

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1996 - 1065
(22) Přihlášeno: 13.10.1994
(30) Právo přednosti:
14.10.1993 US 1993/137240
(40) Zveřejněno: 11.09.1996
(Věstník č. 9/1996)
(47) Uděleno: 31.10.2001
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 16.01.2002
(Věstník č. 1/2002)
(86) PCT číslo: PCT/US94/11562
(87) PCT číslo zveřejnění: WO 95/10615

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/57

C 12 N 9/54

C 12 N 1/21

(73) Majitel patentu:

GENENCOR INTERNATIONAL, INC.,
Rochester, NY, US;

(72) Původce vynálezu:

Graycar Thomas P., Pacifica, CA, US;
Bott Richard R., Burlingame, CA, US;
Wilson Lori J., Millbrae, CA, US;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1,
11000;

(54) Název vynálezu:

Izolovaná varianta subtilisinu

(57) Anotace:

Izolovaná varianta subtilisinu se sekvencí aminokyselin obsahující řadu substitucí jinými přírodními aminokyselinami, přičemž tyto substituce se nacházejí (a) v prekurzoru subtilisinu v poloze, ekvivalentní poloze +76 v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*, přírodní aminokyselina pro substituci se volí ze skupiny A, R, N, C, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y a V a (b) v jedné nebo většinu počtu poloh v prekurzoru subtilisinu, ekvivalentních polohách +27, +99, +101, +103, +104, +105, +107, +109, +123, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265 a +274 subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens*, přičemž aminokyselina v poloze prekurzoru subtilisinu, ekvivalentní poloze +195 v subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens* je substituována odlišnými přírodními aminokyselinami, které se volí ze skupiny A, R, N, D, C, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y a V a aminokyselina v poloze prekurzoru subtilisinu, ekvivalentní poloze +206 v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* je substituována odlišnými přírodními aminokyselinami ze skupiny A, R, N, D, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y a V.

Izolovaná varianta subtilisinu

Oblast techniky

5

Vynález se týká nových variant karboxylhydrolázy, v jejichž řetězci aminokyselin je nahrazena řada zbytků aminokyselin prekurzoru karboxylhydrolázy, zvláště v poloze, odpovídající nebo ekvivalentní zbytku v poloze +76 v kombinaci s jedním nebo větším počtem zbytků v polohách 10 99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265 a/nebo +274 v karboxylhydroláze *Bacillus amyloliquefaciens* (subtilisinu) jinými zbytky aminokyselin. Takové mutanty nebo varianty karboxylhydroláz je obecně možno získat modifikací prekurzorového kódového řetězce DNA pro přírodně se vyskytující nebo rekombinantní karboxylhydrolázu na kódový řetězec pro 15 jiné zbytky aminokyselin jednotlivě nebo v kombinaci s dalšími substitucemi, zařazením nebo vypuštěním dalších aminokyselin v prekurzorovém řetězci aminokyselin.

Serin proteázy tvoří podskupinu karboxylhydroláz. Tyto enzymy zahrnují enzymy různých skupin, specifické pro různé biologické funkce podle publikace Stroud R., Sci. Amer., 131:74 – 20 88. Navzdory funkční odlišnosti těchto enzymů jsou typickými představiteli těchto enzymů dvě geneticky odlišné skupiny těchto enzymů, a to subtilisiny a chymotrypsin savců spolu s homologní bakteriální serinproteázou (například trypsin a trypsin z *S. gresius*). Tyto dvě skupiny serinproteáz mají značně podobný mechanismus katalýzy podle Kraut J., 1977, Ann. Rev. Biochem., 46:331 – 358. Mimoto přesto že primární struktura těchto látek není příbuzná, 25 terciární struktura těchto dvou skupin enzymů obsahuje konzervovaný řetězec tří aminokyselin, nezbytných pro katalytický účinek, trojici těchto aminokyselin tvoří serin, histidin a aspartát.

Subtilis je serinendoproteáza s molekulovou hmotností 27 500, vylučovaná ve velkém množství z mikroorganismů čeledi *Bacillus* a dalších mikroorganismů. Bílkovinný řetězec subtilisinu byl 30 stanoven u nejméně tří odlišných čeledí *Bacillus* podle Markland F. S. a další, 1983, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364:1537 – 1540. Trojrozměrná krystalická struktura subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens* do rozlišení 2,5 Å je popsána v Wright C. S a další, 1969, Nature, 221:235 – 242, Drenth J. a další, 1972, Eur. J. Biochem., 26:177 – 181. Tyto studie prokazují, že přesto že je tento subtilisin geneticky nepříbuzný serinproteázám savců, má podobnou strukturu 35 místa účinku. Krystalická struktura subtilisinu podle analýzy rtg-paprsky obsahuje kovalentně vázané peptidové inhibitory podle Robertus J. D. a další, 1972, Biochemistry, 11:2439 – 2449 nebo různé komplexní struktury podle Robertus J. D. a další, 1976, J. Biol. Chem., 251:1097 – 1103 a poskytuje informaci, týkající se aktivních míst a vazby substrátu na subtilisin. Mimoto byla zveřejněna řada publikací, týkajících se kinetických a chemických modifikací této látky, 40 například Philipp M., a další, 1983, Mol., Cell. Biochem., 51:5 – 32, Svendsen B., 1976, Carlsberg Res. Comm., 41:237 – 291, Markland F. S., tamtéž a byly rovněž podány zprávy o případu, v němž byl postranní řetězec methioninu na zbytku aminokyseliny č. 222 subtilisinu převeden působením peroxidu vodíku na methioninsulfoxid podle Stauffer D. C. a další, 1965, J. Biol. Chem., 244:5333 – 5338 a v postranním řetězci byl serin na zbytku 221 převeden na 45 cystein chemickou modifikací podle Polgar a další, 1981, Biochimica et Biophysica Acta, 667:351 – 354.

V US patentovém spisu č. 4 760 025 (RE 34 606) se popisuje modifikace zbytků aminokyselin subtilisinu v polohách, které odpovídají v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* tyrosinu –1, 50 aspartátu +32, asparaginu +155, tyrosinu +104, methioninu +222, glycinu +166, histidinu +64, glycinu +169, fenylalaninu +189, serinu +33, serinu +221, tyrosinu +217, glutamátu +156 a alaninu +152. V US patentovém spisu č. 5 182 204 se popisuje modifikace zbytku aminokyseliny v poloze +224 subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens* a v odpovídajících polohách jiných subtilisinů, které je možno modifikovat substitucí, přidáním nebo vypuštěním zbytků 55 aminokyselin, což je možno kombinovat s modifikacemi, uvedenými v US patentovém spisu

- č. 4 760 025 za vzniku použitelných mutant nebo variant subtilisinu. US patentový spis č. 5 155 033 popisuje podobné mutanty subtilisinu s modifikací v poloze, ekvivalentní poloze +225 v subtilisinu *B. amyloliquefaciens*. V US patentových spisech č. 5 185 258 a 5 204 015 se popisuje mutanta subtilisinu s modifikací v polohách +123 a/nebo +274. V US patentové přihlášce SN 07/898 382, která již byla zveřejněna, se popisují modifikace celé řady zbytků aminokyselin subtilisinu včetně specifických modifikací v polohách +99, +101, +103, +107, +126, +128, +135, +197 a +204. V US patentovém spisu č. 4 914 031 se popisují některé analogy subtilisinu včetně analogu, modifikovaného v poloze +76.
- 10 Vynález si klade za úkol navrhnout karbonylhydrolázu, s výhodou subtilisin ve formě variant, které obsahují substituci řady zbytků aminokyselin v kódové DNA pro prekurzor karbonylhydrolázy tak, aby tyto substituce odpovídaly poloze +76 v kombinaci s nejméně jednou další polohou ze skupiny +99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265 a/nebo +274
- 15 v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*. Takové varianty zpravidla mají alespoň jednu vlastnost, odlišnou od vlastnosti prekurzoru karbonylhydrolázy, od něž je řetězec aminokyselin uvedené varianty odvozen.
- 20 Novým variantám subtilisinu odpovídají kódové řetězce DNA pro uvedené varianty karbonylhydrolázy a také vektory pro expresi, které obsahují kódové řetězce DNA pro tyto varianty.
- K získání nových variant je možno zkonstruovat hostitelské buňky, transformované svrchu uvedenými vektory, tyto hostitelské buňky by měly být schopné exprese uložené kódové DNA a produkovat varianty karbonylhydrolázy intracelulárně nebo extracelulárně.
- 25 Literární citace, které byly svrchu uvedeny, jsou uváděny pouze pro podrobnější rozbor známého stavu techniky až do dne podání předmětné přihlášky. V žádné z uvedených citací se neuvádí možnost získání variant karbonylhydrolázy podle vynálezu.
- 30 Podstata vynálezu
- Podstatu vynálezu tvoří přírodně se nevyskytující varianty karbonylhydrolázy s odlišnou proteolytickou účinností stabilitou, specifícností pro substrát, profilem účinnosti při různém pH
- 35 a/nebo jinými různými vlastnostmi ve srovnání s prekurzorovou karbonylhydrolázou, z níž jsou tyto varianty odvozeny. Prekurzorovou karbonylhydrolázou může být přírodně se vyskytující karbonylhydroláza nebo také rekombinantní hydroláza. Takové varianty karbonylhydroláz mají řetězec aminokyselin, přírodně se nevyskytující a vytvořený náhradou řady zbytků aminokyselin prekurzorové karbonylhydrolázy jinými aminokyselinami.
- 40 Podstatu vynálezu tedy tvoří izolovaná varianta subtilisinu se sekvencí aminokyselin obsahující řadu substitucí jinými přírodními aminokyselinami, přičemž tyto substituce se nacházejí
- (a) v prekurzoru subtilisinu v poloze, ekvivalentní poloze +76 v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*, přírodní aminokyselina pro substituci se volí ze skupiny A, R, N, C, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y a V a
- 45 (b) v jedné nebo většinu počtu poloh v prekurzoru subtilisinu, ekvivalentních polohách +27, +99, +101, +103, +104, +105, +107, +109, +123, +126, +238, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265 a +274 subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens*,
- 50 přičemž aminokyselina v poloze v prekurzoru subtilisinu, ekvivalentní poloze +195 v subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens* je substituována odlišnými přírodními aminokyselinami, které se volí ze skupiny A, R, N, D, C, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y a V a aminokyselina v poloze
- 55

prekurzoru subtilisinu, ekvivalentní poloze +206 v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* je substituována odlišnými přírodními aminokyselinami ze skupiny A, R, N, D, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y a V.

- 5 Výhodné varianty enzymu podle vynálezu obsahující substituci, vypuštěné nebo přídavné zbytky aminokyselin v následující kombinaci poloh: 76/99, 76/101, 76/103, 76/104, 76/107, 76/123, 76/99/101, 76/99/103, 76/99/104, 76/101/103, 76/101/104, 76/103/104, 76/104/107, 76/104/123, 76/107/123, 76/99/101/103, 76/99/101/104, 76/99/103/104, 76/101/103/104, 76/103/104/123, 76/104/107/123, 76/99/101/103/104, 76/99/103/104/123, 76/99/101/104/104/123, 76/103/104/128, 76/103/104/260, 76/103/104/265, 76/103/104/197, 76/103/104/105, 76/103/104/135, 10 76/103/104/126, 76/103/104/107, 76/103/104/210, 76/103/104/126/265 a/nebo 76/103/104/222. Ve velmi výhodném provedení obsahují varianty enzymu podle vynálezu substituci, vypuštění nebo zařazení dalšího zbytku aminokyseliny v následujících kombinacích poloh: 76/99, 76/104, 76/99/104, 76/103/104, 76/104/107, 76/101/103/104, 76/99/101/103/104 a 76/101/104 15 v subtilisinu *B. amyloliquefaciens*.

- Uvedeným variantám odpovídají také kódové řetězce DNA pro uvedené varianty karbonylhydrolázy nebo subtilisinu. Tyto řetězce DNA jsou odvozeny od prekurzorového řetězce DNA, který je kódovým řetězcem pro přírodně se vyskytující nebo rekombinantní prekurzorový enzym. 20 Řetězce DNA pro tyto varianty jsou odvozeny modifikací řetězce prekurzorové DNA tak, aby tyto řetězce byly kódovými řetězci pro substituci jedné nebo většího počtu aminokyselin, přičemž tyto substituce odpovídají polohám 76, 99, 101, 103, 104, 107, 123, 27, 105, 109, 126, 128, 135, 156, 166, 195, 197, 204, 206, 210, 216, 217, 218, 222, 260, 265 a/nebo 274 v enzymu *Bacillus amyloliquefaciens* nebo v jakékoliv kombinaci těchto poloh. Přestože zbytky aminokyselin, 25 identifikované pro modifikaci, jsou uváděny podle číslování v *B. amyloliquefaciens* vzhledem k tomu, že jde o běžný postup pro identifikaci polohy zbytků ve všech subtilisinech, je výhodným prekurzorovým řetězcem DNA pro použití podle vynálezu DNA z *Bacillus lentus*, tak jak je znázorněna na obr. 6 (řetězec č. 11).

- 30 Řetězce DNA pro varianty enzymu podle vynálezu jsou kódovými řetězci pro uložení nebo substituci zbytku aminokyseliny v poloze 76 v kombinaci s nejméně jednou další modifikací. S výhodou je pozměněná sekvence DNA kódovým řetězcem pro substituci nebo zařazení zbytku některé odlišné aminokyseliny v následujících možných kombinacích poloh: 76/99, 76/101, 76/103, 76/104, 76/107, 76/123, 76/99/101, 76/99/103, 76/99/104, 76/101/103, 76/101/104, 35 76/103/104, 76/104/107, 76/104/123, 76/107/123, 76/99/101/103, 76/99/101/104, 76/99/103/104, 76/101/103/104, 76/103/104/123, 76/104/107/123, 76/99/101/103/104, 76/99/103/104/123, 76/99/101/104/104/123, 76/103/104/128, 76/103/104/260, 76/103/104/265, 76/103/104/197, 76/103/104/105, 76/103/104/135, 76/103/104/126, 76/103/104/107, 76/103/104/210, 76/103/104/126/265 a/nebo 76/103/104/222. Ve velmi výhodném provedení je pozměněná 40 sekvence DNA kódovým řetězcem pro modifikaci těchto kombinací: 76/99, 76/104, 76/99/104, 76/103/104, 76/104/107, 76/101/103/104, 76/99/101/103/104 a 76/101/104. Tyto rekombinantní sekvence DNA jsou kódovými řetězci pro varianty karbonylhydrolázy s novými řetězci aminokyselin a obecně s nejméně jednou vlastností, podstatně odlišnou od vlastností enzymu, pro něž je kódovým řetězcem prekurzorová DNA. Z pozměněných vlastností je možno uvést 45 zejména proteolytickou účinnost, specifickou pro substrát, stálost, pozměněný profil účinnosti při různých hodnotách pH a/nebo odlišnou charakteristiku účinnosti.

- Vynález zahrnuje substituci jakéhokoliv zbytku z devatenácti přírodně se vyskytujících zbytků L-aminokyselin v uvedených polohách. Tyto substituce je možno uskutečnit v kterémkoliv 50 prekurzoru subtilisinu z prokaryotického nebo eukaryotického organismu, ze savce a podobně. Substituce, které lze s výhodou uskutečnit na každém ze zbytků aminokyselin v identifikovaných polohách, zahrnují, avšak nejsou omezeny na následující substituce: substituce v poloze 76 zahrnuje D, H, E, G, F, K, P a N, substituce v poloze 99 zahrnuje D, T, N, Q, G a S, substituce v poloze 101 zahrnuje G, D, K, L, A, E, S a R, substituce v poloze 103 zahrnuje Q, T, D, E, Y, K, 55 G, R, S a A, substituce v poloze 104 zahrnuje všech devatenáct přírodně se vyskytujících

aminokyselin, substituce v poloze 107 zahrnuje V, L, M, Y, G, E, F, T, S, A, N a I, substituce v poloze 123 zahrnuje N, T, I, G, A, C a S, substituce v poloze 27 zahrnuje K, N, C, V a T, substituce v poloze 105 zahrnuje A, D, G, R a N, substituce v poloze 107 zahrnuje A, L, V, Y, G, F, T, S a A, substituce v poloze 109 zahrnuje S, K, R, A, N a D, substituce v poloze 126 zahrnuje A, F, I, V a G, substituce v poloze 128 zahrnuje G, L a A, substituce v poloze 135 zahrnuje A, F, I, S a V, substituce v poloze 156 zahrnuje D, E, A, G, Q a K, substituce v poloze 166 zahrnuje všech devatenáct přírodně se vyskytujících aminokyselin, substituce v poloze 195 zahrnuje E stejně jako substituce v poloze 197, substituce v poloze 204 zahrnuje A, G, C, S a D, substituce v poloze 206 zahrnuje L, Y, N, D a E, substituce v poloze 210 zahrnuje L, I, S, C a F, substituce v poloze 216 zahrnuje V, E, T a K, substituce v poloze 217 zahrnuje všech devatenáct přírodně se vyskytujících aminokyselin, substituce v poloze 218 zahrnuje S, A, G, T a V, substituce v poloze 222 zahrnuje všech devatenáct přírodně se vyskytujících aminokyselin, substituce v poloze 260 zahrnuje P, N, G, A, S, C, K a D, substituce v poloze 265 zahrnuje N, G, A, S, C, K, Y a H, a substituce v poloze 274 zahrnuje A a S. Vynález však není na uvedené typy substitucí omezen. Specifické výhodné aminokyseliny pro každou polohu jsou dále uvedeny v tabulce I. Přestože v této tabulce jsou uvedeny určité aminokyseliny, je možno v uvedených polohách k substituci použít jakoukoliv jinou aminokyselinu.

