbytkem nebo zbytky nebo neutrálním zbytkem nebo zbytky s negativně nabitým zbytkem nebo zbytky. Naopak se uvádí, že za účelem produkce proteázové varianty, která je účinnější v systému s vysokou koncentrací detergentu, je nezbytné nahradit negativně nabitý zbytek(zbytky) buď pozitivně nabitým zbytkem (zbytky) nebo neutrálním zbytkem(zbytky) a/nebo neutrálním zbytkem(zbytky) s pozitivně nabitým zbytkem(zbytky). Dále se zjistilo, že řada proteázových variant použitelná v systému s nízkou koncentrací detergentu a/nebo v systému s vysokou koncentrací detergentu je také účinná v systému se střední koncentrací detergentu. Vyvážením těchto změn je možné produkovat proteázovou

03.07.00

variantu, která funguje dobře v systémech s nízkou koncentrací detergentu, v systémech s nízkou nebo střední koncentrací detergentu, v systémech se střední a vysokou koncentrací detergentu nebo v systémech všech tří koncentrací detergentu.

Elektrostatický náboj libovolného ionizovatelného vedlejšího řetězce aminokyseliny s kyselou nebo bazickou funkcí ve vodném roztoku je funkce pH. Kyselé zbytky Glu a Asp v rovnovážném postupu ztrácí disociací při hodnotě pH 3 až 6 proton, přičemž získávají negativní náboj. Stejným způsobem His, Lys a Arg se při hodnotách pH 5 až 8, 8,5 až 11,5 a pH 11 až 14 postupně deprotonizují, čímž ztrácejí pozitivní náboj. Proton zbytku Tyr OH zvyšuje svou disociaci mezi hodnotami pH 8,5 a 11,5, přičemž Tyr získává negativní náboj. Disociační rozmezí karboxylového konce se pohybuje mezi hodnotami pH 1 až 4, což vede ke vzniku negativního náboje. V případě N-konce je tato hodnota pH 8 až 11, což je doprovázeno ztrátou pozitivního náboje. Disociační rozmezí vedlejšího řetězce aminokyseliny jsou průměrné hodnoty pro řadu proteinů, ale je známo, že je ovlivňují neobvyklé strukturální konfigurace ve stejných proteinech.

Kumulativní účinek všech nábojů stanoví, zda protein má při dané hodnotě pH čistě pozitivní nebo negativní náboj. Hodnota pH, při kterém účinnost pozitivního a negativního náboje je účinná a uvádí protein do elektrostaticky neutrálního stádia se nazývá izoelektrický bod (pI). V případě, že se posune hodnota pH nebo že se přidá nebo odstraní aminokyselina s ionizovatelným zbytkem vedlejšího řetězce, protein ztratí nebo získá náboj. Zvýšení čistě pozitivního náboje se dosáhne buď nahrazením zbytku, který je při daném pH negativně nabitý, pozitivně nabitým zbytkem nebo zbytkem bez náboje, což vede k formální změně náboje +1 a +2. Nahrazením nenabitého zbytku vedlejšího řetězce zbytkem, který je protonizován při daném pH, formální změna náboje je +1. Podobně čistě negativní náboj se může zvýšit nahrazením

03.07.00

pozitivně nabitých a nenabitých vedlejších řetězců negativně nabitými vedlejšími řetězci při pH pozorování, čímž se zvýší negativní náboj o -1 a -2.

Systém s nízkou koncentrací detergentu zahrnuje detergenty, kde v prací vodě je přítomno méně než přibližně 800 ppm detergentových komponentů. Japonské detergenty se v obecném případě považují za systém s nízkou koncentrací detergentu, který obsahuje v prací vodě přibližně 667 ppm detergentových komponentů.

Střední koncentrace detergentu zahrnuje detergenty, kde v prací vodě je obsaženo přibližně 800 ppm a 2000 ppm detergentových komponentů. Detergenty v Severní Americe se v obecném případě považují za systémy se střední koncentrací detergentu, které v prací vodě obsahují přibližně 975 ppm detergentových komponentů. V Brazílii obsahují detergenty v typickém případě v prací vodě přibližně 1 500 ppm detergentových komponentů.

Sytém s vysokou koncentrací detergentu zahrnuje detergenty, kde v promývací vodě je obsaženo více jak 2 000 ppm detergentových komponentů. Evropské detergenty se v obecném případě považují za systémy s vysokou koncentrací detergentů, což znamená, že v prací vodě obsahují přibližně 4 500 až 5 000 ppm detergentových komponentů.

Detergenty Latinské Ameriky v obecném případě obsahují vysoké množství fosfátů a rozmezí detergentů používaných v Latinské Americe spadá do systému se střední nebo vysokou koncentrací detergentu, což je rozmezí mezi 1 500 ppm až 6 000 ppm detergentových komponentů v prací vodě. Jak se uvádí shora v textu brazilské detergenty v typickém případě obsahují v prací vodě 1 500 ppm detergentových komponentů. Avšak výskyt detergentů s vysokým obsahem fosfátů není omezen na další státy Latinské Ameriky, kde se mohou používat systémy s vysokou koncentrací detergentu, které obsahují v promývací vodě až přibližně 6 000 ppm detergentových komponentů.

03.07.00

Z uvedených skutečností je zřejmé, že koncentrace detergentových sloučenin v typických pracích roztocích v celém světě kolísá od hodnoty nižší než přibližně 800 ppm (což je nízká koncentrace detrgentu), například přibližně 667 ppm v Japonsku, přes hodnotu 800 ppm k hodnotě 2 000 ppm (což je střední koncentrace detergentu), například přibližně 975 ppm v US a přibližně 1 500 v Brazílii až k hodnotě 2 000 ppm (což je vysoká koncentrace detergentu). Příkladem je koncentrace 4 500 ppm až přibližně 5 000 ppm v Evropě a 6 000 ppm v místech, kde se používají detergenty s vysokým obsahem fosfátů.

Koncentrace v typických pracích roztocích se stanoví empiricky. V USA v typickém případě v pračce udržuje objem 64,4 l pracího roztoku. Aby se získala přibližná hodnota koncentrace detergentu v pracím roztoku 975 ppm, pak se musí do pracího roztoku přidat přibližně 62,72 g detergentové kompozice. Toto množství je typické množství odměřované uživatelem do prací vody odměrkou, která je přibalena u detergentu.

Proteázy jsou karbonylové hydrolázy, které v obecném případě štěpí peptidové vazby proteinů nebo peptidů. Termín „proteáza" znamená přirozeně se vyskytující proteázu nebo rekombinantní proteázu. Přirozeně se vyskytující proteázy zahrnují α-aminoacylpeptidovou hydrolázu, peptidylaminokyselinovou hydrolázu, acylaminohydrolázu, serinovou karboxypeptidázu, metalokarboxypeptidázu, thiolproteinázu, karboxylproteinázu a metaloproteinázu. Zahrnují také serinové proteázy, metaloproteázy a kyselé proteázy, stejně jako endo- a exoproteázy.

Vynález dále popisuje proteázové enzymy, které jsou varianty karbonylových hydroláz, které se přirozeně nevyskytují (proteázové varianty), které vykazují odlišnou proteolytickou aktivitu, stabilitu, substrátovou specifitu, profil pH a nebo charakteristiky použití ve srovnání s prekurzorovou karbonylovou hydrolázou, ze které se získala

03.07.00

aminokyselinová sekvence varianty. Ve specifickém případě takové proteázové varianty vykazují aminokyselinovou sekvenci, která se v přírodě nevyskytuje a která se získala substitucí řady aminokyselinových zbytků prekurzorové proteázy různými aminokyselinami. Prekurzorová proteáza může být přirozeně se vyskytující proteázou nebo rekombinantní proteázou.

Proteázové varianty podle vynálezu zdůrazňují substituci libovolné z devatenácti přirozeně se vyskytujících L-aminokyselin v určených polohách aminokyselinových zbytků. Takové substituce se mohou provést v libovolném prekurzorovém subtilizínu (prokaryontní, eukaryontní, savčí atd). V tomto dokumentu se různé aminokyseliny značí běžným třípísmenným kódem. Takový kód je stanoven v publikaci Dále, M.W. (1989), Molecular Genetics of Bacteria, John Wiley and Sons, Ltd., Appendix B.

Zde používané proteázové varianty se přednostně získaly ze subtilizínu mikroorganizmu *Bacillus*. Více se upřednostňují varianty proteáz získané ze subtilizínu mikroorganizmu *Bacillus lentus* a subtilizínu 309.

Subtilizíny jsou bakteriální a houbové proteázy, které v obecném případě štěpí peptidové vazby proteinů nebo peptidů. Termín „subtilizín" znamená přirozeně se vyskytující subtilizín nebo rekombinantní subtilizín. Je známo, že série přirozeně se vyskytujících subtilizínů produkují a často vylučují různé druhy mikroorganizmů. Aminokyselinové sekvence zástupců této série nejsou zcela homologní. Avšak subtilizíny v této sérii vykazují stejný nebo podobný typ proteolytické aktivity. Tato třída serinových proteáz sdílí běžnou aminokyselinovou sekvenci definující katalytickou triádu, která se odlišuje od třídy serinových proteáz příbuzných chymotripsinu. Subtilizíny a serinové proteázy příbuzné chymotrypsinu vykazují katalytickou triádu obsahující aspartát, histidin a serin. U proteáz příbuzných subtilizínu relativní pořadí těchto aminokyselin (čtou se od N-konce k C-

03.07.00

konci) je aspartát-histidin-serin. U proteáz příbuzných chymotrypsinu je relativní pořadí histidin-aspartát-serin. Subtilizín zde vystupuje jako serinová proteáza vykazující katalytickou triádu proteáz příbuzných subtilizínu. Příklady zahrnují, ale nejsou omezeny na subtilizíny uvedené na obrázku č. 3. Číslování aminokyselin v proteázách odpovídá číslům přiřazených sekvencím subtilizínu mikroorganizmu *Bacillus amyloliquefaciens* přítomných na obrázku č. 1.

Termín „rekombinantní subtilizín" nebo „rekombinantní proteáza" znamená subtilizín, ve kterém sekvence DNA kódující subtilizín nebo proteázu je upravena tak, aby se produkovala varianta (nebo mutant) sekvence DNA, která kóduje substituci, deleci nebo inzerci jedné nebo více aminokyselin v přirozeně se vyskytující aminokyselinové sekvenci. Vhodné metody produkce takové úpravy jsou popsány v dokumentu US patent RE 34,606, US patent 5,204,015 a US patent 5,185,258, US patent 5,700,676, US patent 5,801,038 a US patent 5,763,257.

Termín „subtilizíny, které nepocházejí z člověka" a DNA je kódující se mohou získat z mnoha prokaryontních a eukaryontních organizmů. Vhodné příklady prokaryontních organizmů zahrnují gram-negativní organizmy, jako je *E. coli* nebo *Pseudomonas* a gram pozitivní bakterie jako je *Micrococcus* nebo *Bacillus*. Příklady eukaryontních organizmů, ze kterých je možné získat subtilizín a jejich geny, mohou zahrnovat kvasinky, jako jsou *Saccharomyces cerevisiae*, houby jako je *Aspergillus sp.*.

Termín „varianta proteázy" má aminokyselinovou sekvenci, která se získala z aminokyselinové sekvence „prekurzorové proteázy". Prekurzorové proteázy zahrnují přirozeně se vyskytující proteázy a rekombinantní proteázy. Aminokyselinová sekvence varianty proteázy se „získala" z aminokyselinové sekvence prekurzorové proteázy substitucí, delecí nebo inzercí jedné nebo více aminokyselin prekurzorové aminokyselinové sekvence. Taková modifikace je spíše modifikace „sekvence

03.07.00

prekurzorové DNA", která kóduje aminokyselinovou sekvenci prekurzorové proteázy, než úprava enzymy prekurzorové proteázy *per se*. Vhodné metody takových úprav prekurzorové sekvence DNA zahrnují zde popsané metody, stejně jako metody známé v oboru (popisuje se například v dokumentu EP 0 328299, WO89/06279 a v už uvedených US patentech a přihláškách).

Tyto čísla poloh aminokyselin odpovídají číslům označujícím sekvenci subtilizínu mikroorganizmu *Bacillus amyloliquefaciens*, která je uvedena na obrázku č. 1. Vynález se neomezuje pouze na mutaci tohoto určitého subtilizínu, ale také zahrnuje prekurzorové proteázy, které obsahují aminokyselinové zbytky v polohách, které jsou „ekvivalentní" s určitými identifikovanými zbytky v subtilizínu organizmu *Bacillus amyloliquefaciens*. V preferovaném provedení vynálezu prekurzorová proteáza je subtilizín organizmu *Bacillus lentus* a substituce se provádí v ekvivalentních polohách aminokyselinových zbytků v organizmu *B. lentus*, které odpovídají těm uvedeným shora v textu.

Poloha zbytku (aminokyseliny) prekurzorové proteázy je ekvivalentní zbytku subtilizínu mikroorganizmu *Bacillus amyloliquefaciens* v případě, že je buď homologní (to znamená, že odpovídá poloze buď v primární nebo terciální struktury) nebo analogická se specifickým zbytkem nebo částí uvedeného zbytku v subtilizínu organizmu *Bacillus amyloliquefaciens* (to znamená, že vykazuje stejnou nebo podobnou funkční kapacitu kombinovat, reagovat nebo chemicky interagovat).

Za účelem dosáhnout homologie s primární strukturou aminokyselinová sekvence prekurzorové proteázy se přímo porovnává s primární sekvencí subtilizínu a zvláště se sadou zbytků, které jsou známy, že jsou v subtilizínech se známou sekvencí neměnné. Například obrázek č. 2 znázorňuje konzervativní zbytky subtilizínu organizmu *B. amyloliquefaciens a B. lentus*. Po uspořádání konzervativních zbytků, což umožňuje nezbytné začlenění a delece za účelem

03.07.00

udržet uspořádání (to znamená zabránit eliminaci konzervativních zbytků pomocí doplňkové delece a inzerce), se definují zbytky ekvivalentní pro určité aminokyseliny v primární sekvenci subtilizínu organizmu *Bacillus amyloliquefaciens*. Uspořádání konzervativních zbytků by mělo přednostně konzervovat 100 % takových zbytků. Avšak uspořádání vyšší než 75 % nebo 50 % konzervativních zbytků je také adekvátní pro definování ekvivalentních zbytků. Měla by se udržovat konzervativnost katalytické triády Asp32/His64/Ser221. V publikaci Siezen et al., (1991) Protein Eng. 4(7): 719-737 se popisuje uspořádání velkého množství serinových proteáz. V této publikaci se také popisuje rozdělení subtiláz nebo serinových proteáz podobných subtilizínu do jednotlivých skupin.