20 Tabulka I

zbytek aminokyseliny

výhodná aminokyselina pro substituci

-76	D, H
+99	D, T, N, G
+101	R, G, D, K, L, A, E
+103	A, Q, T, D, E, Y, K, G, R
+104	I, Y, S, L, A, T, G, F, M, W, D, V, N
+107	V, L, Y, G, F, T, S, A, N
+123	S, T, I
+27	K
+105	A, D,
+109	S, K, R
+126	A, I, V, F
+128	G, L
+135	I, A, S
+156	E, D, Q
+166	D, G, E, K, N, A, F, I, V, L
+195	E
+197	E
+204	A, G, C
+206	L
+210	I, S, C
+216	V
+217	H, I, Y, C, A, G, F, S, N, E, K
+218	S
+222	A, Q, S, C, I, K
+260	P, A, S, N, G
+265	N, A, G, S
+274	A, S

25 Vynález dále zahrnuje vektory pro expresi, obsahující pozměněnou sekvenci DNA a hostitelské buňky, transformované takovými vektory a schopné produkce uvedených variant. Tyto varianty je možno použít v čisticích prostředcích.

Přehled obrázků na výkresech

Na obr. 1 A–C je znázorněna sekvence DNA a řetězec aminokyselin pro subtilisin *Bacillus amyloliquefaciens* a částečná mapa restričních míst pro tento gen (řetězec č. 6).

Na obr. 2 jsou znázorněny konzervované zbytky aminokyselin v subtilisinech z *Bacillus amyloliquefaciens* (BPN) a z *Bacillus lentus* (divoký typ).

Na obr. 3A a 3B jsou znázorněny řetězce aminokyselin pro čtyři druhy subtilisinu. V horním řádku je uveden řetězec aminokyselin pro subtilisin z *Bacillus amyloliquefaciens* (uváděný také jako subtilisin BPN', řetězec č. 7). V druhém řádku je uveden řetězec aminokyselin pro subtilisin z *Bacillus subtilis* (řetězec č. 8). Ve třetím řádku je znázorněn řetězec aminokyselin pro subtilisin z *B. olicheniformis* (řetězec č. 9). Ve čtvrtém řádku je znázorněn řetězec aminokyselin pro subtilisin z *Bacillus lentus* (uváděný také jako subtilisin 309 v PCT WO89/06276, řetězec č. 10). Označení hvězdičkou označuje nepřítomnost specifického zbytku aminokyseliny ve srovnání s řetězcem subtilisinu BPN'.

Na obr. 4 je znázorněna konstrukce plazmidu GGA274.

Na obr. 5 je znázorněna konstrukce GGT274, který je meziproduktem pro získání některých plazmidů pro expresi pro použití podle vynálezu.

Na obr. 6A a 6B je znázorněna sekvence DNA a řetězec aminokyselin pro subtilisin z *Bacillus lentus* (řetězec č. 11). Kódem pro úplnou bílkovinu jsou v tomto případě kodony, začínající od kodonů GCG (334–336), který odpovídá Ala.

Na obr. 7A a 7B je znázorněna sekvence 7A a řetězec aminokyselin pro výhodné provedení podle vynálezu, N76D/S103A/V104I, (řetězec č. 12). DNA byla v tomto případě modifikována popsáním způsobem tak, aby šlo o kódový řetězec pro aspartát v poloze 76, alanin v poloze 103 a isoleucin v poloze 104. Kódový řetězec pro úplnou variantu subtilisinu začíná na kodonu GCG (334–336), který odpovídá Ala.

Na obr. 8 je znázorněna konstrukce vektoru pro expresi pBcDAICAT.

Na obr. 9 je znázorněna konstrukce vektoru pro expresi pUCCATFINA.

Na obr. 10 je znázorněna stabilita výhodné mutanty enzymu ve srovnání se stabilitou divokého enzymu v kapalném čisticím prostředí.

Bylo prokázáno, že při uskutečnění mutací in vitro v subtilisinu z *B. lentus* v poloze, ekvivalentní zbytku aminokyseliny v poloze +76 v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* vznikají varianty subtilisinu, které mají odlišnou stabilitu (například odlišnou autoproteolytickou stabilitu) ve srovnání s prekurzorovým subtilisinem, jak je také uvedeno v tabulkách IV a VI.

Bylo rovněž zjištěno, že při mutaci in vitro na zbytcích aminokyselin, které jsou ekvivalentní polohám +99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265 a/nebo +274 v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* jednotlivě nebo ve vzájemných kombinacích a v jakékoliv kombinaci s mutací v poloze +76 vznikají varianty subtilisinu s odlišnou proteolytickou účinností, tepelnou stálostí, pozměněným profilem účinnosti při různém pH, odlišnou specifičností pro substrát a dalšími změnami.

Karboxylhydrolázy jsou enzymy, které hydrolyzují sloučeniny, obsahující skupiny obecného vzorce



kde X znamená atom kyslíku nebo atom dusíku. Tyto látky zahrnují přírodně se vyskytující karboxylhydrolázy i rekombinantní karboxylhydrolázy. Přírodně se vyskytující enzymy zahrnují hydrolázy, například hydrolázy peptidů, jako subtilisiny nebo metalloproteázy. Hydrolázy peptidů zahrnují hydrolázy alfa-aminoacylpeptidů, peptidylaminokyselin, dále acylamino-hydrolázy, serinkarboxypeptidázy, metallokarboxypeptidázy, thiolproteínázy, karboxylproteínázy a metalloproteínázy. Zahrnuty jsou serinproteáza, metalloproteáza, thiolproteáza a kyselé proteázy, stejně jako endoproteázy a exoproteázy.

Rekombinantní karboxylhydroláza je taková hydroláza, v níž je kódový řetězec DNA přírodně se vyskytující karboxylhydrolázy modifikován za vzniku mutované sekvence DNA, která je kódem pro substituci, zařazení nebo vypuštění jedné nebo většího počtu aminokyselin v řetězci aminokyselin karboxylhydrolázy. Vhodné postupy jsou uvedeny v předmetné přihlášce a byly již uvedeny také v US patentových spisech č. 4 760 025, 5 204 015 a 5 185 258.

Subtilisiny jsou bakteriální nebo houbové karboxylhydrolázy, které obecně štěpí peptidové vazby bílkovin nebo peptidů. Pod tímto pojmem s tedy rozumí přírodně se vyskytující i rekombinantní subtilisiny. Je známo, že řada přírodně se vyskytujících subtilisinů, je produkováno a často také vylučováno různými druhy mikroorganismů. Řetězce aminokyselin enzymů z této skupiny nejsou zcela homologní. Subtilisiny této skupiny však mají stejný nebo obdobný typ proteolytické účinnosti. Tato skupina serinproteáz obsahuje společný řetězec aminokyselin, definující katalytickou triasu, která je odlišuje od jiné skupiny serinproteáz, která je příbuzná chymotrypsinu. Serinproteázy příbuzné subtilisinu a chymotrypsinu mají katalytickou trojici aminokyselin aspartát, histidin a serin. V proteázách, příbuzných subtilisinu je pořadí těchto aminokyselin od aminoterminálního konce ke karboxyterminálnímu konci aspartát-histidin-serin. V proteázách, příbuzných chymotrypsinu je však toto pořadí histidin-aspartát-serin. Subtilisin je tedy serinproteáza, v níž odpovídá pořadí uvedených tří aminokyselin pořadí v subtilisinu. Příklady jsou uvedeny například na subtilisinech z obr. 3.

Rekombinantní subtilisin je subtilisin, jehož kódová sekvence DNA byla modifikována za vzniku pozměněné nebo mutované sekvence DNA, která je kódem pro náhradu, vypuštění nebo zařazení jedné nebo většího počtu aminokyselin do přírodně se vyskytujícího řetězce aminokyselin pro subtilisin. Vhodné postupy pro tyto modifikace, které je možno kombinovat s postupy, uváděnými v této přihlášce, byly popsány v US patentových spisech č. 4 760 025, 5 204 015 a 5 185 258.

Karboxylhydrolázy, odlišné od enzymů lidského původu a příslušné kódové DNA je možno získat z celé řady prokaryotických i eukaryotických organismů. Jako vhodné příklady prokaryotických organismů je možno uvést gramnegativní organismy, jako E. coli nebo Pseudomonas a gram pozitivní bakterie, jako Micrococcus nebo Bacillus. Příkladem eukaryotických organismů, z nichž je možno připravit karboxylhydrolázu a její geny, jsou také kvasinky, jako Saccharomyces cerevisiae, houby, jako Aspergillus (celá čeleď) a také savci, odlišní od člověka, jako skot. Ze skotu je například možno získat gen pro karboxylhydrolázu chymosin. Stejně jako v případě subtilisinů, je možno získat z příbuzných čeledí řadu karboxylhydroláz, jejichž řetězce aminokyselin nejsou zcela homologní, které však přesto mají stejný nebo podobný typ biologické účinnosti. Karboxylhydroláza jiného než lidského původu je tedy pouze funkční pojem, který se týká enzymů, přímo nebo nepřímo spojených s prokaryotickými a eukaryotickými organismy.

Varianta karbonylhydrolázy obsahuje řetězec aminokyselin, který je odvozen od tak zvané
 prekurzorové karbonylhydrolázy. Prekurzorová karbonylhydroláza, například subtilisin zahrnuje
 přírodně se vyskytující i rekombinantní enzymy. Řetězec aminokyselin varianty enzymu je
 5 „odvozen“ od řetězce aminokyselin prekurzorové hydrolázy tak, že se nahradí, vypustí nebo
 zařadí jeden nebo větší počet zbytků aminokyselin v prekurzorovém řetězci. Tato modifikace se
 provádí v příslušné sekvenci DNA pro řetězec prekurzorů, která je kódem pro řetězec amino-
 kyselin prekurzorové karbonylhydrolázy, například subtilisinu a nikoliv přímou manipulací ve
 vlastním řetězci enzymu. Vhodné postupy pro zpracování sekvence DNA pro prekurzorový
 10 enzym zahrnují postupy, uvedené v této přihlášce a také známé postupy, které byly uvedeny
 například v EP 328 299, WO/89/06279 a ve svrchu uvedených US patentových spisech.

Pro mutaci jsou vhodné polohy, které odpovídají polohám zbytků aminokyselin +76, popřípadě
 v kombinaci s jedním nebo větším počtem zbytků aminokyselin v polohách +99, +101, +103,
 15 +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206,
 +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265 a/nebo +274 subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*.
 Výhodnými kombinacemi jednotlivých poloh pro modifikaci zbytků aminokyselin jsou tyto
 kombinace: 76/99, 76/101, 76/103, 76/104, 76/107, 76/123, 76/99/101, 76/99/103, 76/99/104,
 20 76/101/103, 76/101/104, 76/103/104, 76/104/107, 76/104/123, 76/107/123, 76/99/101/103,
 76/99/101/104, 76/99/103/104, 76/101/103/104, 76/103/104/123, 76/104/107/123, 76/99/101/-
 103/104, 76/101/103/104/123, 76/99/101/104/104/123, 76/103/104/128, 76/103/104/260,
 76/103/104/265, 76/103/104/197, 76/103/104/105, 76/103/104/135, 76/103/104/126, 76/103/-
 104/107, 76/103/104/210, 76/103/104/126/265 a/nebo 76/103/104/222. Nejvýhodnějšími
 polohami pro kombinace jsou polohy 76/99, 76/104, 76/99/104, 76/103/104, 76/104/107,
 25 76/101/103/104, 76/99/101/103/104 a 76/101/104. Tyto polohy aminokyselin odpovídají
 polohám pro úplný subtilisin *Bacillus amyloliquefaciens*, tak jak je znázorněn na obr. 1. Vynález
 však není omezen na mutace tohoto specifického subtilisinu, avšak týká se také prekurzorových
 karbonylhydroláz, které obsahují zbytky aminokyselin v polohách, které jsou „ekvivalentní“
 k uvedeným zbytkům v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*. Ve výhodném provedení
 30 vynálezu je prekurzorovým subtilisinem subtilisin z *Bacillus lentus* a náhrady, vypuštění nebo
 zařazení zbytků aminokyselin se uskuteční na ekvivalentním zbytku aminokyselin *B. lentus*,
 odpovídajícím svrchu uvedeným polohám.

Zbytek aminokyseliny v prekurzorové karbonylhydroláze je ekvivalentní zbytku v subtilisinu
 35 *Bacillus amyloliquefaciens* v případě, že je homologní (to znamená odpovídá poloze v primární
 nebo terciární struktuře) nebo je analogický specifickému zbytku nebo části tohoto zbytku
 (to znamená, že má odpovídající nebo podobnou funkční schopnost chemické vazby, reakce
 nebo interakce).

Aby bylo možno zhodnotit homologii s primární strukturou, srovnává se řetězec aminokyselin
 prekurzorové karbonylhydrolázy přímo s primárním řetězcem subtilisinu z *Bacillus amylolique-*
faciens a zvláště se skupinou zbytků, o nichž je známo, že se v řetězcích známých subtilisinů
 nemění. Na obr. 2 jsou znázorněny tyto konzervované zbytky v subtilisinech z *B. amylolique-*
faciens a *B. lentus*. Jakmile se srovnávají řetězce tak, že se konzervované zbytky zařadí nad sebe,
 45 je možno definovat ekvivalentní zbytky, které odpovídají určitým zbytkům aminokyselin
 v primárním řetězci subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens*. S výhodou musí nový enzym
 obsahovat 100 % konzervovaných zbytků, nebo alespoň více než 75 % těchto zbytků, často však
 stačí pouze 50 % konzervovaných zbytků k určení poloh ekvivalentních zbytků aminokyselin.
 Zvláště je zapotřebí zachovat beze změny katalytickou triasu Asp32/His64/Ser221.

Například na obr. 3 jsou srovnány řetězce aminokyselin pro subtilisiny z *Bacillus amylolique-*
faciens, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* (carlsbergensis) a *Bacillus lentus* tak, aby byla
 zřejmá homologie mezi jednotlivými řetězci aminokyselin. Ze srovnání je zřejmé, že každý
 z řetězců obsahuje celou řadu konzervovaných zbytků. Tyto zbytky, například mezi BPN'
 55 a *B. lentus* jsou identifikovány na obr. 2.

Je tedy zřejmé, že tyto konzervované zbytky je možno užít k definování odpovídajících ekvivalentních zbytků aminokyselin subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens* v jiných karbonylhydrolázách, například z *Bacillus lentus*, jehož řetězec je uveden v PCT WO 89/06279, zveřejnění 13. července 1989. Jde o výhodný prekurzorový enzym, je však také možno použít subtilisin, označovaný PB92 a popsáný v EP 329 299, který je vysoce homologní s výhodným subtilisinem z *Bacillus lentus*. Řetězce aminokyselin pro některé tyto subtilisiny jsou srovnány na obr. 3A a 3B s řetězcem subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens* k získání maximální homologie konzervovaných zbytků. Jak je zřejmé, existuje několik vypouštěných částí, řetězce v řetězci enzymu z *Bacillus lentus* ve srovnání se subtilisinem z *Bacillus amyloliquefaciens*. Ekvivalentní aminokyselinou pro Val65 v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* je v subtilisinu z *B. lentus* a *B. licheniformis* například isoleucin.

Aminokyselina v poloze +76 v subtilisinu z *B. amyloliquefaciens* a *B. lentus* je asparagin N. Ve výhodném variantě subtilisinu podle vynálezu je však v poloze +76 tato aminokyselina nahrazena aspartátem D. Pro ilustrativní účely je v následující tabulce II uvedeno srovnání některých zbytků aminokyselin, identifikovaných při substituci a nejvýhodnější substitute pro každou polohu.

20

Tabulka II

	+76	+99	+101	+103	+104	+107	+123
B. amyloliquefaciens (divoký typ)	N	D	S	Q	Y	I	N
B. lentus (divoký typ)	N	S	S	S	V	I	N
nejvýhodnější substitute	D	D	R	A	I/Y	V	S

Ekvivalentní zbytky je také možno definovat stanovením homologie na úrovni terciární struktury pro prekurzorovou karbonylhydrolázu, jejíž terciární struktura byla stanovena krystalograficky pomocí rtg-záření. Ekvivalentní zbytky jsou definovány jako ty zbytky, pro které atomové koordináty dvou nebo většího počtu hlavních atomů v určitém řetězci aminokyselin prekurzorové karbonylhydrolázy a subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens* (N na N, CA na CA, C na C a O na O) jsou nejvýše 0,12 nm a s výhodou 0,1 nm po srovnání řetězců. Toho je dosaženo po správné orientaci a umístění do polohy, v níž se maximálně překrývají atomové koordináty atomu bílkovin, odlišných od vodíkových atomů karbonylhydrolázy a subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*. Nejlepším modelem je krystalografický model, uvádějící nejnižší faktor R pro experimentální difrakci při nejvyšším dostupném rozlišení.

35

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

Ekvivalentní zbytky, které jsou funkčně analogické specifickým zbytkům v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* jsou definovány jako ty aminokyseliny v prekurzorové karbonylhydroláze, které mohou pozměnit, nebo také modifikovat strukturu bílkoviny, mohou se vázat na substrát nebo katalyzovat reakci obdobným způsobem, jako specifický zbytek v subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens*. Mimoto existují v prekurzorové karbonylhydroláze zbytky (pro které byla stanovena terciární struktura krystalografií v rtg-záření), které jsou uloženy v analogických polohách, přestože hlavní atomy řetězce daného zbytku nesplňují požadavky ekvivalence podle homologní polohy, podle atomových koordinát, které pro nejméně dva atomy postranního řetězce zbytku leží v rozmezí od 0,13 nm, vzhledem k odpovídajícím atomům postranního řetězce subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*. Koordináty pro trojrozměrnou strukturu subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* byly uvedeny v EP 251 446 a je možno je použít ke stanovení ekvivalentních zbytků aminokyselin na bázi terciární struktury.

Některé ze zbytků, identifikovaných pro substituci, zařazení nebo vypuštění pro konzervované zbytky, jiné nikoliv. V případě nekonzervovaných zbytků je náhrada jedné nebo většího počtu aminokyselin omezena na substituce, při jejichž použití vznikne varianta s řetězcem aminokyselin, odlišným od existujícího přírodního řetězce. V případě konzervovaných zbytků by rovněž náhradou neměl vzniknout přírodně se vyskytující řetězec. Varianty karbonylhydrolázy podle vynálezu zahrnují úplné varianty karbonylhydrolázy a také prekurzory a prekurzory prekurzorů těchto variant. Prekurzory prekurzorů jsou velmi výhodné vzhledem k tomu, že mohou usnadnit expresi, vylučování a vytvoření úplných variant karbonylhydroláz.