Například na obrázku č. 3 jsou uspořádány aminokyselinové sekvence subtilizínu z mikroorganizmů *Bacillus amyloliquefaciens, Bacilus subtilis, Bacilus lichenoformis (carlsbergensis)* a *Becillus lentus*, přičemž se stanoví maximální množství homologie mezi aminokyselinovými sekvencemi. Porovnání těchto sekvencí naznačuje, že v každé sekvenci existuje řada konzervativních zbytků. Tyto konzervativní zbytky (mezi BPN´a *B. lentus*) jsou uvedeny na obrázku č. 2.

Tyto konzervativní zbytky se tak mohou použít k definici odpovídajících ekvivalentních aminokyselinových zbytků subtilizínu mikroorganizmu *Bacillus amyloliquefaciens* v jiných subtilizínech, jako je subtilizín mikroorganizmu *Bacillus lentus* (popisuje se v přihlášce PCT č. W089/06279, uveřejněné 13. července 1989), který je preferovaným proteázovým prekurozorovým enzymem nebo subtilizín popsaný jako PB92 (popsaný v dokumentu EP 0 328 299), který vykazuje vysokou homologii s preferovaným subtilizínem mikroorganizmu *Bacillus lentus*. Aminokyselinové sekvence jistého z těchto subtilizínů jsou uspořádány na obrázku č. 3A a 3B se sekvencí subtilizínu

03.07.00

Bacillus amyloliquefaciens tak, aby se dosáhlo maximální homologie konzervativních zbytků. Jak je možné vidět, v sekvenci mikroorganizmu *Bacillus lentus* ve srovnání se subtilizínem *Bacillus amyloliquefaciens* existuje řada delecí. Tak například ekvivalentní aminokyselinou v případě Val 165 v subtilizínu *Bacillus amyloliquefaciens* u jiných subtilizínů mikroorganizmů je izoleucin *B. lentus a B. licheniformis*.

Termín „ekvivalentní zbytky" se mohou také definovat stanovenou homologií prekurzorové proteázy na úrovni terciální struktury, přičemž terciální struktura se stanovila krystalografií pomocí rentgenového záření. Ekvivalentní zbytky se definují jako ty, pro které atomové koordináty dvou nebo více hlavních řetězcových atomů určitého aminokyselinového zbytku prekurzorové proteázy a subtilizín mikroorganizmu *Bacillus amyloliquefaciens* (N na N, CA na CA, C na C a O na O) jsou 0,13 nm, přičemž se upřednostňuje, aby tyto atomové koordináty po uspořádání byly 0,1 nm. Uspořádání se dosáhne po té, co se zorientuje a umístí nejlepší model, přičemž dojde k maximálnímu přesahu atomových koordinát atomů vodíku proteinu proteázy vůči subtilizínu *Bacillus amyloliquefaciens*. Nejlepším modelem je krystalografický model vykazující nejnižší faktor R v případě experimentálních difrakčních dat při nejvyšším možném rozlišení.

$$R\,factor = \frac{\Sigma_h |Fo(h)| - |Fc(h)|}{\Sigma_h |Fo(h)|}$$

Ekvivalentní zbytky, které jsou funkčními analogy ke specifickému zbytku subtilizínu *Bacillus amyloliquefaciens* jsou definovány jako aminokyseliny prekurzorové roteázy, které mohou přizpůsobit konformaci tak, že buď změní nebo se podílejí definovaným způsobem na struktuře proteinu, navázání substrátu nebo katalýze a přiřazují se ke specifikému zbytku subtilizínu mikroorganizmu *Bacillus amyloliquefaciens*. Jsou to

03.07.00

ty zbytky prekurzorové proteázy (jejichž terciální struktura se získala rentgenovou krystalografií), které obsazují analogickou polohu, ačkoli atomy hlavního řetězce daného zbytku nemohou uspokojit kriterium ekvivalence na základě obsazení homologické polohy, přičemž atomové koordináty alespoň dvou atomů vedlejšího řetězce zbytku leží 0,13 nm od odpovídajících atomů vedlejšího řetězce subtilizínu mikroorganizmu *Bacillus amyloliquefaciens*. Koordináty trojrozměrné struktury subtilizínu mikroorganizmu *Bacillus amyloliquefaciens* jsou uvedeny v dokumentu přihláška EPO č. 0 251 446 (ekvivalent US patentu č. 5,182,204) a může se použít ke stanovení ekvivalentních zbytků na úrovni terciální struktury.

Některé z těchto zbytků určených pro substituci jsou konzervativní zbytky, zatímco ostatní nejsou konzervativní. V případě zbytků, které nejsou konzervativní, substituce jednoho nebo více aminokyselin je limitována na substituci, která produkuje variantu, která vykazuje aminokyselinovou sekvenci, která neodpovídá sekvenci zjištěné v přírodě. V případě konzervativních zbytků výsledkem takových substitucí nebude přirozeně se vyskytující sekvence. Varianty proteáz podle vynálezu zahrnují zralé formy variant proteáz, stejně jako pro-formy a prepro-formy takových variant proteáz. Prepro-formy jsou preferované konstrukce, protože umožňují expresi, sekreci variant proteáz. Termín „pro-sekvence" znamená sekvence aminokyselin vázaných na N-terminální část zralé formy proteázy, která když se odstraní vede k objevení „zralé" formy proteázy. Řada proteolytických enzymů se nachází v přírodě jako translační proenzymové produkty a v nepřítomnosti post-translačního zpracování se exprimují tímto způsobem. Preferované pro-sekvence produkující varianty proteáz jsou putativní pro-sekvence subtilizínu mikroorganizmu *Bacillus amyloliquefaciens*, ačkoli se mohou použít jiné proteázové pro-sekvence.

03.07.00

Termín „signální sekvence" nebo „presekvence" znamenají libovolnou sekvenci aminokyselin vázaných na N-terminální části proteázy nebo N-terminální části pro-proteázy, která se může podílet na sekreci zralé formy nebo pro-formy proteázy. Tato definice signální sekvence je funkční, jestliže zahrnuje všechny uvedené aminokyselinové sekvence kódované N-terminální částí genu proteázy, která se podílí na uskutečnění sekrece proteázy za nativních podmínek. Vynález popisuje takové sekvence, které se používají pro ovlivnění sekrece zde definovaných variant proteáz. Jedna možná signální sekvence obsahuje prvních sedm aminokyselinových zbytků signální sekvence, které pochází ze subtilizínu *Bacillus subtillis* fúzovaného se zbytkem signální sekvence subtilizínu z mikroorganizmu *Bacillus lentus* (ATCC 21536).

Termín „prepro-" forma varianty proteázy zahrnuje zralou formu proteázy obsahující prosekvenci operativně spojenou s aminokoncem proteáz a s pre-sekvencí nebo se signální sekvencí operativně spojenou s amino-koncem prosekvence.

Termín „expresivní vektor" znamená konstrukci DNA obsahující sekvenci DNA, která je operativně spojená s vhodnou kontrolní sekvencí schopnou ovlivnit expresi uvedené DNA ve vhodném hostiteli. Takové kontrolní sekvence zahrnují promotor, který ovlivňuje transkripci, operátorovou sekvenci, která řídí takovou transkripci, sekvenci kódující vhodná místa na ribozómu, kam se váže mRNA a sekvence , které řídí ukončení transkripce a translace. Vektorem může být plazmid, fágové částice nebo jednoduše potencionální inzert v genomu. Po té, co je vhodný hostitel transformován, vektor se může replikovat a funguje nezávisle na genomu hostitele nebo se může v některých případech sám začlenit do genomu hostitele. U některých specifikacích termín „plazmid" a „vektor" jsou vnitřně zaměnitelné, přičemž plazmid je nejběžněji užívanou formou vektoru. Vynález dále popisuje také jiné formy

03.07.00

expresívních vektorů, které vykazují ekvivalentní funkce a stávají se dobře známy v oboru.

Termín „hostitelská buňka" podle vynálezu je v obecném případě prokaryontní nebo eukaryontní hostitel, který se přednostně upravuje metodami popsanými v US patentu RE 34,606 tak, aby nebyl schopen vylučovat enzymaticky aktivní endoproteázy. Preferovaná hostitelská buňka pro expresi proteázy je mikroorganizmus *Bacillus* kmen BG2036, který je nedostatečný v případě enzymaticky aktivní neutrální proteázy a alkalické proteázy (subtilizínu). Konstrukce kmene BG2036 se popisuje v US patentu 5,264,366. Jiné hostitelské buňky vhodné pro expresi proteázy zahrnují *Bacillus subtilis 168* (popisuje se v publikaci US patent č. 34,606 a US patent č. 5,264,366) stejně jako vhodný kmen mikroorganizmu *Bacillus* , jako je *B. licheniformis, B. lentus* atd.

Hostitelské buňky se transformovaly nebo transfekovaly vektory konstruovanými za použití metod rekombinace DNA. Takové transformované hostitelské buňky jsou schopny replikovat vektory kódující varianty proteáz nebo exprimovat požadovanou variantu proteáz. V případě vektorů, které kódují pre- nebo prepro-formu varianty proteázy, se pak tyto varianty v typickém případě vylučují z hostitelské buňky do média hostitelské buňky.

Termín „operativně spojený" znamená vztah mezi dvěmi oblastmi DNA. Jednoduše znamená, že jsou vzájemně funkčně příbuzné. Například pre-sekvence je operativně spojená s peptidem, jestliže funguje jako signální sekvence, která se podílí na vylučování zralé formy proteinu, přičemž nejpravděpodobněji zahrnuje štěpení signální sekvence. Promotor je operativně spojen s kódující sekvencí, jestliže řídí transkripci sekvence. Vazebné místo ribozómu je operativně spojeno s kódující sekvencí, jestliže je umístěno tak, že umožňuje translaci.

03.07.00

Geny kódující přirozeně se vyskytující prekurzorovou proteázu se mohou získat pomocí obecných metod, které jsou známy v oboru. Metody v obecném případě obsahují syntézu značených sond, které vykazují putativní sekvence kódující oblasti proteázy, přípravu genomových knihoven genu hybridizací se sondami. Pozitivně hybridizující klony se pak mapují a sekvenují.

Klonované proteázy se pak používají pro transformaci hostitelské buňky za účelem exprese proteázy. Gen proteázy se pak liguje do plazmidu s vysokým počtem kopií. Tento plazmid se replikuje v hostitelech ve smyslu, že obsahuje dobře známé elementy nezbytné pro plazmidovou replikaci: promotor je operativně spojený s genem (který se může začlenit jako vlastní homologní promotor genu, jestliže je rozeznán, to znamená transkribován hostitelem), ukončení transkripce a polyadenylační oblast (nezbytnou pro stabilitu mRNA transkribovanou hostitelem z genu proteázy v jistých buňkách eukaryontního hostitele), která je exogenní nebo se dodává endogenní terminační oblastí genu proteázy a je-li to nutné, zahrnuje selekční gen , jako je gen nesoucí rezistenci na antibiotika , který umožňuje kontinuální kultivaci buněk hostitele infikovaných plazmidem růstem v médiu, které obsahuje antibiotika. Plazmidy s vysokým počtem kopií také obsahují počátek replikace, který je pro hostitele vhodný. Plazmidy s vysokým počtem kopií také obsahují počátek replikace, což umožňuje vytvořit velké množství plazmidů v cytoplazmě bez omezení chromozomu. Avšak vynález také popisuje začlenění více kopií genu proteázy do hostitelského genomu. To umožňují prokaryontní a eukaryontní organizmy, které jsou zvláště náchylné k homologní rekombinaci.

Gen může být přirozený gen organizmu *B. lentus*. V jiném případě je možné produkovat syntetický gen kódující přirozeně se vyskytující nebo mutantní prekurzorovou proteázu. V takovém případě je možné stanovit sekvenci DNA a/nebo aminokyselinovou

03.07.00

sekvenci prekurzorové proteázy. Syntetizovalo se několik přesahujících syntetických jednořetězcových fragmentů DNA, které po hybridizaci a ligaci produkují syntetickou DNA kódující prekurzorovou proteázu. Příklad syntetické genové konstrukce se uvádí v příkladu 3 dokumentu US patent č. 5,204,015.

Klonoval se přirozeně se vyskytující nebo syntetický gen prekurzorové proteázy. Provedla se řada modifikací, aby se zvýšila možnost použití genu při syntéze přirozeně se vyskytující prekurzorové proteázy. Takové modifikace zahrnují produkci rekombinantních proteáz, jak se popisuje v publikaci US patent RE 34,606 a přihláška EPO č. 0 251 446, a produkci zde popsaných variant proteáz.

Následující způsob kazetové mutageneze se může použít pro konstrukci variant proteáz podle vynálezu, ačkoli se mohou použít i jiné metody. Nejdříve se získá přirozeně se vyskytující gen kódující proteázu a celý nebo jeho část se sekvenuje. Pak se v sekvenci hledá bod, ve kterém je nutné provést mutaci (deleci, inzerci nebo substituci) jedné nebo více aminokyselin v kódovaném enzymu. V sekvenci, která sousedí s tímto bodem se hodnotila přítomnost restrikčních míst vhodných pro nahrazení krátkého segmentu genu s oligonukleotidy, které v případě, že se exprimují budou kódovat různé mutanty. Upřednostňuje se, aby taková restrikční místa byla jediná restrikční místa v proteázovém genu, což umožňuje nahrazení segmentu genu. Může se však použít libovolné restrikční místo, které se v genu proteázy neopakuje, přičemž štěpením restrikčními enzymy mohou vznikat genové fragmenty, které se sestaví do správné sekvence. Jestliže restrikční místa nejsou v polohách s vhodnou vzdáleností od vybraného bodu (10 až 15 nukleotidů), pak se taková místa vytvoří substitucí nukleotidů v genu takovým způsobem, že se v konečné konstrukci změní čtecí rámec nebo kódované aminokyseliny. Extenzí primeru M13 podle obecně

03.07.00

známých metod se provedla mutace genu za účelem změny sekvence.

Jestliže jednou dojde ke klonování přirozeně se vyskytující DNA nebo syntetické DNA, pak restrikční místa lemující místa, kde se provede mutace, se štěpí restrikčními enzymy a do genu se liguje pluralita oligonukleotidových kazet s komplementárním koncem. Tímto způsobem se zjednoduší mutageneze, protože všechny oligonukleotidy se syntetizovaly tak, aby měly stejná restrikční místa a pro vznik restrikčních míst jsou nezbytné syntetické linkery.