Řetězec prekurzorů je řetězec aminokyselin, vázaný na N-terminální část zralé formy karbonylhydrolázy, po jehož odstranění vzniká „zralá“ forma karbonylhydrolázy. Řada proteolytických enzymů se vyskytuje jako translační prekurzorové látky ve formě proenzymu a v případě, že nedojde k posttranslačnímu zpracování, dochází k jejich expresi v této podobě. Výhodný řetězec prekurzoru pro varianty karbonylhydrolázy, zvláště subtilisinu, je ten řetězec, který je obsažen v prekurzoru subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*, je však možno užít i jiné řetězce. V příkladech 1 a 2 byl například použit řetězec ze subtilisinu z *Bacillus lentus*, ATCC 21536.

Signální řetězec je řetězec aminokyselin, vázaný na N-terminální část karbonylhydrolázy nebo prohydrolázy, který se může účastnit sekrece zralé formy nebo prekurzoru hydrolázy. Tato definice signálního řetězce je funkční a má zahrnovat všechny řetězce aminokyselin, pro něž je kódem N-terminální část genu pro subtilisin nebo jinou vylučování schopnost karbonylhydrolázy, řetězec se účastní vylučování těchto enzymů za přírodních podmínek. Podle vynálezu se takového řetězce využívá k dosažení sekrece variant karbonylhydrolázy. Výhodný signální řetězec, užitý v příkladové části obsahuje prvních sedm zbytků aminokyselin ze signálního řetězce subtilisinu z *Bacillus subtilis*, tento řetězec je navázán na zbytek signálního řetězce subtilisinu z *Bacillus lentus* ATCC 21536.

Prekurzor prekurzoru varianty karbonylhydrolázy je tvořen zralou formou hydrolázy s řetězcem prekurzoru, operativně vázaným na aminoterminální konec hydrolázy a se signálním řetězcem, operativně vázaným na aminoterminální konec prekurzoru.

Vektor pro expresi je konstrukce, obsahující sekvenci DNA, operativně vázanou na vhodný řídicí řetězec, schopný uskutečnění exprese takové DNA ve vhodném hostiteli. Řídicí řetězec zahrnují promotory k dosažení transkripce, případný operátorový řetězec pro řízení této transkripce, kódový řetězec pro vhodné místo pro vazbu mRNA ribosomu a řetězce, které řídí ukončení transkripce a translace. Vektorem může být plazmid, částice fagu nebo jednoduše potenciální řetězec genomu, určený pro uložení. Po transformaci v příslušném hostiteli může docházet k replikaci vektoru a jeho funkci nezávisle na genomu hostitele nebo může v některých případech dojít k integraci do genomu hostitele. V průběhu přihlášky se pojmy „plazmid“ a „vektor“ používají zaměnitelně vzhledem k tomu, že plazmid je nejběžnější užívanou formou vektoru v současné době. Avšak vynález zahrnuje i jiné formy vektorů pro expresi, které jsou v oboru známy a mohou rovněž splnit příslušnou funkci.

Hostitelskými buňkami jsou obvykle prokaryotické nebo eukaryotické hostitelské buňky, které byly s výhodou předběžně zpracovány postupy, popsanými například v US patentovém spisu č. 4 760 025, tak, aby nebyly schopné vylučovat enzymaticky účinnou endoproteázu. Výhodnou hostitelskou buňkou pro expresi subtilisinu je kmen *Bacillus* BG2036, který neprodukuje enzymaticky účinnou neutrální proteázu ani alkalickou proteázu, to znamená vlastní subtilisin. Konstrukce kmene GB2036 je podrobně popsán v US 5 264 366. Dalšími hostitelskými buňkami, vhodnými pro expresi subtilisinu jsou *Bacillus subtilis* I168, rovněž popsán v US 4 760 025 a US 5 264 366 a také jakýkoliv jiný vhodný kmen *Bacillus*, jako *B. licheniformis*, *B. lentus* a podobně.

Hostitelské buňky se transformují nebo se podrobí transfekci při použití vektorů, zkonstruovaných rekombinantní technikou. Transformované hostitelské buňky jsou schopné

replikace vektorů, obsahujících kód pro varianty karbonylhydrolázy nebo přímou exprese požadované varianty karbonylhydrolázy. V případě vektorů, obsahujících kód pro prekurzor nebo pro prekurzor prekurzoru varianty karbonylhydrolázy dochází po expresi v typických případech k sekreci varianty z hostitelské buňky do živního prostředí.

5

Pod pojmem „operativně vázaný“ se při popisu vztahu mezi dvěma oblastmi DNA rozumí skutečnost, že obě oblasti jsou spolu funkčně spojeny. Například řetězec prekurzoru je operativně vázán na peptid v případě, že působí jako signální řetězec a účastní se vylučování zralé formy bílkoviny, což pravděpodobně zahrnuje také odštěpení signálního řetězce. Promotor je operativně vázán na kódový řetěz v případě, že řídí transkripci řetězce. Místo pro vazbu ribosomu je operativně vázáno na kódový řetězec v případě, že jeho poloha dovoluje zahájení translace.

10

Gen s kódovým řetězcem pro přírodně se vyskytující prekurzor karbonylhydrolázy je možno připravit běžnými postupy. Tyto postupy obvykle zahrnují přípravu značených sond s kódovými řetězci pro určité oblasti požadované hydrolázy, přípravu souborů genomu z organismu, u něž dochází k expresi hydrolázy a pak prozkoumání tohoto souboru za účelem vyhledání požadovaného genu hybridizací s příslušnou sondou. Pozitivně hybridizující klony se pak podrobí analýze řetězce a vytvoří se mapa restričních míst. Gen z *B. lentus*, použitý v příkladové části byl klonován způsobem podle příkladu 1 US patentového spisu č. 5 185 258.

Gen pro BPN' užitý v příkladu 5 byl klonován způsobem, popsaným v příkladu US 4 760 025 (RE 34 606).

15

20

Klonovaná karbonylhydroláza se pak užije k transformaci hostitelských buněk tak, aby došlo k expresi hydrolázy. Gen pro hydrolázu se naváže do plazmidu při vysokém počtu kopií. K replikaci plazmidu dochází v hostiteli, který obsahuje známé prvky, nezbytné pro replikaci plazmidu, to znamená promotor, operativně vázaný na příslušný kmen, může také jít o homologní promotor genu v případě, že k jeho transkripci dochází v použitém hostiteli, dále musí být přítomna oblast pro ukončení transkripce a polyadenylační oblast, nutná pro stabilizaci mRNA při transkripci hostitele z genu pro hydrolázu v některých eukaryotických hostitelských buňkách, tato oblast je exogenní nebo je obsažena v endogenní terminační oblasti genu pro hydrolázu, mimoto by měl být gen pro hydrolázu vázán ještě na gen, dovolující budoucí selekci, například na gen pro odolnost proti antibiotikům, který umožní pěstování hostitelské buňky, infikované plazmidem na živné prostředí s obsahem antibiotika. Plazmidy s vysokým počtem kopií mimoto obsahují počátek replikace hostitele, čímž se umožní vznik velkého počtu plazmidů bez omezení chromosomy. Je tedy možno také integrovat velký počet kopií genu pro hydrolázu do genomu hostitele. To je usnadněno povahou prokaryotických a eukaryotických organismů, u nichž je snadno možno dosáhnout homologní rekombinace.

25

30

35

Geny, užitě v příkladové části jsou přírodní gen z *B. lentus* a přírodní gen z *B. amyloliquefaciens*. Je však možno připravit také syntetický gen, který je kódem pro přírodně se vyskytující nebo mutovaný prekurzor karbonylhydrolázy. V tomto případě se stanoví řetězec aminokyselin a/nebo sekvence DNA pro prekurzor hydrolázy. Pak se syntetizují překrývající se fragmenty DNA s jednoduchým řetězcem, z nichž vznikne po hybridizaci a vazbě syntetická kódová DNA pro prekurzorovou hydrolázu. Jako příklad konstrukce syntetického genu je možno uvést postup, uvedený v příkladu 3 US patentového spisu č. 5 204 015.

40

45

Jakmile byl gen pro přírodně se vyskytující nebo syntetickou prekurzorovou karbonylhydrolázu klonován, je možno uskutečnit řadu modifikací k výhodnějšímu použití genu při syntéze přírodně se vyskytující prekurzorové karbonylhydrolázy. Tyto modifikace zahrnují přípravu rekombinantních karbonylhydroláz podle US 4 760 025 (RE 34 606) a podle EP 251 446 a také dále popsanou produkci variant karbonylhydrolázy.

50

Následující tvorbu mutací při použití kazet je možno použít k usnadnění konstrukce a identifikace variant karbonylhydrolázy podle vynálezu, i když je možno použít i jiné postupy, včetně cílové tvorby mutací. Nejprve se připraví přírodně se vyskytující kódový gen pro

55

- hydrolázu a jeho řetězec se zcela nebo z části analyzuje. Pak se stanoví místo, v němž je žádoucí uskutečnit mutaci ve smyslu vypuštění, zařazení nebo náhrady jedné nebo většího počtu aminokyselin v kódovém řetězci pro enzym. Řetězce, sousedící s tímto místem se vyhodnotí na přítomnost míst působení restričních enzymů tak, aby bylo možno krátký úsek genu nahradit směsí oligonukleotidů, které povedou po expresi ke vzniku kódových řetězců pro různé mutanty. S výhodou se vyhledávají jediná místa působení restričních enzymů v celém řetězci genu pro hydrolázu k usnadnění náhrady úseku genu. Je však možno použít zásadně jakékoliv místo působení restričního enzymu, které se v řetězci genu, vzniklé štěpením je možno znovu sestavit ve správném pořadí. V případě, že nejsou k dispozici místa působení restričních enzymů ve vhodné vzdálenosti od zvoleného místa (v rozmezí 10 až 15 nukleotidů), je zapotřebí taková místa vytvořit substitucí nukleotidů v genu tak, aby nedošlo ke změně čtecího rámce ani výsledných aminokyselin, pro něž je řetězec kódem. Mutace genu na žádoucí řetězec může být uskutečněna extensí při použití primeru M13 známým způsobem. Uložení vhodných postranních oblastí a vyhodnocení nutných změn pro dosažení dvou vhodných míst působení restričních enzymů je běžnou záležitostí po přípravě mapy působení restričních enzymů v průběhu celého genu s ohledem na velké množství existujících použitelných enzymů. V případě, že se vhodná oblast nachází alespoň na jedné straně, je možno uvedeným způsobem zpracovat pouze tu stranu, na níž přirozené místo působení restričního enzymu chybí.
- 20 Jakmile dojde ke klonování přírodně se vyskytující nebo syntetické DNA, rozštěpí se příslušná restriční místa v blízkosti poloh, v nichž má dojít k mutaci pomocí příslušných restričních enzymů a fragmenty genů se podrobí vazbě při použití celé řady kazet, komplementárních k příslušnému zakončení a obsahujících oligonukleotidy. Tímto způsobem se tvorba mutace usnadní vzhledem k tomu, že všechny oligonukleotidy je možno syntetizovat tak, aby obsahovaly totéž místo působení restričního enzymu a není tedy zapotřebí použít syntetické vazby řetězce pro tvoření těchto míst.

- Proteolytická účinnost je definována jako rychlost hydrolýzy peptidových vazeb na mg enzymu. Pro měření proteolytické účinnosti je známa celá řada postupů, popsanych například v souhrnné publikaci K. M. Kalisz, „Microbial Proteinases“, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, A. Fiechter ed., 1988. Mimoto nebo místo modifikace proteolytické účinnosti mohou mít varianty enzymu podle vynálezu jiné modifikované vlastnosti, například K_m , k_{cat} , poměr k_{cat}/K_m a/nebo modifikovanou specifčnost pro substrát a/nebo modifikovaný profil účinnosti při různém pH. Je možno vytvořit specifické enzymy pro určitý substrát, jehož přítomnost se předpokládá, například při výrobě peptidů nebo v případě některých hydrolytických postupů, například při použití k praní prádla.

- V jednom z provedení vynálezu má být dosaženo výroby variant karbonylhydrolázy s pozmeněnou proteolytickou účinností ve srovnání s prekurzorovou karbonylhydrolázou vzhledem k tomu, že zvýšení účinnosti umožní efektivnější použití enzymu. Zajímavé jsou také varianty enzymu s odlišnou tepelnou stálostí a/nebo odlišnou specifčností pro substrát ve srovnání s původním enzymem. Výhodnou karbonylhydrolázou pro použití ke tvorbě variant na základě mutace je subtilisin. Specifickými aminokyselinami, vhodnými pro náhradu v karbonylhydroláze typu subtilisinu jsou aminokyseliny v polohách +76, +99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265 a/nebo +274 nebo jakákoliv kombinace těchto poloh v subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens*. V některých případech je žádoucí dosáhnout nižší proteolytické účinnosti, například při syntéze peptidů. Příliš vysoká proteolytická účinnost enzymů by v tomto případě totiž mohla rozrušit výsledný produkt syntézy. Na druhé straně může být v některých případech žádoucí zvýšit proteolytickou účinnost varianty ve srovnání s prekurzorem. Mimoto může být žádoucí zvýšit nebo snížit stálost enzymu, a to jak proti působení zásad, tak proti působení tepla. V některých dalších případech může být žádoucí zvýšit nebo snížit hodnoty k_{cat} , K_m nebo poměr k_{cat}/K_m .

- V jiném provedení vynálezu bylo prokázáno, že zbytky, ekvivalentní zbytky v poloze +76 jsou v kombinaci s dalšími modifikacemi subtilisinu důležité při dosahování změn celkové stálosti a/nebo proteolytické účinnosti enzymu. Jak je uvedeno v příkladové části, je možno například nahradit asparagin N v poloze, ekvivalentní poloze +76 v subtilisinu *Bacillus lentus* aspartátem D, ve výhodném provedení v kombinaci s další modifikací jednoho nebo většího počtu zbytků aminokyselin v polohách +99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265 a/nebo +274 k dosažení zvýšené stálosti a/nebo zvýšené účinnosti výsledného mutovaného enzymu.
- Nejvýhodnější provedení vynálezu jsou uvedena v jednotlivých příkladech. Tyto příklady zahrnují následující specifické kombinace nahrazených zbytků aminokyselin: N76D/S99D, N76D/S99D/V104I, N76D/S103A/V104I, N76D/V104I/I107V a N76D/S101R/S103A/V104I. V příkladech jsou rovněž uvedeny všechny hlavní kombinace mutant podle vynálezu. Uvedené substituce se s výhodou provádějí v subtilisinu z *Bacillus lentus*, je však možno použít subtilisinu z jakéhokoli typu *Bacillus*.

Na základě výzkumu, provedených s těmito a dalšími variantami subtilisinu je zřejmé, že zbytky aminokyselin v karbonylhydrolázách, s výhodou v subtilisinu, které jsou ekvivalentní zbytkům v polohách +76, +99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265 a/nebo +274 v *Bacillus amyloliquefaciens* jsou důležité pro proteolytickou účinnost a/nebo stálost těchto enzymů a tedy i pro čisticí nebo prací schopnost takových variant.

Celá řada variant karbonylhydrolázy podle vynálezu, zvláště subtilisinu je použitelná pro výrobu různých čisticích prostředků. Řada známých látek jsou smáčedla, vhodná pro použití v prostředcích s obsahem mutant karbonylhydrolázy podle vynálezu. Jde o neiontová, aniontová, kationtová nebo amfotermní smáčedla, popsána například v US 4 404 128 (Barry J. Anderson) a US 4 261 868 (Jiri Flora a další). Vhodný prostředek s obsahem smáčedla je popsán v příkladu 7 US 5 204 015. V oboru je uvedena řada prostředků s obsahem enzymů, použitelných jako čisticí nebo prací prostředky. Kromě typických čisticích prostředků mohou být varianty subtilisinu podle vynálezu použity k jakémukoli účelu, k němuž se používají ostatní přírodní subtilisiny nebo subtilisiny divokého typu. Může jít o kapalná mýdla, prostředky na mytí nádobí, prostředky k čištění kontaktních čoček, prostředky pro použití při hydrolýze peptidů, zpracování odpadů, v textilním průmyslu, jako enzymu pro štěpení různých řetězců při výrobě bílkovin a podobně. Varianty podle vynálezu mohou mít zvýšenou účinnost v čisticím prostředku ve srovnání s prekurzorem. Touto zvýšenou účinností se rozumí zvýšený čisticí účinek v případě různých nečistot, citlivých na působení enzymů, jako jsou tukové nebo krevní skvrny, stanovení se provádí obvyklým způsobem při použití standardních pracích postupů.

Subtilisiny podle vynálezu je možno zpracovat na známé práškové nebo kapalné čisticí prostředky, které mají pH v rozmezí 6,5 až 12,0, obsah enzymu je 0,01 až 5, s výhodou 0,1 až 0,5 % hmotnostních. Tyto čisticí prostředky mohou ještě obsahovat další enzymy, například známé proteázy, amylázy, celulózy, lipázy nebo endoglykosidázy, dále stabilizátory a další pomocné látky.

Přidáváním subtilisinů podle vynálezu k běžným pracím prostředkům nevzniká žádné zvláštní omezení při jejich použití. To znamená, že jakéhokoli teplotní rozmezí nebo rozmezí pH, vhodné pro určitý čisticí prostředek je rovněž vhodné pro prostředky s přidáním subtilisinu, pokud se pH pohybuje ve svrchu uvedené rozmezí a teplota při použití je nižší než teplota, při níž dochází k denaturaci enzymu. Mimoto je možno subtilisiny podle vynálezu použít v čisticích prostředcích bez dalších čisticích látek jako takové, nebo v kombinaci s buildery a stabilizátory.

Praktické provedení vynálezu bude osvětleno následujícími příklady, které však nemají sloužit k omezení rozsahu vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

5 Příklad 1

Konstrukce pro expresi genu GG36 v *B. subtilis*

10 Klonování a konstrukce pro expresi genu pro subtilisin z *B. lentus* byly uskutečněny v podstatě stejným způsobem jako v US č. 5 185 258. Plazmid GGA274 (popsaný na obr. 4) byl dále modifikován způsobem, znázorněným na obr. 5. Místo působení enzymu PstI, vytvořené v průběhu konstrukce plazmidu GGA274 bylo odstraněno řízenou mutagenesou při použití oligonukleotidu s řetězcem 5' GAAGCTGCA~~ACT~~CGTTAAA 3' (řetězec č. 1). Zařízením podtrženého nukleotidu A došlo k odstranění místa působení restrikčního enzymu PstI a současně
15 byl odpovídající zbytek aminokyseliny v poloze 274 změněn z alaninu na threonin. Threonin v poloze 274 je obvykle přítomen v enzymu divokého typu, například v sekvenci genu klonovaného subtilisinu z *B. lentu*. Kódový segment DNA pro subtilisin byl z plazmidu GGA274 nebo jeho derivátu vyjmut rozštěpením enzymy EcoRI a BamHI. Fragment DNA byl pak zpětně subklonován ve vektorech na bázi bakteriofágu M13, například MP19 tak, aby došlo ke vzniku
20 mutace. Po vzniku mutace byl mutovaný gen pro subtilisin po klonování přenesen zpět z fragmentu po štěpení enzymy EcoRI a HindIII do plazmidu pro expresi, například GGA274 k expresi a izolaci mutovaného subtilisinu.

25 Příklad 2

Cílená tvorba mutace s použitím oligonukleotidu

30 Pokud byl uskutečněn podle publikace Zoller M. a další, 1983, Methods Enzymol., 100:468–500. Jako příklad je možno uvést použití syntetického oligonukleotidu se sekvencí 5' GCTGCTCTAGACAATTTCG 3' (řetězec č. 2), tento oligonukleotid byl užít k náhradě zbytku aminokyseliny v poloze 76 z asparaginu N na kyselinu asparagovou D, to znamená N76D. Podtržené zbytky G a C označují změny proti sekvenci genu divokého typu. CA uchovává leucin v poloze +75 a mění řetězec aminokyselin zařazením místa působení enzymu XbaI, (TCTAGA),
35 zatímco změna GAC mění asparagin v poloze +76 na aspartát.

V případě vzniku mutace v polohách 99, 101, 103 a 104 je možno použít různé oligonukleotidy v závislosti na požadované kombinaci mutací. Například byl použit nukleotid 5' GTATTAG-
40 GGGCGGACGGGTTCGAGGCGCCATCAGCTCGATT 3' (řetězec č. 3) k současnému uskutečnění z následujících změn S99D, S101R, S103A a V104I v téže molekule subtilisinu. Podobným způsobem byly použity nukleotidy 5' TCAGGTTCTGGTCTCGAGCGTTGCCCAA-
GGATTG 3' (řetězec č. 4) a 5' CACGTTGCTAGCTTGAGTTTAG 3' (řetězec č. 5) k získání mutací I107V a N123S. Podtržené nukleotidy opět označují změny ve srovnání s řetězcem divokého typu, v jejich důsledku vznikají požadované změny řetězci aminokyselin nebo
45 v místech působení restrikčních enzymů.

Příklad 3

50 Proteolytická účinnost variant subtilisinu

Způsobem podle příkladu 2 byly připraveny varianty z tabulky III. V tabulce je uvedena proteolytická účinnost těchto variant. Kinetické parametry k_{cat} , K_M a k_{cat}/K_M byly měřeny pro hydrolýzy syntetického peptidu, sukcinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitroanilidu

způsobem podle publikace P. Bonneau a další, 1991, J. Am. Chem. Soc., sv. 113, č. 3, str. 1030. Postupuje se tak, že se malý podíl zásobního roztoku varianty subtilisinu přidá do kyvety s objemem 1 ml obsahující substrát, rozpuštěný v 0,1 M tris-HCl-pufu o pH 8,6 a uloží do termostatu při 25 °C. Reakce se sleduje spektrofotometricky sledováním absorpce reakčního produktu, p-nitroanilinu při 410 nm. Kinetické parametry byly zjištěny použitím algoritmu nelineární regrese, odpovídajícího rychlosti reakce a koncentrace produktu v Michaelis-Mentenově rovnici.

10 Tabulka III

Kinetické parametry k_{cat} , K_M a k_{cat}/K_M pro subtilisin z *Bacillus lentus* a jeho varianty

Enzym	k_{cat} (s^{-1})	K_M (M)	k_{cat}/K_M ($s^{-1}M^{-1}$)
<i>B. lentus</i> Subtilisin	170	0.00078	2.18×10^5
N76D	219	0.0008	2.74×10^5
N76D/S99D	88	0.00061	1.44×10^5
N76D/S103A	400	0.0014	2.86×10^5
N76D/V104I	459	0.0011	4.17×10^5
N76D/I107V	219	0.0011	1.99×10^5
N76D/N123S	115	0.0018	6.40×10^4
N76D/S99D/S101R	146	0.00038	3.84×10^5
N76D/S99D/S103A	157	0.0012	1.31×10^5
N76D/S99D/V104I	247	0.00097	2.55×10^5
N76D/S101R/S103A	405	0.00069	5.90×10^5
N76D/S101R/V104I	540	0.00049	1.10×10^6
N76D/S103A/V104I	832	0.0016	5.20×10^5
N76D/V104I/I107V	497	0.00045	1.10×10^6
N76D/V104I/I107V	330	0.00017	1.90×10^6
N76D/V104I/N123S	251	0.0026	9.65×10^4
N76D/I107V/N123S	147	0.0035	4.20×10^4
N76D/S99D/S101R/S103A	242	0.00074	3.27×10^5
N76D/S99D/S101R/V104I	403	0.00072	5.60×10^5
N76D/S99D/S103A/V104I	420	0.0016	2.62×10^5
N76D/S101R/S103A/V104I	731	0.00065	1.12×10^6
N76D/S103A/V104I/N123S	321	0.0026	1.23×10^5
N76D/V104I/I107V/N123S	231	0.003	7.70×10^4
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I	624	0.00098	6.37×10^5
N76D/S99D/S103A/V104I/N123S	194	0.0043	4.51×10^4
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S	311	0.0023	1.35×10^5

15

Výsledky, uvedené v tabulce III prokazují, že všechny zkoumané varianty subtilisinu si udržely proteolytickou účinnost. Podrobnější údaje prokazují, že došlo k podstatným změnám proteolytické účinnosti po různých kombinacích substitucí v případě zbytků aminokyselin v polohách ekvivalentních polohách 76, 99, 101, 103, 104, 107 a 123 z *Bacillus amyloliquefaciens*.

20

Příklad 4

Tepelná stálost variant subtilisinu

- 5 V následující tabulce IV je uvedeno srovnání tepelné stálosti subtilisinu z *Bacillus lentus* a jeho variant, získaných způsobem podle příkladu 2. Čištěný enzym, 15 mikrogramů/ml v 0,1 M glycinu s 0,01 % Tween-80 o pG 10,0 s přísadou nebo bez přísady 50 mM CaCl_2 , bylo po jednotlivých podílech rozděleno do malých zkumavek a směs byla inkubována 5 minut při 10 °C, pak byla každou minutu teplota zvýšena o 10 °C a nakonec byl roztok udržován 20 minut při
- 10 teplotě 60 °C. Pak byly zkumavky na 10 minut uloženy do ledu. Podíly ze zkumavek byly sledovány na účinnost enzymu uložním do kyvety s objemem 1 ml s obsahem 1,2 mM syntetického peptidu jako substrátu, sukcinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitroanilidu v roztoku v 0,1 M tris-HCl-pufro o pH 6 v termostatu při teplotě 25 °C. Počáteční lineární rychlost reakce byla sledována spektrofotometricky záznamem absorbance reakčního produktu,
- 15 p-nitroanilinu při 410 nm v průběhu času. Údaje jsou vyjádřeny v procentech účinnosti před zahřátím. Výsledky z tabulky IV prokazují, že většina variant je tepelně stálejší ve srovnání se subtilisinem z *Bacillus lentus* (24 vzorků ze 26) po přidání 50 mM CaCl_2 . Bez této látky je většina variant (19 z 26) podstatně stálejší než subtilisin z *Bacillus lentus*. Mimoto jsou varianty N76D/S99D, N76D/V104I, N76D/S99D/V104I, N76D/S103A/V104I, N76D/V104I/I107V,
- 20 N76D/V104Y/I107V a N76D/S101R/S103A/V104I podstatně stálejší než varianta s jedinou substitucí, N76D při pokusu, prováděném bez přidání 50 mM CaCl_2 .

Tabulka IV

5 Tepelná stálost subtilisinu z *Bacillus lentus* a jeho variant při pH 10, teplotně 60 °C, + nebo – 50 mM CaCl₂)

Enzym	zbývající účinnost v %	
	- CaCl ₂	+ CaCl ₂
<i>B. lentus</i> Subtilisin	2	96
N76D	34	97
N76D/S99D	49	98
N76D/S103A	26	92
N76D/V104I	58	98
N76D/I107V	32	96
N76D/N123S	0	97
N76D/S99D/S101R	30	100
N76D/S99D/S103A	36	100
N76D/S99D/V104I	48	97
N76D/S101R/S103A	26	100
N76D/S101R/V104I	38	100
N76D/S103A/V104I	58	100
N76D/V104I/I107V	60	97
N76D/V104I/I107V	48	74
N76D/V104I/N123S	0	98
N76D/I107V/N123S	16	100
N76D/S99D/S101R/S103A	38	100
N76D/S99D/S101R/V104I	33	100
N76D/S99D/S103A/V104I	38	98
N76D/S101R/S103A/V104I	40	99
N76D/S103A/V104I/N123S	1	98
N76D/V104I/I107V/N123S	3	99
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I	36	99
N76D/S99D/S103A/V104I/N123S	2	95
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S	0	100

10 Příklad 5

Řízená tvorba mutace s použitím oligonukleotidu a DNA s jednoduchým řetězcem z fagemidu jako matrice

15 A. Konstrukce variant *B. lentus*

20 Mutace byla vytvořena v podstatě stejným způsobem jako v příkladu 2. Matrice DNA s jednoduchým řetězcem byla získána s použitím fagemidu. Aby bylo možno zkonstruovat vektor typu fagemidu pro přípravu DNA s jednoduchým řetězcem jako matrice, byl nejprve zkonstruován vektor pBCDAICAT. Tento vektor je znázorněn na obr. 8. Nejprve byl klonován

kódový fragment ClaI–ClaI pro gen CAT z plazmidu pC194 (Horinouchi S. a Weisblum B., J. Bacterial. 150, 8–15, 1982) v místě AccI v oblasti vazného řetězce plazmidu pUC19 (New England Biolabs, Beverly, MA), za vzniku plazmidu pUCCHL. Fragment EcoRI–DraI o velikosti 0,6 kb z 5'–konce kódové DNA pro GG36DAI byl klonován v místech EcoRI a EcoRV plazmidu pBSKS (Stratagene, Inc., San Diego, CA) za vzniku plazmidu pBC2SK5. Jediné místo působení 5 enzymu EcoRI v plazmidu pBC2SK5 bylo odstraněno rozštěpením uvedeným enzymem s následným vyplněním vzniklých zakončení pomocí T4–DNA–polymerázy a pak byly fragmenty znovu navázány za vzniku plazmidu pBC2SK–5R, který již neobsahuje místo působení EcoRI. Fragment EcoRI–DraI, který byl klonován v plazmidu pBCSK–5R byl izolován 10 jako fragment PstI–HindIII a klonován v místě PstI–HindIII plazmidu pUCCHL (část vazné oblasti pUC19) za vzniku plazmidu pUCHHL5R. Kódový řetězec genu GG36DAI byl vyštěpen jako fragment EcoRI–BamHI a klonován v místech EcoRI–BamHI plazmidu pUCCHL5R za vzniku plazmidu pUCCAT. Velký fragment EcoRI–HindIII plazmidu pUCCAT byl pak klonován v místech působení EcoRI a HindIII v BS2KS+ za vzniku plazmidu pBCDAICAT.

15 K vytvoření DNA s jednoduchým řetězcem byl pBCDAICAT s obsahem E. coli infikován fágem R408 (Stratagene, San Diego, CA) způsobem podle publikace Russel M., Kidd S. a Kelley M. R., Gene, 45:333 – 338, 1986. Jakmile se získá DNA s jednoduchým řetězcem jako matrice, je možno uskutečnit běžnou tvorbu mutace podle příkladu 2. Dále bude uvedena pro lepší 20 osvětlení konstrukce některých mutant.

Pro konstrukci B. lentus (GG36) N76D/S103A/V104I/L217H byl užit fragment EcoRI–BamHI DNA, který je kódem pro GG36 N76D/S103A/V104I při konstrukci pUCCAT (obr. 8) za vzniku 25 plazmidu pBCDAICAT. Jakmile byla k dispozici DNA s jednoduchým řetězcem jako matrice, byl použit primer pro tvorbu mutace s následujícím řetězcem

* * * * * x ClaI
5' TAT GCC AGC CAC AAC GGT ACT TCG ATG GCT 3'

30 (řetězec č. 13) za získání L217H. Stejně jako svrchu znamenají podržené nukleotidy změny, které byly uskutečněny a označení x ClaI znamená, že po uskutečnění mutace bylo místo působení tohoto enzymu odstraněno. Mutace byla vytvořena způsobem podle příkladu 2. Po jejím uskutečnění byla nejprve DNA zkontrolována tak, aby bylo ověřeno vyloučení místa působení ClaI. Ty klony, v nichž toto místo již nebylo přítomno, byly podrobeny analýze řetězce DNA, 35 aby bylo ověřeno uskutečnění požadované změny L na H v poloze 217.

B. Konstrukce variant BPN' a jejich exprese v B. subtilis

Konstrukce BPN' z B. amyloliquefaciens, N76D/Q103A/Y104I/Y217L byla uskutečněna 40 obdobným způsobem ve dvou po sobě následujících stupních. Nejprve byla v BPN' Y217L provedena záměna N76D za vzniku BPN' N76D/Y217L a pak byla provedena druhá mutace k převedení na výsledný BPN' N76D/Q103A/Y104I/Y217L. Aby bylo možno získat DNA s jednoduchým řetězcem jako matici pro tvorbu první mutace, užije se kódový fragment pro subtilisin BPN' Y217L (EcoRI–BamHI, odvozený od plazmidu Y217L, popsáno v publikaci 45 Wells J. a další, PNAD, 84, 5167, 1087) ke zkonstruování plazmidu pUCCATFNA (obr. 9). Plazmid pUCCATFNA, obsahující BPN' Y217L se užije ke zkonstruování plazmidu pBCFNACAT (obr. 9). DNA s jednoduchým řetězcem byla připravena svrchu uvedeným způsobem. Pro získání BPN' N76D/Y217L byl užit oligonukleotidový primer s řetězcem

* * * * * x *Xba*I

5' C ACA GTT GCG GCT CTA GAT AAC TCA ATC GGT G 3'

- 5 (řetězec č. 14) k uskutečnění změny N76D. Pak byla připravena DNA s jednoduchým řetězcem z plazmidu pBCFNACAT s obsahem BPN' N76D/Y217L (plazmid pBCFNACAT po uskutečnění mutace N76D) a pokračuje se mutací pomocí dalšího oligonukleotidu s řetězcem

* * * * * x *Pvu*II

5' GCT GAC GGT TCC GCG GCT ATT AGT TGG ATC ATT 3'

10

(řetězec č. 15), čímž se získá BPN' N76D/Q103A/104I/Y217L. Všechny stupně, zahrnuté do klonování, přípravy DNA s jednoduchým řetězcem, tvorby mutace a vyhledávání mutant byly provedeny svrchu uvedeným způsobem.

- 15 Expres genu pro BPN' a jeho varianty se dosáhne integrací DNA plazmidu (pBCFNACAT s obsahem různých variant genu BPN') přímo do kmene *Bacillus subtilis*, neprodukujícího proteázu, tak jak bylo popsáno v RE 34 606.

20 Způsobem podle příklad 2 a 5 bylo připraveno velké množství variant. Pro tyto varianty pak byly získány kinetické hodnoty a údaje o stálosti těchto látek. Kinetické zkoušky byly provedeny podle příkladu 3 a jejich výsledky jsou uvedeny v tabulce V. Údaje o stálosti byly získány dále uvedeným způsobem, výsledky jsou shrnuty v tabulce VI.

Zkoušky na tepelnou stálost

25

Čištěný enzym byl převeden do jiného pufru, a to do 0,1 M glycinu o pH 10,0 s 0,01 % prostředku Tween-80 tak, že enzym byl vynesena na vrchol sloupce s náplní Sephadex G-25 v rovnovážném stavu v uvedeném pufru a sloupec byl pak promýván tímtož pufrům k eluci enzymu.

30

Do zkumavky s obsahem 0,1 M glycinu s 0,01 % Tween-80 o pH 10,0 s teplotou 60 °C, udržovanou v termostatu byl přidán enzym v uvedeném pufru až do konečné koncentrace 15 µg/ml.

- 35 Podíly enzymu byly při stálé teplotě 60 °C odebírány po různých intervalech a okamžitě byla prokazována účinnost enzymu jeho přidáním do kyvety, obsahující 1,2 mM syntetického peptidu jako substrátu, šlo o sukcinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitroanilid, rozpuštěný v 0,1 M tris-HCl-pufru o pH 8,6 a udržovaný na termostatu při teplotě 25 °C. Počáteční lineární reakční rychlost byla sledována spektrofotometricky záznamem absorbance reakčního produktu, p-nitroanilinu při 410 nm v průběhu času.

40

Poločas, to znamená doba do 50% inaktivace enzymu byla stanovena vynesením reakční rychlosti jako funkce doby inkubace při teplotě 60 °C.

- 45 Údaje jsou shrnuty v tabulce VI a jsou uvedeny v % poločasu, stanoveného pro subtilisin z *Bacillus subtilis* (GG36) za stejných podmínek.