Proteolytická aktivita se definuje jako rychlost hydrolýzy peptidových vazeb na miligram aktivního enzymu. Za účelem měření proteolytické aktivity existuje řada známých postupů (popisuje se v publikaci K. M. Kalisz, „Microbial Proteinases," Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, A. Fiechter ed., 1988). Vedle upravené proteolytické aktivity řada enzymů podle vynálezu může mít jiné upravené vlastnosti, jako je poměr k_m, k_{cat}, k_{cat}/K_m a/nebo upravenou specifitu substrátu a/nebo upravený profil aktivity v závislosti na pH. Tyto enzymy se mohou upravit pro určitý substrát, který předchází přípravě peptidů nebo je přítomen při hydrolytickém zpracování, jako je použití při praní prádla.

Vynález dále popisuje zabezpečení proteázy, která vykazuje změněnou proteolytickou aktivitu ve srovnání s prekurzorovou proteázou, protože zvýšení takové aktivity (numericky vyšší) umožňuje použití enzymu, který působí účinněji na cílový substrát. Zajímavé jsou také různé enzymy, které vykazují změněnou tepelnou stabilitu a/nebo substrátovou specifitu ve srovnání s prekurzorem. V některých případech je nutná nižší proteolytická aktivita. Například snížení proteolytické aktivity je nutné, když se požaduje syntetická aktivita proteáz (například při syntéze peptidů). Je možné snížit proteolytickou aktivitu v případě, že je schopná porušit

03.07.00

produkt takové syntézy. Naopak v některých případech může být nutné zvýšit proteolytickou aktivitu enzymu verzus jeho perkurzoru. Navíc je možné požadovat zvýšení nebo snížení (změna) stability varianty, přičemž je nutná alkalická nebo teplotní stabilita. Zvýšení nebo snížení K_m, k_{cat} nebo k_{cat}/K_m jsou specifické pro substrát, který se používá pro stanovení těchto kinetických parametrů.

Zjistilo se, že varianty proteáz obsahující substituce aminokyselin v jedné nebo více poloh zbytků tak, že substituce mění náboj v poloze tak, že se stává více negativní nebo méně pozitivní ve srovnání s prekurzorovou proteázou. Tyto varianty jsou účinnější při nižší koncentraci detergentu než prekurzorová proteáza.

Zjistilo se, že varianty proteáz obsahující substituce aminokyselin v jedné nebo ve více polohách zbytku tak, že substituce mění náboj v této poloze, přičemž náboj se stává více pozitivní nebo méně negativní ve srovnání s prekurzorovou proteázou. Varianty proteáz jsou účinnější při vysokých koncentracích detergentu ve srovnání s prekurzorovou proteázou.

Zjistilo se, že řada variant proteáz jsou použitelné v systému nízkých koncentracích detergentu a/nebo v systémech s vysokými koncentracemi detergentu, také jsou účinné v systému střední koncentrace detergentu.

Tyto substituce se přednostně provádí u subtilizínu organizmu *Bacillus lentus* (rekombinantní nebo přirozený typ), ačkoli se substituce mohou provést v libovolné proteáze organizmu *Bacillus*, upřednostňuje se subtilizín organizmu *Bacillus*.

Na základě výsledků získaných s rozdílnými proteázami, uvedené mutace v subtilizínu organizmu *Bacillus amyloliquefaciens* jsou důležité při proteolytické aktivitě a/nebo stabilitě těchto enzymů a při čištění nebo promývání takových enzymů.

03.07.00

Řada proteázových variant podle vynálezu je použitelná při vytváření různých kompozic detergentu nebo formulací osobní potřeby, jako jsou šampony nebo pleťová voda. Řada známých látek jsou vhodná povrchově aktivní činidla, která se používají v kompozicích obsahujících mutanty proteáz podle vynálezu. Tyto látky zahrnují neiontové, aniontové, kationtové nebo obojetné detergenty, jak se popisuje v dokumentu US 4,404,128 (Barry a Anderson) a US 4,261,868 (Jiri Flora, et al.,). Vhodná detergentová formulace se popisuje v příkladu 7 dokumentu US patent 5,204,015. V oboru jsou známy různé formulace, které se používají jako čistící kompozice. Vedle typických čistících kompozic se pro libovolný účel, kde se používá přirozená proteáza nebo proteáza divokého typu, je možné použít varianty proteáz podle vynálezu. Tyto varianty se mohou použít například při aplikacích kusového nebo kapalného mýdla, při aplikací prostředků na nádobí, čistících roztoků pro kontaktní čočky, produktů hydrolýzy peptidů, při zpracování odpadů, aplikací na textilie, jako enzymy štěpící fúzi při produkci proteinů. Varianty podle vynálezu mohou vykazovat zvýšenou účinnost detergentové kompozice (ve srovnání s prekurzorem). Zvýšená účinnost detergentu se definuje jako zesílení schopnosti čistit skvrny citlivé vůči jistému enzymu, jako jsou skvrny od trávy a krve, jak se definuje obvyklým hodnocením po standardním cyklu praní.

Proteázy podle vynálezu se mohou vnést do práškových nebo kapalných detergentů, jejichž pH je mezi 6,5 a 12,0 s procentovým zastoupením přibližně 0,01 až 5% hmot. (upřednostňuje se 0,1 % až 0,5 %). Tyto detergentové čistící kompozice mohou také zahrnovat jiné enzymy, jako jsou proteázy, amylázy, celulázy, lipázy nebo endoglykolázy stejně jako plnidla nebo stabilizéry.

Vedle proteáz podle vynálezu neexistuje žádné specifické využití běžných čistících prostředků. Jinými slovy libovolná teplota a pH vhodné pro detergent je také vhodný pro uvedenou

03.07.00

kompozici, pokud pH je ve shora uvedeném rozmezí a teplota je nižší než teplota denaturující proteázy. Proteázy podle vynálezu se mohou použít jako čistící kompozice bez detergentů buď samotné nebo v kombinaci s plnidly a stabilizéry.

Vynález také popisuje čistící kompozice obsahující proteázové varianty podle vynálezu. Čistící kompozice mohou dále obsahovat aditiva, která se v těchto čistících kompozicích běžně používají. Tyto aditiva se mohou vybrat, ale nejsou omezena, na bělidla, povrchově aktivní činidla, plnidla, enzymy a bělící katalytická činidla. V oboru je známo, že aditiva jsou vhodná pro inkluzi do kompozic. Zde uvedený seznam není vyčerpávající a je nutné ho brát jako příklady vhodných aditiv. V oboru je také známo, že je možné používat pouze ty aditiva, která jsou kompatibilní s enzymy a jinými komponenty v kompozici, jako je například povrchově aktivní činidlo.

Množství aditiva, které je přítomno v čistící kompozici je přibližně 0,01 % až 99,9 %, upřednostňuje se přibližně 1 % až 95 %, více se upřednostňuje 1 % až 80 %.

Proteázové varianty podle vynálezu se mohou přidat do zvířecího krmení, jak se popisuje v dokumentu US 5,612,055, US 5,314, 692 a US 5,147,642.

Dále vynález popisuje kompozici pro ošetření textilií, které zahrnují proteázové varianty podle vynálezu. Kompozice se může použít při ošetření například hedvábí nebo vlny, jak se popisuje v dokumentech RD 216,034, EP 134,267, US 4,533,359 a EP 344,259.