T a b u l k a V

enzym	k_{cat} (s^{-1})	K_M (mM)	k_{cat}/K_M ($s^{-1}M^{-1}$)
B. lentus subtilisin	170	0.78	2.20E-05
N76D/S103G/V104I*	380	1.4	2.70E-05
N76D/S103A/V104F	730	0.33	2.20E-06
N76D/S103A/V104N	790	2.8	2.80E-05
N76D/S103A/V104S	170	0.83	2.00E-05
N76D/S103A/V104T	370	1.9	2.00E-05
N76D/S103A/V104W	880	0.31	2.80E-06
N76D/S103A/V104Y	690	0.5	1.40E-06
K27R/N76D/V104Y/N123S	500	1.2	4.20E-05
N76D/S101G/S103A/V104I*	620	1.3	4.80E-05
N76D/S103A/V104I/S105A*	550	1.3	4.20E-05
N76D/S103A/V104I/S105D*	440	1.7	2.60E-05
N76D/S103A/V104T/I107A*	120	5.7	2.10E-04
N76D/S103A/V104T/I107L*	310	3.2	9.70E-04
N76D/S103A/V104I/L126A	90	2.2	4.10E-04
N76D/S103A/V104I/L126F	180	1.9	9.50E-04
N76D/S103A/V104I/L126I	100	2.4	4.20E-04
N76D/S103A/V104I/L126V	64	3.2	2.00E-04
N76D/S103A/V104I/S128G*	560	1.7	3.30E-05
N76D/S103A/V104I/S128L*	430	3.8	1.10E-05
N76D/S103A/V104I/L135A	140	0.76	1.80E-05
N76D/S103A/V104I/L135F	390	0.69	5.70E-05
N76D/S103A/V104I/L135I	110	0.73	1.50E-05
N76D/S103A/V104I/L135V	140	0.86	1.60E-05
N76D/S103A/V104I/S156E*	170	2.6	6.50E-04
N76D/S103A/V104I/S166D*	160	3.5	4.60E-04
N76D/S103A/V104I/D197E	510	1.4	3.60E-05
N76D/S103A/V104I/N204A*	530	1.1	4.80E-05
N76D/S103A/V104I/N204G*	580	1.4	4.10E-05
N76D/S103A/V104I/N204C*	370	1.3	2.90E-05
N76/S103A/V104I/P210I*	500	1.2	4.20E-05
N76D/S103A/V104I/L217H*	80	0.63	1.30E-05
N76D/S103A/V104I/M222A	70	3.1	2.30E-04
N76D/S103A/V104I/M222S	80	3.1	2.60E-04
N76D/S103A/V104I/T260P	660	1.5	4.40E-05
N76D/S103A/V104I/S265N	590	1.3	4.50E-05
K27R/N76D/V104Y/I107V/N123S	220	1.4	1.60E-05
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E	430	1.1	3.90E-05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C	400	1.1	3.60E-05
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L	440	1.2	3.70E-05
K27R/N76D/V104Y/N123S/S216V	440	1.2	3.70E-05

K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S	760	0.98	7.80E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/T260P	410	1.2	3.40E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/T274A	390	1	3.90E+05
N76D/S103A/V104I/L126F/S255N	170	2.1	8.10E+04
N76D/S103A/V104I/S156E/S166D*	40	6.3	6.40E+03
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/G197E	410	0.98	4.20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/N218S	540	0.66	8.20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E/N218S	770	0.79	9.80E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C/N218S	610	0.99	6.20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L/N218S	580	0.78	7.40E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T260P	660	1	6.60E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T274A	590	0.89	6.60E+05
K27R/N76D/V104Y/Q109S/N123S/N218S/T274A	520	1	5.20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/D197E/N218S	460	0.65	7.10E+05
B. amyloliquefaciens subcilisin (BPN')	30	0.14	3.60E+05
BPN'-N76D/Y217L*	380	0.46	8.30E+05

* Tyto mutanty byly připraveny podle příkladu 5, všechny ostatní byly připraveny podle příkladu 2.

T a b u l k a VI

enzym	tepelná stálost (v % poločasu nativního enzymu)
B. lencus subcilisin	100
N76D	590
N76D/S99D	840
N76D/S103A	390
N76D/V104I	660
N76D/I107V	710
N76D/N123S	70
N76D/S99D/S101R	610
N76D/S99D/S103A	590
N76D/S99D/V104I	910
N76D/S101R/S103A	930
N76D/S101R/V104I	500
N76D/S103A/V104I	460
N76D/S103G/V104I*	370
N76D/S103A/V104F	480
N76D/S103A/V104N	230
N76D/S103A/V104S	230
N76D/S103A/V104T	370
N76D/S103A/V104W	280

N76D/S103A/V104Y	400
N76D/V104I/I107V	940
N76D/V104Y/I107V	820
N76D/V104I/N123S	80
N76D/I107V/N123S	150
K27R/N76D/V104Y/N123S	100
N76D/S99D/S101R/S103A	570
N76D/S99D/S101R/V104I	1000
N76D/S99D/S103A/V104I	680
N76D/S101G/S103A/V104I*	390
N76D/S101R/S103A/V104I	470
N76D/S103A/V104I/S105A*	360
N76D/S103A/V104I/S105D*	370
N76D/S103A/V104T/I107A*	270
N76D/S103A/V104T/I107L*	230
N76D/S103A/V104I/N123S	110
N76D/V104I/I107V/N123S	220
N76D/S103A/V104I/L126A	270
N76D/S103A/V104I/L126F	950
N76D/S103A/V104I/L126I	410
N76D/S103A/V104I/L126V	320
N76D/S103A/V104I/S129G*	640
N76D/S103A/V104I/S129L*	750
N76D/S103A/V104I/L135A	230
N76D/S103A/V104I/L135F	200
N76D/S103A/V104I/L135I	510
N76D/S103A/V104I/L135V	530
N76D/S103A/V104I/S156E*	120
N76D/S103A/V104I/S166D*	590
N76D/S103A/V104I/D197E	460
N76D/S103A/V104I/N204A*	230
N76D/S103A/V104I/N204G*	240
N76D/S103A/V104I/N204C*	500
N76D/S103A/V104I/P210I*	1370
N76D/S103A/V104I/L217H*	50
N76D/S103A/V104I/M222A	520
N76D/S103A/V104I/M222S	490
N76D/S103A/V104I/T260P	490
N76D/S103A/V104I/S265N	360
K27R/N76D/V104Y/I107V/N123S	210
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E	120
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C	110
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L	380
K27R/N76D/V104Y/N123S/S216V	140
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S	270
K27R/N76D/V104Y/N123S/T260P	40
K27R/N76D/V104Y/N123S/T274A	50
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I	590
N76D/S99D/S103A/V104I/N123S	110
N76D/S103A/V104I/L126F/S265N	810
N76D/S103A/V104I/S156E/S166D*	220

K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/G197E	90
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/N218S	250
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E/N218S	270
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C/N218S	460
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L/N218S	1400
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T260P	310
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T274A	180
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S	90
K27R/N76D/V104Y/Q109S/N123S/N218S/T274A	230
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/D197E/N218S	240
<i>B. amyloliquefaciens subtilisin</i> (BPN')	100
BPN'-N76D/Y217L*	420

* Tyto mutanty byly vyrobeny způsobem podle příkladu 5, všechny ostatní byly vyrobeny podle příkladu 2.

5

Příklad 6

Test na prací účinnost

10

Prací účinnost různých variant z předchozích příkladů byla vyhodnocena měřením odstranění skvrny, způsobené nanesením EMPA 116 (krev/mléko/uhliková čerň na bavlně) na pokusných částech tkaniny (Testfabrick, Inc., Middlesex, NJ 07030).

15 Šest pokusných vzorků tkaniny EMPA 116, rozdělené na úseky s rozměrem 7,5 x 10 cm s vroubkovanými okraji se uloží do zkušebního zařízení Model 7243S Terg-O-Tometer (United States Testing CO., Inc. Hoboken, NJ) s obsahem 1000 ml vody s tvrdostí 15 gpg (hmotnostní poměr vápenatých a hořečnatých iontů 3 : 1), 7 g pracího prostředku a příslušného množství enzymu. Čistící prostředek byl prostředek WFK1 (wfk-Testgewebe GmbH, Adlerstrasse 42, Postfach 13 07 62, D-47759, Krefeld, SRN). Složení je uvedeno v následující tabulce:

20

složka	% výsledného prostředku
zeolit A	25
síran sodný	25
bezvodý uhličitan sodný	10
lineární alkylbenzensulfonáty	8,8
alkoholethoxylát (7-8 EO)	4,5
sodné mýdlo	3
křemičitan sodný	
SiO ₂ :Na ₂ O = 3,3 : 1	3

K tomuto základnímu prostředku se přidají následující složky:

monohydrát perboritanu sodného	13
kopolymer (Sokalan CP5)	4
TAED (Mykon ATC Green)	3
enzym	0,5
zjasňovač (Tinopal AMS-GX)	0,2

5 Monohydrát perboritanu sodného byl získán od Degussa Corporation, Ridgefield-Park, NJ 07660. Sokalan CP5 byl získán od BASF Corporation Parsippany, NJ 07054. Mykon ATC Green (TAED, tetraacetylethylendiamin) byl získán od Warwick International Limite, Mostyn, Holywell, Clwyd CH8 9HE, Anglie, Tinopal AMS GX byl získán od Ciba-Geigy Corporation.,
15 Greensboro, NC 27419.

Šest vzorků bylo vybráno pomocí čistícího prostředku s enzymem, praní trvalo 30 minut při teplotě 60 °C, pak byly vzorky dvakrát máchány vždy 5 minut v 1000 ml vody. Enzymy byly přidávány do konečné koncentrace 0,05 až 1 ppm pro standardní křivku a 0,25 ppm pro běžnou
10 analýzu. Pak byly vzorky usušeny a vyžehleny a odraz světla byl měřen při použití hodnoty L křivky, získaný na Minolta Chroma Meter, Model CR-200 (Minolta Corporation, Ramsey, NJ 07446). Účinnost se vyjadřuje v procentech účinnosti proteázy B. lentus (GG36) a vypočítá se tak, že se množství proteázy B. lentus (GG36) vydělí množstvím varianty, jehož je zapotřebí k dosažení téhož účinku a výsledek se vynásobí stem. Údaje jsou shrnuty v tabulce VII.

15

Tabulka VII

enzym	prací účinnost
B. lentus subcilisin	100
N76D	310
N76D/S103A	230
N76D/V104I	130
N76D/I107V	160
N76D/S99D/S101R	370
N76D/S99D/S103A	290
N76D/S101R/S103A	130
N76D/S101R/V104I	300
N76D/S103A/V104I	320
N76D/S103G/V104I	160
N76D/S103A/V104F	210
N76D/S103A/V104N	110
N76D/S103A/V104T	170
N76D/V104I/I107V	210
N76D/S99D/S101R/S103A	220
N76D/S99D/S101R/V104I	140
N76D/S101G/S103A/V104I	170
N76D/S101R/S103A/V104I	150
N76D/S103A/V104I/S105A	170
N76D/S103A/V104T/I107A	120
N76D/S103A/V104T/I107L	110
N76D/S103A/V104I/L126F	110
N76D/S103A/V104I/S128G	280
N76D/S103A/V104I/L135I	160
N76D/S103A/V104I/L135V	160
N76D/S103A/V104I/D197E	170
N76D/S103A/V104I/N204A	160
N76D/S103A/V104I/N204G	150
N76D/S103A/V104I/P210I	470
N76D/S103A/V104I/M222A	100
N76D/S103A/V104I/T260P	280
N76D/S103A/V104I/S265N	190

Příklad 7

Stálost proteázy v kapalném pracím prostředku

5 Srovnání stálosti proteázy v kapalném pracím prostředku bylo provedeno pro subtilisin z *Bacillus lentus* a jeho variantu N76D/S103A/V104Y svrchu uvedeným způsobem. Použitým pracím prostředkem byl běžně dodáván prostředek Tide Ultra (Procter and gamble Company, USA). K inaktivaci proteázy in situ bylo zapotřebí prací prostředek zahřát. K tomuto účelu byl
 10 prostředek inkubován 4,5 hodiny při teplotě 96 °C. Pak byl ke pracovanému prostředku přidán subtilisin z B. lentus nebo jeho varianta N76D/S103A/V104I v množství 20 g/l při teplotě místnosti, takže konečná koncentrace enzymu v pracím prostředku Tide Ultra byla 0,3 g/l. Pak byl prostředek inkubován ve vodní lázni s teplotou 50 °C v termostatu. Podíly byly odebrány
 15 v době 0 a 24, 46, 76 a 112 hodin od začátku zahřívání a byla stanovena účinnost enzymu jeho vložení do kyvety s obsahem 1,2 mM syntetického peptidu, suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitro-anilidu v 0,1 M tris-HCl pufru o pH 8,6 s teplotou 25 °C, uchovávanou v termostatu. Lineární rychlost reakce byla sledována spektrofotometricky sledováním absorpance reakčního produktu, p-nitroanilinu, při 410 nm v průběhu času. Jak je zřejmé z obr. 10, byla varianta N76D/S103A/V104I významně stálější proti inaktivaci tepla než nativní enzym B. lentus. Stanovený poločas
 20 inaktivace v uvedeném pracím prostředku pro oba enzymy za těchto podmínek je 45 hodin pro subtilisin B. lentus a 125 hodin pro uvedenou variantu.

V průběhu přihlášky jsou uvedeny kódy pro aminokyseliny ve formě jednoho nebo tří písmen. Jde o běžné kódy podle publikace Dále J. W. 1989, Molecular Genetics of Bacteria, John Wiley
 25 and Sons, Ltd., doplněk B.

Vynález byl popsán v souvislosti s řadou výhodných provedení. Je však zřejmé, že by bylo možno navrhnout ještě řadu změn a ekvivalentní modifikací bez odchýlení smyslu vynálezu tak, jak je vyjádřen v patentových nárocích, takže vynález nemůže být omezen na popsaná výhodná
 30 provedení.

2) Informace o řetězci č. 1:

35 i) vlastnosti řetězce:

- A) délka: 19 párů bází
- B) typ: nukleová kyselina
- C) druh řetězce: jednoduchý
- 40 D) topologie: lineární

ii) Typ molekuly: DNA (genomu)

xi) Popis řetězce č. 1

45 GAAGCTGCAA CTCGTTAAA

2) Informace o řetězci č. 2:

50

i) vlastnosti řetězce:

- A) délka: 18 párů bází
- B) typ: nukleová kyselina
- 55 C) druh řetězce: jednoduchý

D) topologie: lineární

ii) Typ molekuly: DNA (genomu)

5 xi) Popis řetězce č. 2:

GCTGCTCTAG ACAATTCG

10 2) Informace o řetězci č. 3:

i) vlastnosti řetězce:

- 15 A) délka: 39 párů bází
B) typ: nukleová kyselina
C) druh řetězce: jednoduchý
D) topologie: lineární

ii) Typ molekuly: DNA (genomu)

20

xi) Popis řetězce č. 3:

GTATTAGGGG CGGACGGTCG AGGCGCCATC AGCTCGATT

25

2) Informace o řetězci č. 4:

i) vlastnosti řetězce:

- 30 A) délka: 33 párů bází
B) typ: nukleová kyselina
C) druh řetězce: jednoduchý
D) topologie: lineární

35 ii) Typ molekuly: DNA (genomu)

xi) Popis řetězce č. 4:

TCAGGTTCGG TCTCGAGCGT TGCCCAAGGA TTG

40

2) Informace o řetězci č. 5:

i) vlastnosti řetězce:

45

- A) délka: 22 párů bází
B) typ: nukleová kyselina
C) druh řetězce: jednoduchý
D) topologie: lineární

50

ii) Typ molekuly: DNA (genomu)

xi) Popis řetězce č. 5:

55 CACGTTGCTA GCTTGAGTTT AG

2) Informace o řetězci č. 6:

5 i) vlastnosti řetězce:

- A) délka: 1497 párů bází
 B) typ: nukleová kyselina
 C) druh řetězce: jednoduchý
 10 D) topologie: lineární

ii) Typ molekuly: DNA (genomu)

15 xi) Popis řetězce č. 6:

```

GGTCTACTAA AATATTATTC CATACTATAC AATTAATACA CAGAATAATC TGTCTATTGG      60
TTATTCTGCA AATGAAAAAA AGGAGAGGAT AAAGAGTGAG AGGCAAAAAA GTATGGATCA      120
GTTTGCTGTT TGCTTTAGCG TTAATCTTTA CGATGGCGTT CGGCAGCACA TCCTCTGCCC      180
AGGCGGCAGG GAAATCAAAC GGGGAAAAGA AATATATTGT CGGGTTTAAA CAGACAATGA      240
GCACGATGAG CCGCCGCTAAG AAGAAAGATG TCATTTCTGA AAAAGCCGGG AAAGTGCAAA      300
AGCAATTCAA ATATGTAGAC GCAGCTTCAG TCACATTAAA CGAAAAAGCT GTAAAAGAAT      360
TGAAAAAGA CCGGAGCGTC GCTTACGTTG AAGAAGATCA CGTAGCAGAT GCCTACGGCG      420
AGTCCGTGCC TTACGGCGTA TCACAAATTA AAGCCCGTGC TCTGCACTCT CAAGGCTACA      480
CTGGATCAAA TGTTAAAGTA GCGGTTATCG ACAGCGGTAT CGATTCTTCT CATCCTGATT      540
TAAAGGTAGC AAGCGGAGCC AGCATGGTTC CTTCTGAAAC AAATCCTTTC CAAGACAACA      600
ACTCTCACGG AACTCACGTT GCCGGCACAG TTGCGGCTCT TAATAACTCA ATCGGTGTAT      660
TAGGGCTTGC GCCAAGCGCA TCACTTTACG CTGTAAAAGT TCTCGGTGCT GACGGTTCCG      720
GCCAATACAG CTGGATCATT AACGGAATCG AGTGGGCGAT CGCAAACAAT ATGGACGTTA      780
TTAACATGAG CCTCGGCGGA CCTTCTGCTT CTGCTGCTTT AAAAGCGGCA GTTGATAAAG      840
CCGTTGCATC CGGCGTCGTA GTCGTTGCGG CAGCGCGTAA CGAAGGCACT TCCGGCAGCT      900
CAAGCACAGT GGGCTACCGT GGTAAATACC CTTCTGTGAT TGCAGTAGGC GCTGTTGACA      960
GCAGCAACCA AAGAGCATCT TTCTCAAGCG TAGGACCTGA GCTTGATGTC ATGCCACCTG     1020
GCGTATCTAT CCAAAGCAGG CTTCTGGAA ACAATACGG GGCCTACAA GGTACGTCAA     1080
TGGCATCTCC GCACGTTGCC GGAGCGGCTG CTTTGATTCT TTCTAAGCAC CGGAAGTGGG     1140
CAAACACTCA AGTCCCGAGC AGTTTAGAAA ACACCACTAC AAAACTTGGT GATTCTTTGT     1200
ACTATGGAAG AGGGCTGATC AACGTACAG CGGCAGCTCA GTAAACATA AAAAACCGGC     1260
CTTGCGCGCG CGGTTTTTTC ATTATTTTTC TTCCTCCGCA TGTTCATCC GCTCCATAAT     1320
CGACGGATGG CTCCTCTGTA AAATTTTAAC GAGAAACGGC GGGTTGACCC GCGTCAGTCC     1380
CGTAACGGCC AACTCCTGAA AGTCTCAAT CGCCGCTTCC CGGTTTCCGG TCAGCTCAAT     1440
GCCATAACGG TCGGCGGCGT TTTCTGATA CCGGAGAGCG GCATTCTGTA TCGGATC     1497