Přehled obrázků na výkrese

Na obrázku č. 1 A až C je znázorněna sekvence DNA a aminokyselinová sekvence subtilizínu mikroorganizmu *Bacillus amyloliquefaciens* a částečná restrikční mapa tohoto genu.

03.07.00

Na obrázku č. 2 jsou znázorněny konzervativní aminokyselinové zbytky subtilizínů mikroorganizmů *Bacillus amyloliquefaciens* (BPN´) a *Bacillus lentus* (divoký typ).

Na obrázcích 3A až 3B je znázorněna aminokyselinová sekvence čtyř subtilizínů. Horní řádek reprezentuje aminokyselinovou sekvenci subtilizínu z mikroorganizmu *Bacillus amyloliquefaciens* (také se někdy nazývá jako subtilizín BPN´). Druhý řádek znázorňuje aminokyselinovou sekvenci subtilizínu z mikroorganizmu *Bacillus subtilis*. Třetí řádek znázorňuje aminokyselinovou sekvenci subtilizínu z mikroorganizmu *B. licheniformis*. Čtvrtý řádek znázorňuje aminokyselinovou sekvenci subtilizínu z mikroorganizmu *Bacillus lentus* (který se v dokumentu PCT WO89/06276 nazývá subtilizín 309). Symbol * znázorňuje nepřítomnost specifických aminokyselinových zbytků ve srovnání se subtilizínem BPN´.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1:

Produkovalo se a čistilo se velké množství variant proteáz za použití metod dobře známých v oboru. Všechny mutace se provedly v subtilizínu organizmu *Bacillus lentus* GG36.

Produkované proteázové varianty se testovaly u dvou typů detergentů a při dvou typech promývání za použití testů popsaných v publikaci „An improved method of assaying for a preferred enzyme and/or preffered detergent composition," US Seriál No. 6%/068,796.

V tabulce 1 až 13 se uvádějí testované proteázy a výsledky testů ve dvou různých detergentech. Všechny hodnoty jsou dány jako porovnání s první proteázou uvedenou v tabulce (to znamená, že hodnota 1,32 ukazuje schopnost uvolnit 132 % barviva v porovnání se 100 % první varianty uvedené v tabulce).

03.07.00

Sloupec A ukazuje rozdíly v náboji variant. V případě sloupce B detergentem byl 0,67 g/l filtrovaného Ariel Ultra (Procter and Gamble, Cincinnati, OH, USA) v roztoku, který obsahuje 3 zrna na 3,785 l míchaného Ca2+/Mg2+. V každé prohlubni se použilo 0,3 ppm enzymu při teplotě 25 °C (systém s nízkou koncentrací detergentu). V odstavci C detergentem byl 3,38 g/l filtrovaného Ariel Futur (Procter and Gamble, Cincinnati, OH, USA) v roztoku obsahujícím 15 zrn v 3,785 l směsi Ca2+/Mg2+ a v každé prohlubni se použilo 0,3 ppm enzymu při teplotě 40 °C (systém s vysokou koncentrací detergentu).

Tabulka č. 1

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

Tabulka č 2

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

Tabulka č. 3

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

03.07.00

Tabulka č. 4

							A	B	C
N76D	S103A	V104I	M222S					1.00	1.00
N76D	S103A	V104I	N173R	M222S			0	0.66	1.84
Q12R	N76D	S103A	V104I	M222S	Q245R		+1	0.41	5.84

Tabulka č. 5

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

Tabulka č. 6

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

Tabulka č. 7

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

Tabulka č. 8

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

03.07.00

Tabulka č. 9

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

Tabulka č. 10

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

Tabulka č. 11

										A	B	C
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.00	1.00
S103A	V104I	G159D	L217E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		-1	1.90	0.15

Tabulka č. 12

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

Tabulka č. 13

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

03.07.00

Příklad 2:

Následující varianty proteáz se připravily a testovaly, jak se popisuje v příkladu 1.

Varianty v tabulce č. 14 jsou varianty proteáz, které vykazují oba typy substitucí: ty, které mění náboj v uvedené poloze, přičemž se zde mění náboj tak, že je více negativní nebo méně negativní ve srovnání s organizmem *B. lentus* GG36 stejně jako neutrální substituce, které neovlivňují náboj v dané poloze zbytku. Tak se produkují proteázové varianty, jejíž účinnost je lepší než standardní účinnost v obou systémech detergentových koncentrací, jak v systému s nízkou koncentrací detergentu (sloupec A, 0,67 g/l filtrovaného Ariel Ultra (Procter and Gamble, Cincinnati, OH, USA), což je roztok, který obsahuje 3 zrna na 3,785 l míchaného Ca2+/Mg2+ a v každé prohlubni se použilo 0,3 ppm enzymu při teplotě 25 °C, tak v systému s vysokou koncentrací detergentu (sloupec B, 3,38 g/l filtrovaného Ariel/Futur (Procter and Gamble; Cincinnati, OH, USA) v roztoku, který obsahuje 15 zrn na 3,785 l míchaného Ca2+/Mg2+ a v každé prohlubni se použilo 0,3 ppm enzymu při teplotě 40 °C).

03.07.00

Tabulka č. 14:

											A	B
N76D	S103A	V104I									1.00	1.00
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K				1.41	1.85
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A		1.30	1.73
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.77	1.20
V68A	S103A	V104I	N140D	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K			2.96	1.42
N43K	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R				2.05	1.78
N43D	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K			2.00	1.34
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A215R	A232V	Q236H	Q245R			1.67	1.45
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R			2.16	1.72
N76D	S103A	V104I	V147I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248S	K251R		1.35	1.29
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	S256R			2.01	1.72
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R			2.09	1.62
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.44	1.41
G20R	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		1.81	1.72
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	L257R		1.51	1.41
V68A	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.04	1.50
N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V				1.92	1.09

03.07.00
PV 2000-1493
48644

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Varianta proteázy obsahující substituci aminokyseliny v jedné nebo více poloh zbytku, kde substituce mění náboj v uvedené poloze, přičemž náboj je více negativní nebo méně pozitivní ve srovnání s prekurzorovou proteázou a kde varianta proteázy je ve srovnání s prekurzorovou proteázou účinnější v systému s nízkou koncentrací detergentu.
2. Varianta proteázy podle nároku 1, kde proteázou je subtilizín.
3. Varianta proteázy podle nároku 1, která se získala ze subtilizínu organizmu *Bacillus*.
4. Varianta proteázy podle nároku 3, která se získala ze subtilizínu organizmu *Bacillus lentus*.
5. DNA kódující variantu proteázy podle nároku 1.
6. Expresívní vektor kódující DNA podle nároku 5.
7. Hostitelská buňka, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se transformovala expresívním vektorem podle nároku 6.
8. Čistící kompozice obsahující variantu proteázy podle nároku 1.
9. Krmení pro zvířata, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje variantu proteázy podle nároku 1.
10. Sloučenina vhodná pro ošetření textilie, obsahující variantu proteázy podle nároku 1.
11. Varianta proteázy obsahující substituci aminokyseliny v jedné nebo více poloh zbytků, kde substituce mění náboj v této poloze, přičemž se náboj stává více pozitivní nebo méně negativní ve srovnání s prekurzorovou proteázou a kde varianta proteázy ve srovnání s prekurzorovou proteázou je více účinná v systému s vysokou koncentrací detergentu.
12. Varianta proteázy podle nároku 11, kde proteázou je subtilizín.

03.07.00

13. Varianta proteázy podle nároku 11, která se získala ze subtilizínu organizmu *Bacillus*.
14. Varianta proteázy podle nároku 13, která se získala ze subtilizínu organizmu *Bacillus lentus*.
15. DNA kódující variantu proteázy podle nároku 11.
16. Expresívní vektor kódující DNA podle nároku 15.
17. Hostitelská buňka, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se transformovala expresívním vektorem podle nároku 16.
18. Čistící kompozice, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje variantu proteázy podle nároku 11.
19. Krmení pro zvířata, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje variantu proteázy podle nároku 11.
20. Sloučenina pro ošetření textilie obsahující variantu proteázy podle nároku 11.
21. Varianta proteázy podle nároku 1, kde vysoká koncentrace detergentu je v prací vodě vyšší než 2 000 ppm.
22. Způsob produkce varianty proteázy, která je ve srovnání s prekurzorovou proteázou účinnější v systému s nízkým, středním a vysokým obsahem detergentu, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje:

a) substituci aminokyseliny v jedné nebo více poloh zbytků, kde substituce mění náboj v této poloze tak, že se stává více pozitivní nebo méně negativní ve srovnání s prekurzorovou proteázou,
b) substituci aminokyseliny v jedné nebo více poloh, kde substituce mění v této poloze náboj tak, že se stává více negativní nebo méně pozitivní ve srovnání s prekurzorovou proteázou,
c) testování varianty, přičemž se stanoví její účinnost v systému s vysokou, střední a nízkou koncentrací detergentu ve srovnání s prekurzorovou proteázou a
d) opakování kroků a) až c), přičemž je nezbytné vytvořit variantu proteázy, která je účinnější ve srovnání s

03.07.00

prekurzorovou proteázou v systému s nízkou, střední nebo vysokou koncentrací detergentu.

23. Varianta proteázy obsahující substituci aminokyseliny v jedné nebo více poloh zbytků, kde substituce změní náboj v poloze tak, že je ve srovnání s prekurzorovou proteázou více pozitivní nebo méně negativní a kde varianta proteázy ve srovnání s prekurzorovou proteázou je účinnější v systému se střední koncentrací detergentu.

24. Varianta proteázy obsahující substituci aminokyseliny v jedné nebo více polohách zbytků, kde substituce změní náboj v poloze tak, že náboj je více negativní nebo méně pozitivní ve srovnání s prekurzorovou proteázou a kde varianta proteázy je ve srovnání s prekurzorovou proteázou účinnější v systému se střední koncentrací detergentu.