```

2) Informace o řetězci č. 7:

i) vlastnosti řetězce:

- A) délka: 275 párů bází
 B) typ: aminokyseliny
 C) druh řetězce: jednoduchý
 D) topologie: lineární

ii) Typ molekuly: bílkovina

xi) Popis řetězce č. 7:

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 Gly 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

2) Informace o řetězci č. 8:

5

i) vlastnosti řetězce:

10

A) délka: 275 párů bází

B) typ: aminokyseliny

C) druh řetězce: jednoduchý

D) topologie: lineární

ii) Typ molekuly: bílkovina

15

xi) Popis řetězce č. 8:

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

Val Gly Ala Val Asn Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Ala
 180 185 190
 Gly Ser Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr
 195 200 205
 Leu Pro Gly Gly Thr Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr
 210 215 220
 Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Thr
 225 230 235 240
 Trp Thr Asn Ala Gln Val Arg Asp Arg Leu Glu Ser Thr Ala Thr Tyr
 245 250 255
 Leu Gly Asn Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala
 260 265 270
 Ala Ala Gln
 275

2) Informace o řetězci č. 9:

5

i) vlastnosti řetězce:

A) délka: 274 párů bází

B) typ: aminokyseliny

10

C) druh řetězce: jednoduchý

D) topologie: lineární

ii) Typ molekuly: bílkovina

15

xi) Popis řetězce č. 9:

Ala Gln Thr Val Pro Tyr Gly Ile Pro Leu Ile Lys Ala Asp Lys Val
 1 5 10 15
 Gln Ala Gln Gly Phe Lys Gly Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp
 20 25 30
 Thr Gly Ile Gln Ala Ser His Pro Asp Leu Asn Val Val Gly Gly Ala
 35 40 45
 Ser Phe Val Ala Gly Glu Ala Tyr Asn Thr Asp Gly Asn Gly His Gly
 50 55 60
 Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asp Asn Thr Thr Gly Val
 65 70 75 80
 Leu Gly Val Ala Pro Ser Val Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Asn
 85 90 95
 Ser Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Ser Gly Ile Val Ser Gly Ile Glu Trp
 100 105 110

Ala Thr Thr Asn Gly Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Ala
 115 120 125

Ser Gly Ser Thr Ala Met Lys Gln Ala Val Asp Asn Ala Tyr Ala Arg
 130 135 140

Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Asn Ser Gly Ser
 145 150 155 160

Thr Asn Thr Ile Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Asp Ser Val Ile Ala Val
 165 170 175

Gly Ala Val Asp Ser Asn Ser Asn Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly
 180 185 190

Ala Glu Leu Glu Val Met Ala Pro Gly Ala Gly Val Tyr Ser Thr Tyr
 195 200 205

Pro Thr Asn Thr Tyr Ala Thr Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro
 210 215 220

His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Leu
 225 230 235 240

Ser Ala Ser Gln Val Arg Asn Arg Leu Ser Ser Thr Ala Thr Tyr Leu
 245 250 255

Gly Ser Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Glu Ala Ala
 260 265 270

Ala Gln

2) Informace o řetězci č. 10:

5

i) vlastnosti řetězce:

- A) délka: 269 párů bází
 B) typ: aminokyseliny
 C) druh řetězce: jednoduchý
 D) topologie: lineární

10

ii) Typ molekuly: bílkovina

15

xi) Popis řetězce č. 10:

Ala Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala
 1 5 10 15

His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp
 20 25 30

Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser
 35 40 45

Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr
 50 55 60

His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu
 65 70 75 80
 Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala
 85 90 95
 Ser Gly Ser Gly Ser Val Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala
 100 105 110
 Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser
 115 120 125
 Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly
 130 135 140
 Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Gly Ser Ile Ser
 145 150 155 160
 Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln
 163 170 175
 Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile
 180 185 190
 Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr
 195 200 205
 Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala
 210 215 220
 Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile
 225 230 235 240
 Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu
 245 250 255
 Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
 260 265

2) Informace o řetězci č. 11:

5

i) vlastnosti řetězce:

10

- A) délka: 1140 párů bází
- B) typ: nukleová kyselina
- C) druh řetězce: jednoduchý
- D) topologie: lineární

ii) Typ molekuly: DNA (genomu)

15

xi) Popis řetězce č. 11:

```

ATGAAGAAAC CGTTGGGGAA AATTGTGCGA AGCACCACAC TACTCATTTT TGTTCGTTTT 60
AGTTCATCGA TCSCATCGGC TGCTGAAGAA GCAAAAGAAA AATATTTAAT TGGCTTTAAT 120
GAGCAGGAAG CTGTCAGTGA GTTTGTAGAA CAAGTAGAGG CAAATGACGA GGTCCGCATT 180
CTCTCTGAGG AAGAGGAAGT CGAAATTGAA TTGCTTCATG AATTTGAAAC GATTCTGTGT 240
TTATCCGTTG AGTTAAGCCC AGAAGATGTG GACGCGCTTG AACTCGATCC AGCGATTCTT 300
TATATTGAAG AGGATGCAGA AGTAACGACA ATGGGSCAAT CAGTGCCATG GGAATTAGC 360
CGTGTGCAAG CCCCAGCTGC CCATAACCGT GGATTGACAG GTTCTGGTGT AAAAGTTGCT 420
GTCCTCGATA CAGGTATTTT CACTCATCCA GACTTAAATA TTCGTGGTGG CGCTAGCTTT 480
GTACCAGGGG AACCATCCAC TCAAGATGGG AATGGGCAAT GCACGCATGT GGCCGGGAGC 540
ATTGCTGCTT TAAACAATTG GATTGGCGTT CTGGGCTAG CCGGAGCGC GGAACATAC 600
GCTGTTAAAG TATTAGGGGC GAGCGGTTCA GGTTCGCTCA GCTCGATTGC CCAAGGATTG 660
GAATGGGCAG GGAACAATGG CATGCACGTT GCTAATTTGA GTTTAGGAAG CCCTTCGSCA 720
AGTGCACAC TTGAGCAAGC TGTTAATAGC GCGACTTCTA GAGGCGTTCT TGTGTAGCG 780
GCATCTGGGA ATTCAGGTGC AGGCTCAATC AGCTATCCGG CCGGTTATGC GAACGCAATG 840
GCAGTCGGAG CTACTGACCA AAACAACAAC CGCGCCAGCT TTTCACAGTA TGGCGCAGGG 900
CTTGACATTG TCGCACCAGG TGTAACGCTG CAGAGCACAT ACCCAGGTTT AACGTATGCC 960
AGCTTAAACG GTACATCGAT GGCTACTCCT CATGTTGCAG GTGCAGCAGC CCTTGTTAAA 1020
CAAAAGAACC CATCTTGGTC CAATGTACAA ATCCGCAATC ATCTAAAGAA TACGGCAACG 1080
AGCTTAGGAA GCACGAACTT GTATGGAAGC GGACTTGTCA ATGCAGAAGC GGCAACACGC 1140

```

2) Informace o řetězci č. 12:

5

i) vlastnosti řetězce:

- A) délka: 1140 párů bází
 B) typ: nukleová kyselina
 C) druh řetězce: jednoduchý
 D) topologie: lineární

10

ii) Typ molekuly: DNA (genomu)

15

xi) Popis řetězce č. 12:

```

ATGAAGAAAC CSTTG3GGAA AATTGTCCCA AGCACCGCAC TACTCATTTC TGTTCCTTTT 60
AGTTCATCGA TCGCATCGGC TGCTGAAGAA GCAAAAGAAA AATATTTAAT TGGCTTTAAT 120
GAGCAGGAAG CTGTCAGTGA GTTTGTAGAA CAAGTAGAGG CAAATGACGA GGTCCGCCATT 180
CTCTCTGAGG AAGAGGAAGT CGAAATTGAA TTGCTTCATG AATTTGAAAC GATTCCTGTT 240
TTATCCGTTG AGTTAAGCCC AGAAGATGTG GACGCGCTTG AACTCGATCC AGCGATTTCT 300
TATATTGAAG AGGATGCAGA AGTAACGACA ATGGCGCAAT CAGTGCCATG GGGAAATTAGC 360
CGTGTGCAAG CCCCAGCTGC CCATAACCGT GGATTGACAG GTTCTGGTGT AAAAGTTGCT 420
GTCCCTCGATA CAGGTATTTT CACTCATCCA GACTTAAATA TTCGTGGTGG CGCTAGCTTT 480
GTACCAGGGG AACCATCCAC TCAAGATGGG AATGGGCATG GCACGCATGT GSCCGGGACG 540
ATTGCTGCTT TAGACAATC GATTGGCGTT CTTGGCGTAG CCGCGAGCGC GGAACATATC 600
GCTGTTAAAG TATTAGGGGC GAGCGGTTCA GCGGCCATCA GCTCGATTGC CCAAGGATTG 660
GAATGGGCAG GGAACAATGG CATGCACGTT GCTAATTGTA GTTTAGGAAG CCGTTCGCCA 720
AGTGCCACAC TTCAGCAAGC TGTTAATAGC GCGACTTCTA GAGGCGTTCT TGTGTAGCG 780
GCATCTGGGA ATTCAGGTGC AGGCTCAATC AGCTATCCGG CCCGTTATGC GAACGCAATG 840
GCAGTCGGAG CTAATGACCA AAACAACAAC CCGGCCAGCT TTTCACAGTA TGGCGCAGGG 900
CTTGACATTG TCGCACCAGG TGTAACCGTG CAGAGCACAT ACCCAGGTTT AACSTATGCC 960
AGCTTAAACG GTACATCGAT GGCTACTCCT CATGTTGCAG GTGCAGCAGC CCGTGTAAA 1020
CAAAAGAACG CATCTTGGTC CAATGTACAA ATCGGCAATC ATCTAAAGAA TACGGCAACG 1080
AGCTTAGGAA GCACGAACCT GTATGGAAGC GGACTTGTCA ATGCAGAAGC GSCAACACGC 1140

```

2) Informace o řetězci č. 13:

5

i) vlastnosti řetězce:

10

- A) délka: 30 párů bází
- B) typ: nukleová kyselina
- C) druh řetězce: jednoduchý
- D) topologie: lineární

ii) Typ molekuly: DNA (genomu)

15

xi) Popis řetězce č. 13:

TATGCCAGCC ACAACGGTAC TTCGATGGCT

2) Informace o řetězci č. 14:

i) vlastnosti řetězce:

- A) délka: 31 párů bází
- B) typ: nukleová kyselina
- C) druh řetězce: jednoduchý
- D) topologie: lineární

ii) Typ molekuly: DNA (genomu)

xi) Popis řetězce č. 14:

CACAGTTGCG GCTCTAGATA ACTCAATCGG T

2) Informace o řetězci č. 15:

i) vlastnosti řetězce:

- A) délka: 33 párů bází
- B) typ: nukleová kyselina
- C) druh řetězce: jednoduchý
- D) topologie: lineární

ii) Typ molekuly: DNA (genomu)

xi) Popis řetězce č. 15:

GCTGACGGTT CCGGCGCTAT TAGTTGGATC ATT

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Izolovaná varianta subtilisinu se sekvencí aminokyselin obsahující řadu substitucí jinými přírodními aminokyselinami, přičemž tyto substituce se nacházejí

(a) v prekurzoru subtilisinu v poloze, ekvivalentní poloze +76 v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*, přírodní aminokyselina pro substituci se volí ze skupiny A, R, N, C, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y a V a

(b) v jedné nebo většímu počtu poloh v prekurzoru subtilisinu, ekvivalentních polohách +27, +99, +101, +103, +104, +105, +107, +109, +123, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265 a +274 subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens*,

přičemž aminokyselina v poloze v prekurzoru subtilisinu, ekvivalentní poloze +195 v subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens* je substituována odlišnými přírodními aminokyselinami, které se volí ze skupiny A, R, N, D, C, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y a V a aminokyselina v poloze prekurzoru subtilisinu, ekvivalentní poloze +206 v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* je

substituována odlišnými přírodními aminokyselinami ze skupiny A, R, N, D, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y a V.

- 5 2. Izolovaná varianta subtilisinu se sekvencí aminokyselin, obsahující řadu substitucí odlišnými přírodními aminokyselinami, přičemž tyto substituce se nacházejí

(a) v poloze prekursoru subtilisinu, ekvivalentní poloze +76 v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* a

- 10 (b) v poloze, ekvivalentní poloze +101, v níž se odlišné přírodní aminokyseliny volí ze skupiny G, D, K, L, A, E, S a R a

- 15 (c) v jedné nebo větším počtu poloh v prekursoru subtilisinu, ekvivalentních polohách +27, +99, +103, +104, +105, +107, +123, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +222, +260, +265 a +274 subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens*,

- 20 přičemž aminokyselina v poloze v prekursoru subtilisinu, ekvivalentní poloze +195 v subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens* je substituována odlišnými přírodními aminokyselinami, které se volí ze skupiny A, R, N, D, C, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y a V a aminokyselina v poloze prekursoru subtilisinu, ekvivalentní poloze +206 v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* je substituována odlišnými přírodními aminokyselinami ze skupiny A, R, N, D, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y a V.

- 25 3. Varianta subtilisinu podle nároku 2, v níž se aminokyseliny pro náhradu aminokyseliny v poloze, ekvivalentní poloze +101 volí ze skupiny R, G, D, K, L, A a E.

4. Izolovaná varianta subtilisinu se sekvencí aminokyselin, obsahující řadu substitucí odlišnou přírodní aminokyselinou, přičemž tyto substituce se nacházejí

- 30 (a) v poloze prekursoru subtilisinu, ekvivalentní poloze +76 v subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens* a

(b) v poloze ekvivalentní poloze +105, přičemž přírodní aminokyselina se volí ze skupiny A, D, G, R a N a

- 35 (c) v jedné nebo většinu počtu poloh v prekursoru subtilisinu, ekvivalentních polohách +27, +99, +101, +103, +104, +107, +123, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +222, +260, +265 a +274 subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens*,

- 40 přičemž aminokyselina v poloze v prekursoru subtilisinu, ekvivalentní poloze +195 v subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens* je substituována odlišnými přírodními aminokyselinami, které se volí ze skupiny A, R, N, D, C, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y a V a aminokyselina v poloze prekursoru subtilisinu, ekvivalentní poloze +206 v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* je substituována odlišnými přírodními aminokyselinami ze skupiny A, R, N, D, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y a V.

5. Varianta subtilisinu podle nároku 4, v níž se aminokyselina pro náhradu aminokyseliny v poloze, ekvivalentní poloze +105 volí ze skupiny A a D.

- 50 6. Izolovaná varianta subtilisinu se sekvencí aminokyselin, obsahující řadu substitucí odlišnými přírodními aminokyselinami, přičemž tyto substituce se nacházejí

(a) v poloze prekursoru subtilisinu, ekvivalentní poloze +76 v subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens*,

55

(b) v poloze, ekvivalentní poloze +135, přičemž odlišné přírodní aminokyseliny se volí ze skupiny A, F, I, S a V a

5 (c) v jedné nebo většímu počtu poloh v prekurzoru subtilisinu, ekvivalentních polohách +27, +99, +101, +103, +104, +105, +107, +123, +126, +128, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +222, +260, +265 a +274 subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens*,

přičemž aminokyselina v poloze v prekurzoru subtilisinu, ekvivalentní poloze +195 v subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens* je substituována odlišnými přírodními aminokyselinami, které se
10 volí ze skupiny A, R, N, D, C, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y a V a aminokyselina v poloze prekurzoru subtilisinu, ekvivalentní poloze +206 v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* je substituována odlišnými přírodními aminokyselinami ze skupiny A, R, N, D, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y a V.

15 7. Varianta subtilisinu podle nároku 6, v níž se aminokyselina pro náhradu aminokyseliny v poloze, ekvivalentní poloze +135 volí ze skupiny I, A a S.

8. Izolovaná varianta subtilisinu se sekvencí aminokyselin, obsahující řadu substitucí odlišnými přírodními aminokyselinami, přičemž tyto substituce se nacházejí
20

(a) v poloze prekurzoru subtilisinu, ekvivalentní poloze +76 v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*,

25 (b) v poloze, ekvivalentní poloze +210, přičemž přírodní aminokyselina pro náhradu této aminokyseliny se volí ze skupiny L, I, S, C a F a

(c) v jedné nebo větším počtu poloh v prekurzoru subtilisinu ekvivalentních polohách +27, +99, +101, +103, +104, +105, +107, +123, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +216, +217, +222, +260, +265 a +274 subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens*,
30

přičemž aminokyselina v poloze v prekurzoru subtilisinu, ekvivalentní poloze +195 v subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens* je substituována odlišnými přírodními aminokyselinami, které se volí ze skupiny A, R, N, D, C, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, a V a aminokyselina v poloze prekurzoru subtilisinu, ekvivalentní poloze +206 v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* je substituována odlišnými přírodními aminokyselinami ze skupiny A, R, N, D, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y a V.
35

9. Varianta subtilisinu podle nároku 8, v níž se aminokyselina pro náhradu aminokyseliny v poloze, ekvivalentní poloze +210 volí ze skupiny I, S a C.
40

10. Izolovaná varianta subtilisinu se sekvencí aminokyselin, obsahující řadu substitucí jinými přírodními aminokyselinami, přičemž tyto substituce se nacházejí

45 (a) v poloze prekurzoru subtilisinu, ekvivalentní poloze +76 v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*,

(b) v poloze, ekvivalentní poloze +260, přičemž odlišná přírodní aminokyselina pro náhradu se volí ze skupiny P, N, G, A, S, C, K, a D, a

50 (c) v jedné nebo většímu počtu poloh v prekurzoru subtilisinu, ekvivalentních polohách +27, +99, +101, +103, +104, +105, +107, +123, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +222, +265 a +274 subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens*,

55 přičemž aminokyselina v poloze v prekurzoru subtilisinu, ekvivalentní poloze +195 v subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens* je substituována odlišnými přírodními aminokyselinami, které se

volí ze skupiny A, R, N, D, C, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y a V a aminokyselina v poloze prekursoru subtilisinu, ekvivalentní poloze +206 v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* je substituována odlišnými přírodními aminokyselinami ze skupiny A, R, N, D, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y a V.

5

11. Varianta subtilisinu podle nároku 10, v němž se aminokyselina pro náhradu aminokyseliny v poloze +260 volí ze skupiny P, A, S, N a G.

10

12. Izolovaná varianta subtilisinu se sekvencí aminokyselin, obsahujících řadu substitucí odlišnými přírodními aminokyselinami, přičemž tyto substituce se nacházejí

(a) v poloze prekursoru subtilisinu, ekvivalentní poloze +76 v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*,

15

(b) v jedné nebo větším počtu poloh prekursoru subtilisinu, ekvivalentním polohám +101, +105, +135, +210 a +260 a

20

(c) v jedné nebo většinu počtu poloh v prekursoru subtilisinu, ekvivalentních polohách polohách +27, +99, +103, +104, +107, +123, +126, +128, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +216, +217, +222, +260, +265 a +274 subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens*,

přičemž aminokyselina v poloze v prekursoru subtilisinu, ekvivalentní poloze +195 v subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens* je substituována odlišnými přírodními aminokyselinami, které se volí ze skupiny A, R, N, D, C, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y a V a aminokyselina v poloze prekursoru subtilisinu, ekvivalentní poloze +206 v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* je substituována odlišnými přírodními aminokyselinami ze skupiny A, R, N, D, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y a V.

25

30

13. Izolovaná varianta subtilisinu se sekvencí aminokyselin, obsahujících řadu substitucí odlišnými přírodními aminokyselinami, přičemž tyto substituce se nacházejí

(a) v poloze prekursoru subtilisinu, ekvivalentní poloze +76 v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*,

35

(b) v poloze, ekvivalentní poloze +103, přičemž odlišná přírodní aminokyselina se volí ze skupiny Q, T, D, E, Y, K, G, R, S a A, a

40

(c) v jedné nebo většinu počtu poloh v prekursoru subtilisinu, ekvivalentních polohách polohách +27, +99, +101, +104, +105, +107, +123, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +222, +260, +265 a +274 subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens*,

přičemž aminokyselina v poloze v prekursoru subtilisinu, ekvivalentní poloze +195 v subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens* je substituována odlišnými přírodními aminokyselinami, které se volí ze skupiny A, R, N, D, C, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y a V a aminokyselina v poloze prekursoru subtilisinu, ekvivalentní poloze +206 v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* je substituována odlišnými přírodními aminokyselinami ze skupiny A, R, N, D, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y a V.

45

50

14. Varianta subtilisinu podle nároku 13, v níž se aminokyselina pro substituci v poloze, ekvivalentní poloze +103 volí ze skupiny A, Q, T, D, E, Y, K, G a R.

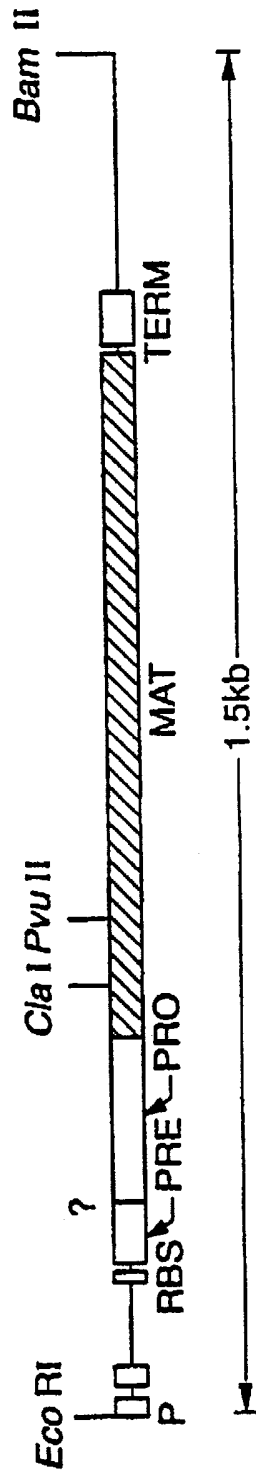
15. Izolovaná varianta subtilisinu se sekvencí aminokyselin, obsahující řadu substitucí odlišnými přírodními aminokyselinami, přičemž tyto substituce se nacházejí

55

- (a) v poloze prekursoru subtilisinu, ekvivalentní poloze +76 v substituci *Bacillus amyloliquefaciens*,
- (b) v poloze, ekvivalentní poloze 104, přičemž odlišná přírodní aminokyselina pro substituci se volí ze skupiny A, R, N, D, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W a Y, a
- (c) v jedné nebo většímu počtu poloh v prekursoru subtilisinu, ekvivalentních polohách +27, +99, +101, +103, +105, +107, +123, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +222, +260, +265 a +274 subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens*,
- přičemž aminokyselina v poloze prekursoru subtilisinu, ekvivalentní poloze +126 v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* je substituována odlišnou přírodní aminokyselinou, která se volí ze skupiny A, R, N, D, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y a V, aminokyselina v poloze v prekursoru subtilisinu, ekvivalentní poloze +195 v subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens* je substituována odlišnými přírodními aminokyselinami, které se volí ze skupiny A, R, N, D, C, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y a V a aminokyselina v poloze prekursoru subtilisinu, ekvivalentní poloze +206 v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* je substituována odlišnými přírodními aminokyselinami ze skupiny A, R, N, D, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y a V.
16. Varianta subtilisinu podle nároku 15, v níž se aminokyselina pro substituci v poloze, ekvivalentní poloze +104 volí ze skupiny I, Y, S, L, A, T, G, F, M, W, D a N.
17. Izolovaná varianta subtilisinu se sekvencí aminokyselin obsahující kombinovanou sestavu substitucí odlišnými přírodními aminokyselinami, přičemž tyto kombinované skupiny substitucí jsou provedeny v polohách tvořených skupinami poloh, které jsou ekvivalentní polohám
- 76/99, 76/101, 76/103, 76/104, 76/107, 76/123, 76/99/101, 76/99/103, 76/99/104, 76/101/103, 76/101/104, 76/103/104, 76/104/107, 76/104/123, 76/107/123, 76/99/101/103, 76/99/101/104, 76/99/103/104, 76/101/103/104, 76/103/104/123, 76/104/107/123, 76/99/101/103/104, 76/99/103/104/123, 76/99/101/103/104/123, 76/103/104/126, 76/103/104/135, 76/103/104/197, 76/103/104/222, 76/103/104/260, 76/103/104/265, 76/103/104/126/265, 27/76/104/123/274, 27/76/104/123, 27/76/104/107/123, 27/76/104/123/197, 27/76/104/123/204, 27/76/104/123/206, 27/76/104/123/216, 27/76/104/123/260, 27/76/104/123/195/197, 76/103/104/217, 76/103/104/156, 76/103/104/166, 76/103/104/105, 76/101/103/104, 76/103/104/210, 76/103/104/107, 76/103/104/204, 76/217, 76/103/104/156/166, 76/103/104/156/166/210, 76/101/103/104/166/210, 76/101/103/104/156/166/210 a 76/103/104/128 v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*.
18. Izolovaná varianta subtilisinu podle nároku 17, dále obsahující alespoň jednu další substituci odlišnou přírodní aminokyselinou, přičemž tyto substituce jsou uvedeny v jedné nebo větším počtu poloh ze skupiny +109 a +218.
19. Varianta subtilisinu podle nároku 18, obsahující kombinované skupiny substitucí v polohách, které se volí ze skupiny poloh, které jsou ekvivalentní polohám
- 27/76/104/109/123/274, 27/76/104/123/218/274, 27/76/104/109/123, 27/76/104/109/123/218/-274, 27/76/104/123/218, 27/76/104/123/195/218, 27/76/104/123/197/218, 27/76/104/123/204/-218, 27/76/104/123/206/218, 27/76/104/123/218/260, a 27/76/104/123/195/197/218.
20. Varianta subtilisinu podle nároku 17, která se volí ze skupiny
- N76D/S99D; N76D/S101R; N76D/S103A; N76D/V104I; N76D/I107V; N76D/N123S; N76D/-S99D/S101R; N76D/S99D/S103A; N76D/S99D/V104I; N76D/S101R/S103A; N76D/S101R/-V104I; N76D/S103A/V104I; N76D/V104I/I107V; N76D/V104Y/I107V; N76D/V104I/N123S; N76DPI107V/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A; N76D/S99D/S101R/V104I; N76D/S99D/-

- S103A/V104I; N76D/S101R/S103A/V104I; N76D/S103A/V104I/N123S; N76D/V104I/1107V-PN123S; N76D/S99D/S101/S103A/V104I; N76D/S99D/S103A/V104I/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S; N76D/S103A/V104I/S128G; N76D/S103A/V104I/T260P; N76D/S103A/V104I/S265N; N76D/S103A/V104I/D197E; N76D/S103A/V104I/S105A; N76D/S103A/V104I/L135I; N76D/S103A/V104I/L126F; N76D/S103A/V104I/L107T; N76D/S103A/V104I/P210I; N76D/S103A/V104I/L126/S265N; N76D/S103A/V104I/S156E/S166D/P210I; N76D/S101G/S103A/V104I/S166D/P210I; N76D/S101G/S103A/V104I/S156E/S166D/P210I a N76D/S103A/V104I/M222A.
- 10 21. Varianta subtilisinu podle nároku 20, která se volí ze skupiny N76D/S99D N76D/104I, N76D/S99D/V104I, N76D/S103A/V104I, N76D/V104PI107V, N76DPV104Y/1107V, N76D/S101RPS103A/V104I, N76D/S99D/S101R/S103A/V104I a N76D/S101R/V104I.
- 15 22. Varianta subtilisinu podle nároku 21, obsahující skupinu substitucí N76D/S103A/V104I.
- 20 23. Izolovaná varianta subtilisinu se sekvencí aminokyselin obsahující kombinované skupiny substitucí odlišnými přírodními aminokyselinami, přičemž tyto kombinované skupiny substitucí jsou provedeny v polohách, které se volí ze skupiny poloh, ekvivalentních polohách 76/99, 76/101, 76/103, 76/104, 76/107, 76/123, 76/99/101, 76/99/103, 76/99/104, 76/101/103, 76/101/104, 76/103/104, 76/104/107, 76/104/123, 76/107/123, 76/99/101/103, 76/99/101/104, 76/99/103/104, 76/101/103/104, 76/103/104/123, 76/104/107/123, 76/99/101/103/104, 76/99/103/104/123; 76/99/101/103/104/123; 76/103/104/128; 76/103/104/260; 76/103/104/265; 76/103/104/197; 76/103/104/105; 76/103/104/135; 76/103/104/126; 76/103/104/107; 76/103/104/210; 76/103/104/126/265, 76/103/104/156/166/210; 76/101/103/104/166/210; 25 76/101/103/104/156/166/210 a 76/103/104/222.

20 výkresů



OBR.1A

OBR.1B-1

[illegible]

OBR.1B-2

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 AAC ACC ACT ACA AAA CTT GGT GAT TCT TTC TTC IAT GGA AAA GGG CTG ATC AAC

270
 Val Gln Ala Ala Ala Gln OC
 1224 GTA CAG GCG GCA GCT CAG TAA AACATAAAACCGGCCTTGGCCCTTGGCCCGCCGGTTTTTATTTTCTCTCCGCAIGTTCATCCGGCTCC

TERM

1316 ATAATCGACGGAIGGCTCCCTCTGAAATTTTAACGAGAAACGGCGGGTTGACCCGGCTCAGTCCCGTACGGCCAAAGTCCIGAAACGTCICAATCGCCG

1416 CTCCCGGTTTCCGGTCAGCTCAATGCCGTAACGGTCGGCGGGGTTTCCCTGATACCGGGAGACGGCATTCGTAAICGGATC

OBR.1B-3

OBR.1B

OBR.1B-1

OBR.1B-2

OBR.1B-3

Konzervované zbytky v subtilisinu 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 . .		

OBR.2

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 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 Q A S 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 V 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 N 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 V 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 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 A 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 A 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 A S G N S G A G S				

OBR.3A

161 S S S T V G Y P G K Y P S V I A V G A V D S S N Q R A S F S S V G P E L D V M A
 S T S T V G Y P A K Y P S T I A V G A V N S S N Q R A S F S S A G S E L D V M A
 S T N T I G Y P A K Y P S V I A V G A V D S S N Q R A S F S S V G A E L D V M A
 * * * I S Y P A R Y A N A M A V G A T D Q N N R A S F S S Q Y G A G L D I V A

201 P G V S I Q S T L P G N K Y G A Y N G T S M A S P H V A G A A L I L S K H P N
 P G V S I Q S T L P G N K Y G A Y N G T S M A S P H V A G A A L I L S K H P T
 P G A G V Y S T Y P T N T Y A T L N G T S M A S P H V A G A A L I L S K H P N
 P G V N V Q S T Y P G S T Y A S L N G T S M A S P H V A G A A L I L S K H P S

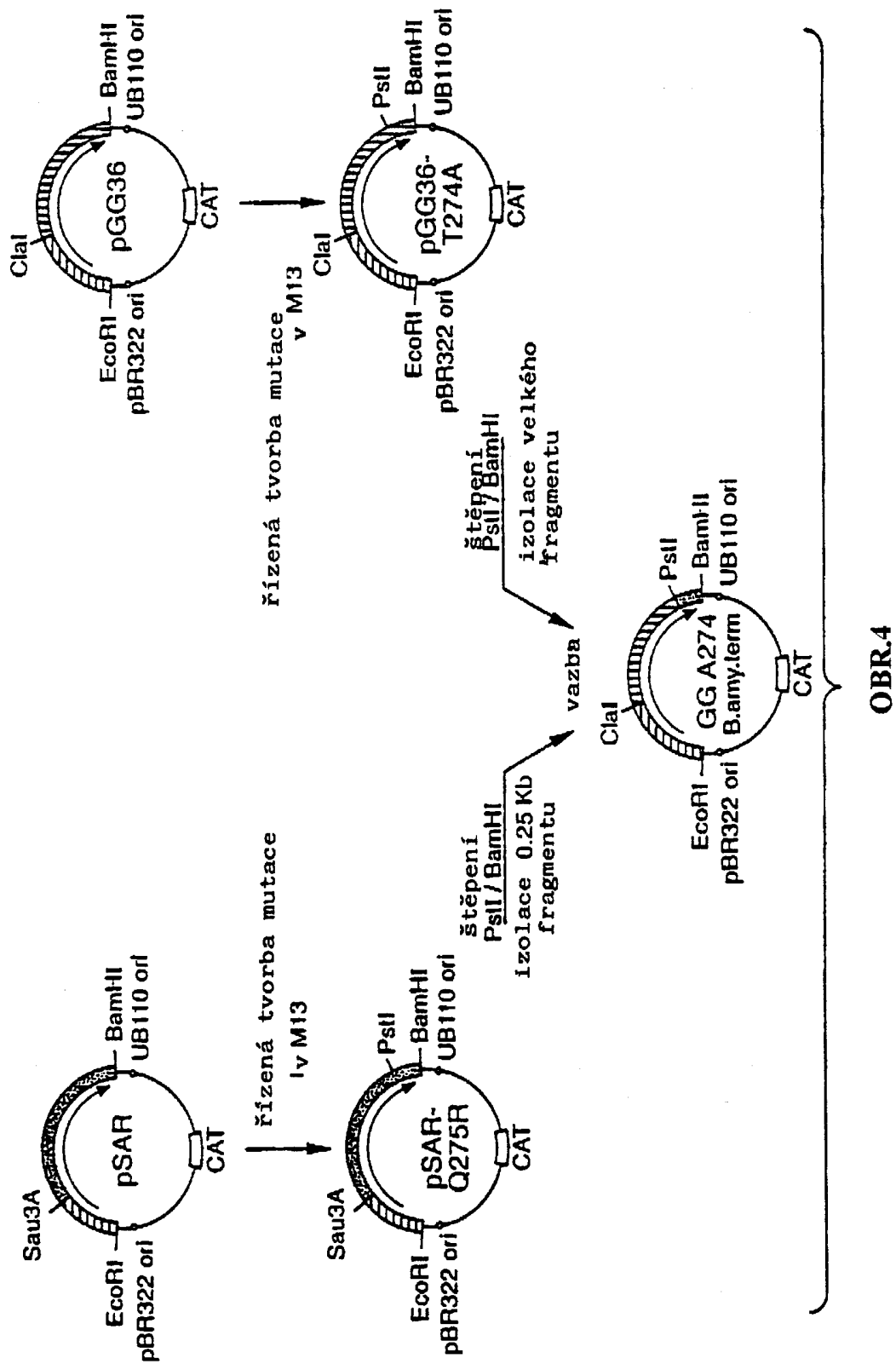
241 W T N T Q V R S S L E N T T K L G D S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q
 W T N A Q V R D R L E S T A T Y L G N S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q
 L S A S Q V R R N L S S T A T Y L G S S T N L Y G S G L V N A E A A T R
 W S N V Q I R R N H L K N T A T S L G S T N L Y G S G L V N A E A A T R