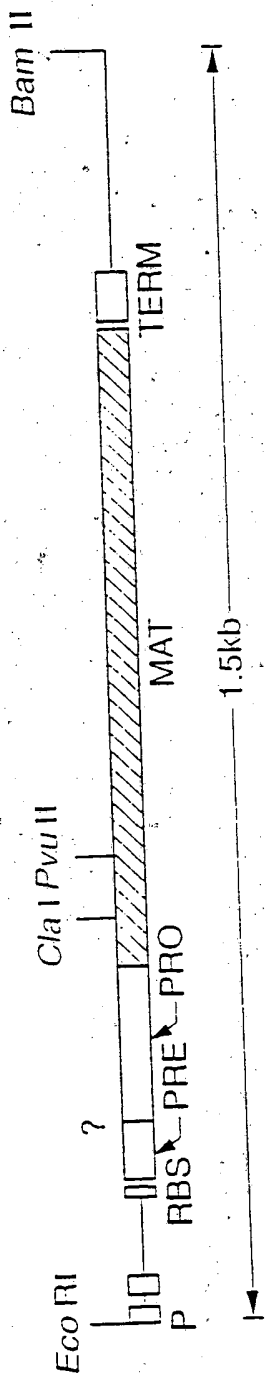


FIG._1A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

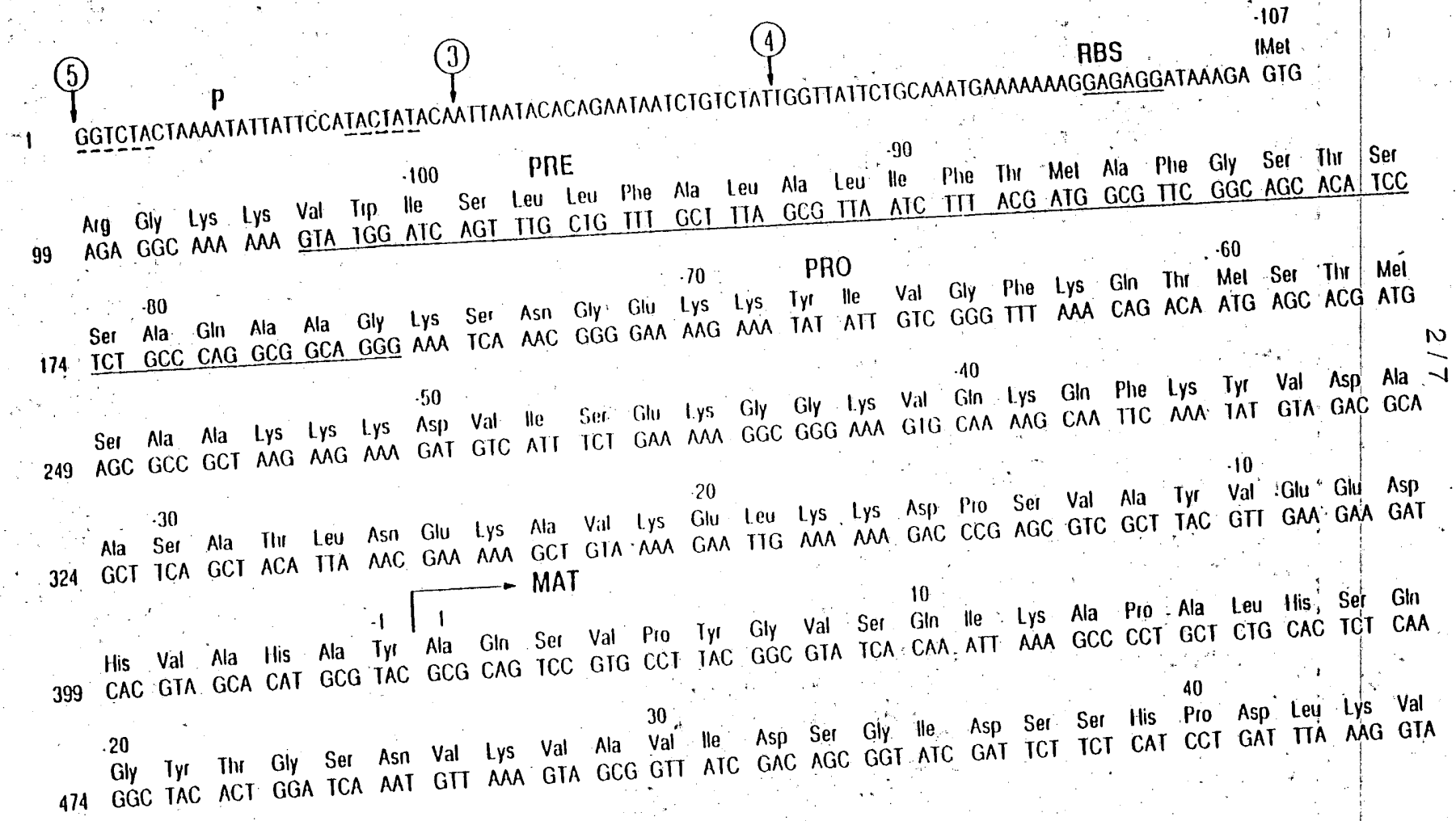


FIG._1B-1

```
                                 50                                      60
                                                     Pro Asn                 Asp
      Ala Gly Gly Ala Ser Met Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Phe Gln Asp Asn Asn Ser His Gly Thr His Val Ala
 549  GCA GGC GGA GCC AGC ATG GTT CCT TCT GAA ACA AAT CCT TTC CAA GAC AAC AAC TCT CAC GGA ACT CAC GTT GCC

      70                                     80                                      90
                                                                     Ser Ala
      Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys
 624  GGC ACA GTT GCG GCT CTT AAT AAC TCA ATC GGT GTA TTA GGC GTT GCG CCA AGC GCA TCA CTT TAC GCT GTA AAA

                          100                                     110
                  Asp Ala
      Val Leu Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu Trp Ala Ile Ala Asn Asn Met
 699  GTT CTC GGT GCT GAC GGT TCC GGC CAA TAC AGC TGG ATC ATT AAC GGA ATC GAG TGG GCG ATC GCA AAC AAT ATG

      120                                        130                                     140
      Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro Ser Gly Ser Ala Ala Leu Lys Ala Ala Val Asp Lys Ala Val Ala
 774  GAC GTT ATT AAC ATG AGC CTC GGC GGA CCT TCT GGT TCT GCT GCT TTA AAA GCG GCA GTT GAT AAA GCC GTT GCA

                              150                                     160
                                                          Ser Thr
      Ser Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Thr Ser Gly Ser Ser Ser Thr Val Gly Tyr Pro Gly
 849  TCC GGC GTC GTA GTC GTT GCG GCA GCC GGT AAC GAA GGC ACT TCC GGC AGC TCA AGC ACA GTG GGC TAC CCT GGT

      170                                    180                                     190
      Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala Val Gly Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly Pro
 924  AAA TAC CCT TCT GTC ATT GCA GTA GGC GCT GTT GAC AGC AGC AAC CAA AGA GCA TCT TTC TCA AGC GTA GGA CCT

                          200                                     210
      Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly
 999  GAG CTT GAT GTC ATG GCA CCT GGC GTA TCT ATC CAA AGC ACG CTT CCT GGA AAC AAA TAC GGG GCG TAC AAC GGT

      220                                    230                                     240
      Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Trp Thr Asn Thr
1074  ACG TCA ATG GCA TCT CCG CAC GTT GCC GGA GCG GCT GCT TTG ATT CTT TCT AAG CAC CCG AAC TGG ACA AAC ACT
```

FIG._1B-2

03·07·00

```
                                 250  Gln                                                    260
      Gln  Val  Arg  Ser  Ser  Leu  Glu  Asn  Thr  Thr  Thr  Lys  Leu  Gly  Asp  Ser  Phe  Tyr  Tyr  Gly  Lys  Gly  Leu  Ile  Asn
1149  CAA  GTC  CGC  AGC  AGT  TTA  GAA  AAC  ACC  ACT  ACA  AAA  CTT  GGT  GAT  TCT  TTC  TAC  TAT  GGA  AAA  GGG  CTG  ATC  AAC

      270                      275
      Val  Gln  Ala  Ala  Ala  Gln  OC              TERM
1224  GTA  CAG  GCG  GCA  GCT  CAG  TAA  AACATAAAAAACCGGCCTTGGCCCCGCCGGTTTTTATTTTTCTTCCTCCGCATGTTCAATCCGCTCC

1316  ATAATCGACGGATGGCTCCCTCTGAAAATTTTAACGAGAAACGGCGGGTTGACCCGGCTCAGTCCCGTAACGGCCAAGTCCTGAAACGTCTCAATCGCCG

1416  CTTCCCGGTTTCCGGTCAGCTCAATGCCGTAACGGTCGGCGGCGTTTTCCTGATACCGGGAGACGGCATTCGTAATCGGATC
```

FIG._1B-3

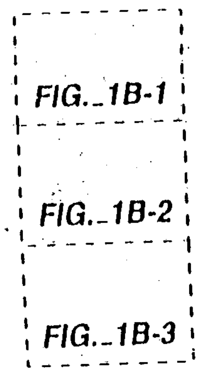


FIG._1B

KONSERVOVANÉ ZBYTKY V SUBTILISINECH Z *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS*

```
1                   10                  20
A Q S V P . G . . . . . A P A . H . . G

21                  30                  40
. T G S . V K V A V . D . G . . . . H P

41                  50                  60
D L . . . G G A S . V P . . . . . Q D

61                  70                  80
. N . H G T H V A G T . A A L N N S I G

81                  90                  100
V L G V A P S A . L Y A V K V L G A . G

101                 110                 120
S G . . S . L . . G . E W A . N . . . .

121                 130                 140
V . N . S L G . P S . S . . . . . A . .

141                 150                 160
. . . . . G V . V V A A . G N . G . . .

161                 170                 180
. . . . . Y P . . Y . . . . A V G A .

181                 190                 200
D . . N . . A S F S . . G . . L D . . A

201                 210                 220
P G V . . Q S T . P G . . Y . . . N G T

221                 230                 240
S M A . P H V A G A A A L . . . K . . .

241                 250                 260
W . . . Q . R . . L . N T . . . L G . .

261                 270
. . Y G . G L . N . . A A . .
```

FIG._2

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Srovnání sekvencí subtilisinu z:

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

```
                                10                  20                  30
01
A Q S V P Y G V S Q I K A P A L H S Q G Y T G S N V K V A V I D S G I D S S H P
A Q S V P Y G I S Q I K A P A L H S Q G Y T G S N V K V A V I D S G I D S S H P
A Q S V P Y G I S Q I K A P A L H S Q G Y T G S N V K V A V L D T G I Q A S H P
A Q T V P Y G I P L I K A D K V Q A Q G F K G A N V K V A V L D T G I S T * H P
A Q S V P W G I S R V Q A P A A H N R G L T G S G V K V A V L D T G I S T H P

                    50                  60                  70
41
D L K V A G G A S M V P S E T N P F Q D N N S H G T H V A G T V A A L N N S I G
D L N V R G G A S F V P S E T N P Y Q D G S S H G T H V A G T I A A L N N S I G
D L N V V G G A S F V A G E A Y N * T D G N G H G T H V A G T V A A L D N T T G
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

                    90                  100                 110
81
V L G V A P S A S L Y A V K V L G A D G S G Q Y S W I I N G I E W A I A N N M D
V L G V S P S A S L Y A V K V L D S T G S G Q Y S W I I N G I E W A I S N N M D
V L G V A P S V S L Y A V K V L N S S G S G S Y S G I V S G I E W A T T N G M D
V L G V A P S A E L Y A V K V L G A S G S G S V S S I A Q G L E W A G N N G M H

                    130                 140                 150
121
V I N M S L G G P S G S A A L K A A V D K A V A S G V V V V A A A G N E G T S G
V I N M S L G G P T G S T A L K T V V D K A V S S G I V V A A A A G N E G S S G
V I N M S L G G A S G S T A M K Q A V D N A Y A R G V V V V A A A G N S G N S G
V A N L S L G S P S P S A T L E Q A V N S A T S R G V L V V A A S G N S G A G S
```

FIG._3A

FIG._3

FIG._3B