OBR.3B

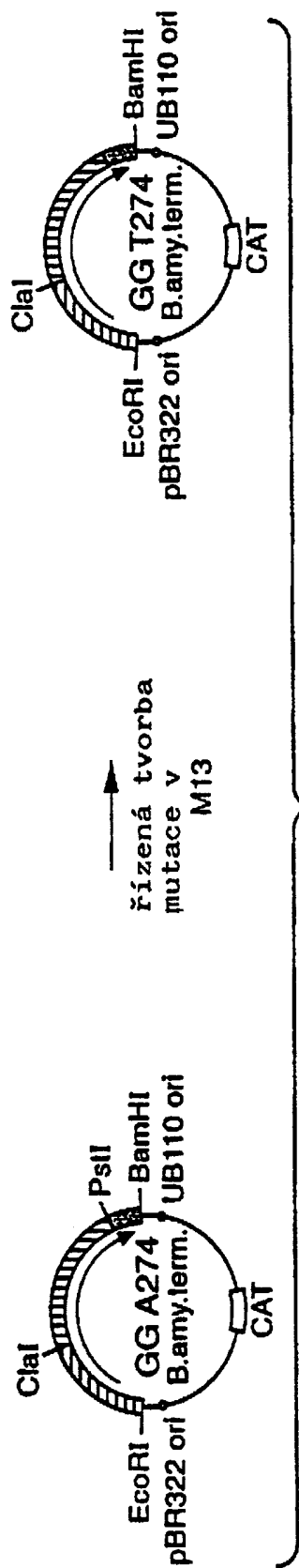
OBR.3

OBR.3A

OBR.3B



OBR.4



OBR.5

10	30	50
ATGAAGAAACCGTTGGGGAAAATTGTCGCAAGCACCGCACTACTCATTTCTGTGCTTTT		
MetLysLysProLeuGlyLysIleValAlaSerThrAlaLeuLeuIleSerValAlaPhe		
70	90	110
AGTTCAATCGATCGCATCGGCTGCTGAAGAACCAAGAAATAATTTAATTGGCTTTAAT		
SerSerSerIleAlaSerAlaAlaGluGluAlaLysGluLysTyrLeuIleGlyPheAsn		
130	150	170
GAGCAGGAAGCTGTCAGTGAGTTTGTAGAACACAGTAGAGGCAAAATGACGAGGTCGCCATT		
GluGlnGluAlaValSerGluPheValGluGlnValGluAlaAsnAspGluValAlaIle		
190	210	230
CTCTCTGAGGAAGAGGAAGTCGAAATTGAAATGCTTCATGAATTTGAAACGATTCCTGTT		
LeuSerGluGluGluGluValGluIleGluLeuLeuHisGluPheGluThrIleProVal		
250	270	290
TTATCCGTTGAGTTAAGCCACAGAGATGTGGACGCGCTTGAACTCGATCCAGCGATTCT		
LeuSerValGluLeuSerProGluAspValAspAlaLeuGluLeuAspProAlaIleSer		
310	330	350
TATATTGAAGAGGATGCAGAGTAACGACAAATGGCGCAATCAGTGCCCATGGGGAATTAGC		
TyrIleGluGluAspAlaGluValThrThrMetAlaGlnSerValProTrpGlyIleSer		
370	390	410
CGTGTGCAAGCCCCAGCTGCCCATAAACCGTGATGACAGGTTCTGGTGTAAGTTGCT		
ArgValGlnAlaProAlaAlaHisAsnArgGlyLeuThrGlySerGlyValLysValAla		

OBR.6A

430	450	470
GTCCTCGATACAGGTATTCCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGGCGTAGCTTT		
ValLeuAspThrGlyIleSerThrHisProAspLeuAsnIleArgGlyGlyAlaSerPhe		
490	510	530
GTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGCATGGCACGCATGTGGCCGGACG		
ValProGlyGluProSerThrGlnAspGlyAsnGlyHisGlyThrHisValAlaGlyThr		
550	570	590
ATTGCTGCTTTAAACAATTCGATTGGCGTCTCTTGGCGTAGCGCCGAGGGCGAACTATAC		
IleAlaAlaLeuAsnAsnSerIleGlyValLeuGlyValAlaProSerAlaGluLeuTyr		
610	630	650
GCTGTAAAGTATTAGGGGCGAGCGGTTTCAGGTTTCGGTCAGCTCGATTGCCAAGGATTG		
AlaValIleValLeuGlyAlaSerGlySerGlySerValSerSerIleAlaGlnGlyLeu		
670	690	710
GAAATGGCAGGGAACAAATGGCATGCACGTTGCTAATTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCA		
GluTrpAlaGlyAsnAsnGlyMethHisValAlaAsnLeuSerLeuGlySerProSerPro		
730	750	770
AGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGAGGCGTTCTTGTGTAGCG		
SerAlaThrLeuGluGlnAlaValAsnSerAlaThrSerArgGlyValLeuValValAla		
790	810	830
GCATCTGGGAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCGTTATGCGAAGCAATG		
AlaSerGlyAsnSerGlyAlaGlySerIleSerTyrProAlaArgTyrAlaAsnAlaMet		

OBR.6B

850	870	890
GCAGTCGAGCTACTGACCAAAACAACCGCGCCAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGG		
AlaValGlyAlaIaThrAspGlnAsnAsnArgAlaSerPheSerGlnTyrGlyAlaGly		
910	930	950
CTTGACATTGTGCGCACCGGTGTAAACGTGCAGAGCACATACCCAGGTTCAACGTATGCC		
LeuAspIleValAlaProGlyValAsnValGlnSerThrTyrProGlySerThrTyrAla		
970	990	1010
AGCTTAAACGGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTCAGGTGCAGCGCCCTTGTTAAA		
SerLeuAsnGlyThrSerMetAlaIaThrProHisValAlaGlyAlaAlaLeuValLys		
1030	1050	1070
CAAAAGAACCCCATCTTGGTCCAATGTACAAATCCGCAATCATCTAAAGAAATACGGCAACG		
GlnLysAsnProSerTrpSerAsnValGlnIleArgAsnHisLeuLysAsnThrAlaThr		
1090	1110	1130
AGCTTAGGAAGCACGAACTTGTATGGAGCGGACTTGTCAATGCAGAGCGGCAACACGC		
SerLeuGlySerThrAsnLeuTyrGlySerGlyLeuValAsnAlaGluAlaIaThrArg		

OBR.6C

OBR.6A

OBR.6B

OBR.6C

OBR.6

10	30	50
ATGAAGAAACCGTTGGGGAAATTCGCAAGCACCGCACTACTCATTTCTGTGCTTTT		
MetLysLysProLeuGlyLysIleValAlaSerThrAlaLeuLeuIleSerValAlaPhe		
70	90	110
AGTTCATCGATCGCATCGGCTGCTGAAGAAGCAAAAGAAAAATATTAAATTGGCTTTAAT		
SerSerIleAlaSerAlaAlaGluGluAlaLysGluLysTyrLeuIleGlyPheAsn		
130	150	170
GAGCAGGAAGCTGTCAGTGAGTTTGTAGAACAAAGTAGAGGCAATGACGAGGTCGCCATT		
GluGlnGluAlaValSerGluPheValGluGlnValGluAlaAsnAspGluValAlaIle		
190	210	230
CTCTCTGAGGAAGGAAAGTCGAAATTGAAATTGCTTCATGAATTTGAAACGATTCCCTGTT		
LeuSerGluGluGluGluValGluIleGluLeuLeuHisGluPheGluThrIleProVal		
250	270	290
TTATCCGTTGAGTTAAGCCCAAGATGTGGACGCGCTTGAACTCGATCCAGCGATTCT		
LeuSerValGluLeuSerProGluAspValAspAlaLeuGluLeuAspProAlaIleSer		
310	330	350
TATATTGAAGAGGATGCAGAAGTAACGACAATGGCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGC		
TyrIleGluGluAspAlaGluValThrThrMetAlaGlnSerValProTrpGlyIleSer		
370	390	410
CGTGTGCAAGCCCCAGCTGCCCATAAACCGTGATTGACAGGTTCTGGTGTAAGTTGCT		
ArgValGlnAlaProAlaAlaHisAsnArgGlyLeuThrGlySerGlyValLysValAla		

OBR.7A

430	450	470
GTCCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGGCGTAGCTTT		
ValLeuAspThrGlyIleSerThrHisProaspLeuAsnIleArgGlyGlyAlaSerPhe		
490	510	530
GTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGCATGGCACGCATGTGCCGGGACG		
ValProGlyGluProSerThrGlnAspGlyAsnGlyHisGlyThrHisValAlaGlyThr		
550	570	590
ATTGCTGCTTTAGACAACTCGATTGGCGTTCTTGGCGTAGCCCGGAGCGGAACTATAC		
IleAlaAlaLeuAspAsnSerIleGlyValLeuGlyValAlaProSerAlaGluLeuTyr		
610	630	650
GCTGTAAAGTATTAGGGCGAGCGGTTTCAGGCGCCATCAGCTCGATTGCCCAAGATTG		
AlaValIlyValLeuGlyAlaSerGlySerGlyAlaIleSerSerIleAlaGlnGlyLeu		
670	690	710
GAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTTGCTAATTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCA		
GluTrpAlaGlyAsnAsnGlyMetHisValAlaAsnLeuSerLeuGlySerProSerPro		
730	750	770
AGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGAGCGCTTCTTGTGTAGCG		
SerAlaThrLeuGluGlnAlaValAsnSerAlaThrSerArgGlyValLeuValValAla		
790	810	830
GCATCTGGGAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCGTTATGCCGAACGCAATG		
AlaSerGlyAsnSerGlyAlaGlySerIleSerTyrProAlaArgTyrAlaAsnAlaMet		

OBR.7B

850	870	890
GCAGTCGGAGCTACTGACCAACAACCGCGCCAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGG		
AlaValGlyAlaThrAspGlnAsnAsnArgAlaSerPheSerGlnTyrGlyAlaGly		
910	930	950
CTTGACATTGTCGCACCGGTGTAAACGTGCAGAGCACATACCCAGGTTCAACGTATGCC		
LeuAspIleValAlaProGlyValAsnValGlnSerThrTyrProGlySerThrTyrAla		
970	990	1010
AGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAGCCCTTGTTAAA		
SerLeuAsnGlyThrSerMetAlaThrProHisValAlaGlyAlaAlaLeuValLys		
1030	1050	1070
CAAAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTACAATCCGCAATCATCTAAAGAAATACGGCAACG		
GlnLysAsnProSerTrpSerAsnValGlnIleArgAsnHisLeuLysAsnThrAlaThr		
1090	1110	1130
AGCTTAGGAAGCACGAACCTTGATGGAAGCGGACTTGTCAAATGCAGAAGCGGCAACACGC		
SerLeuGlySerThrAsnLeuTyrGlySerGlyLeuValAsnAlaGluAlaAlaThrArg		

OBR.7C

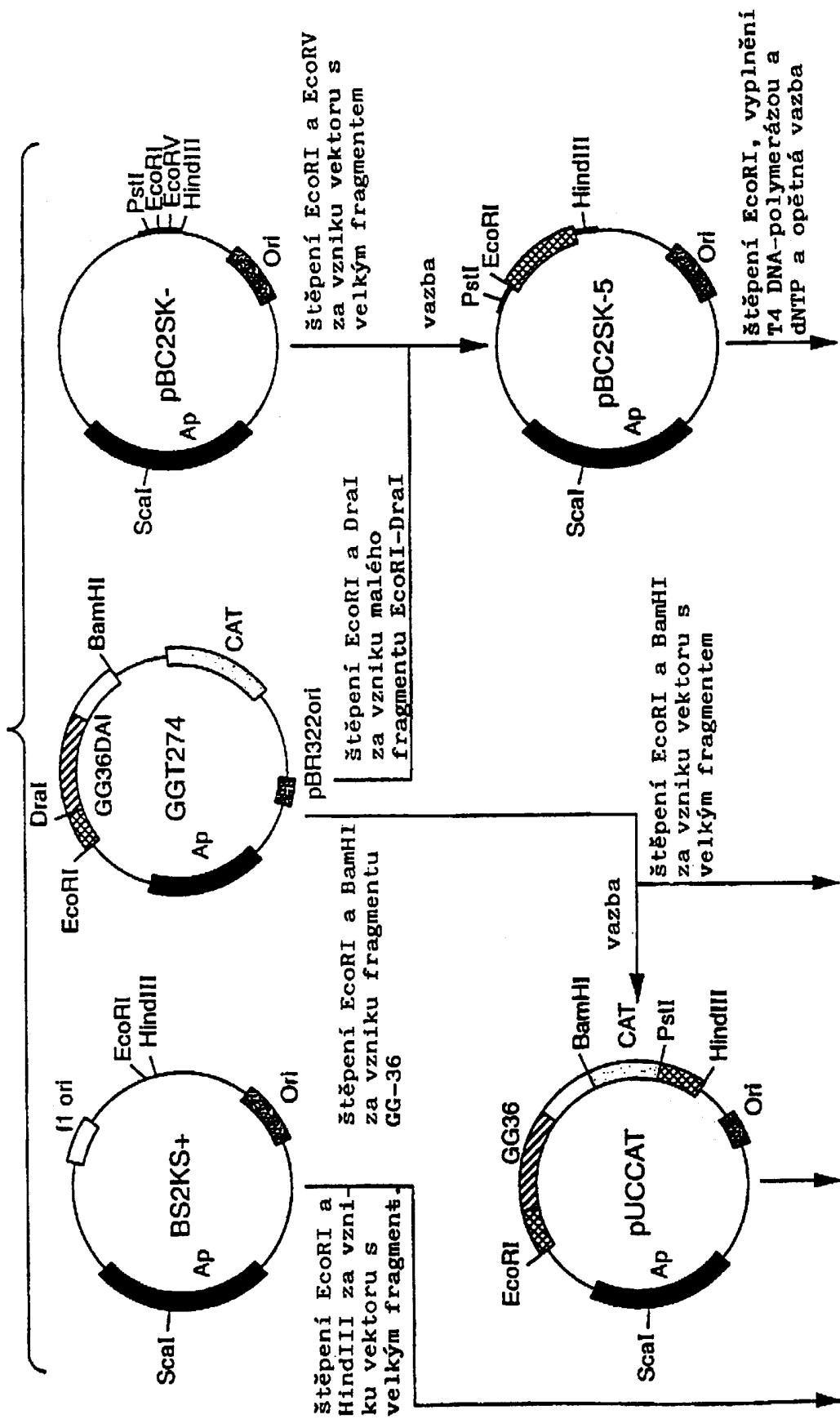
OBR.7A

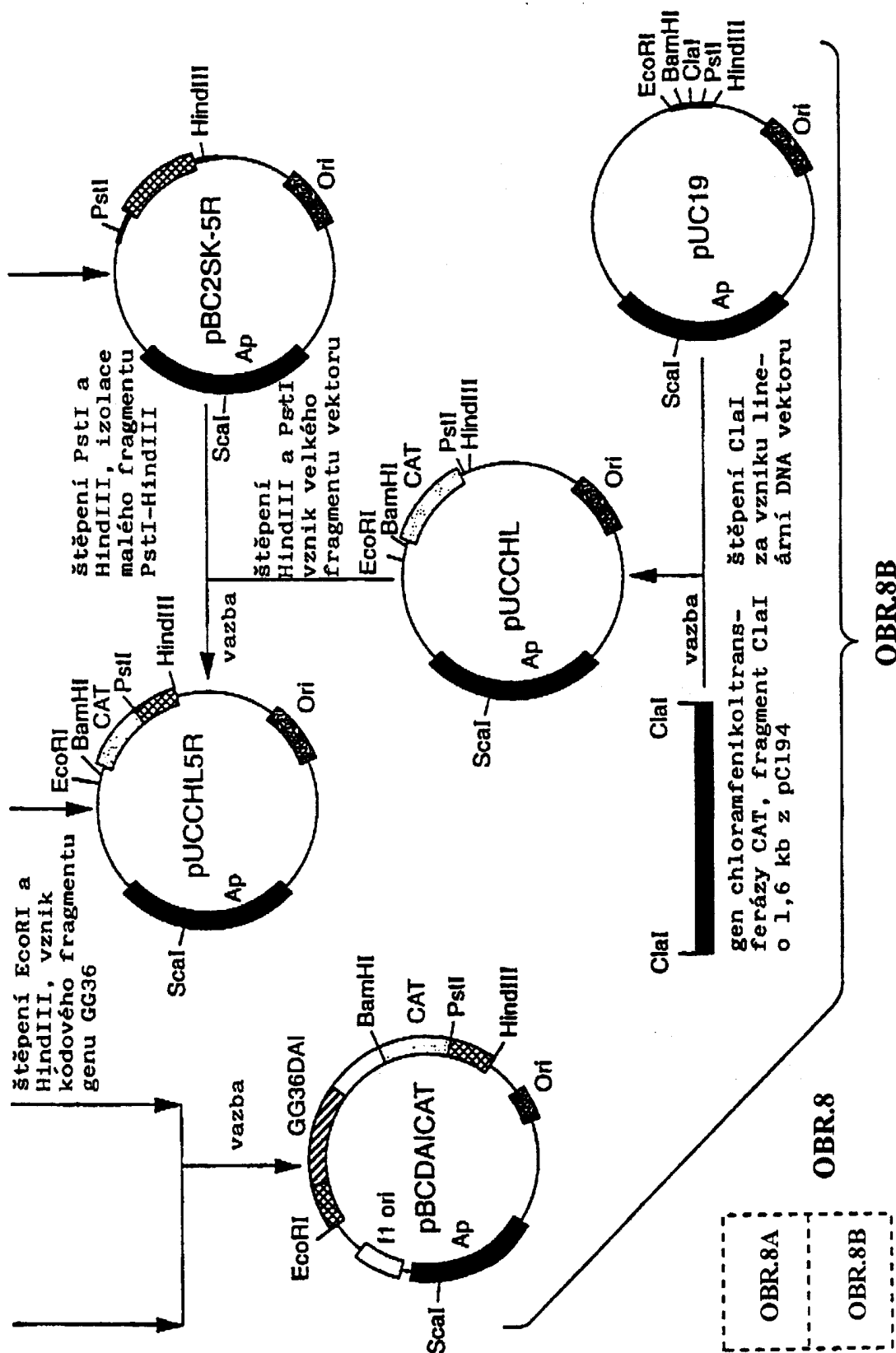
OBR.7B

OBR.7C

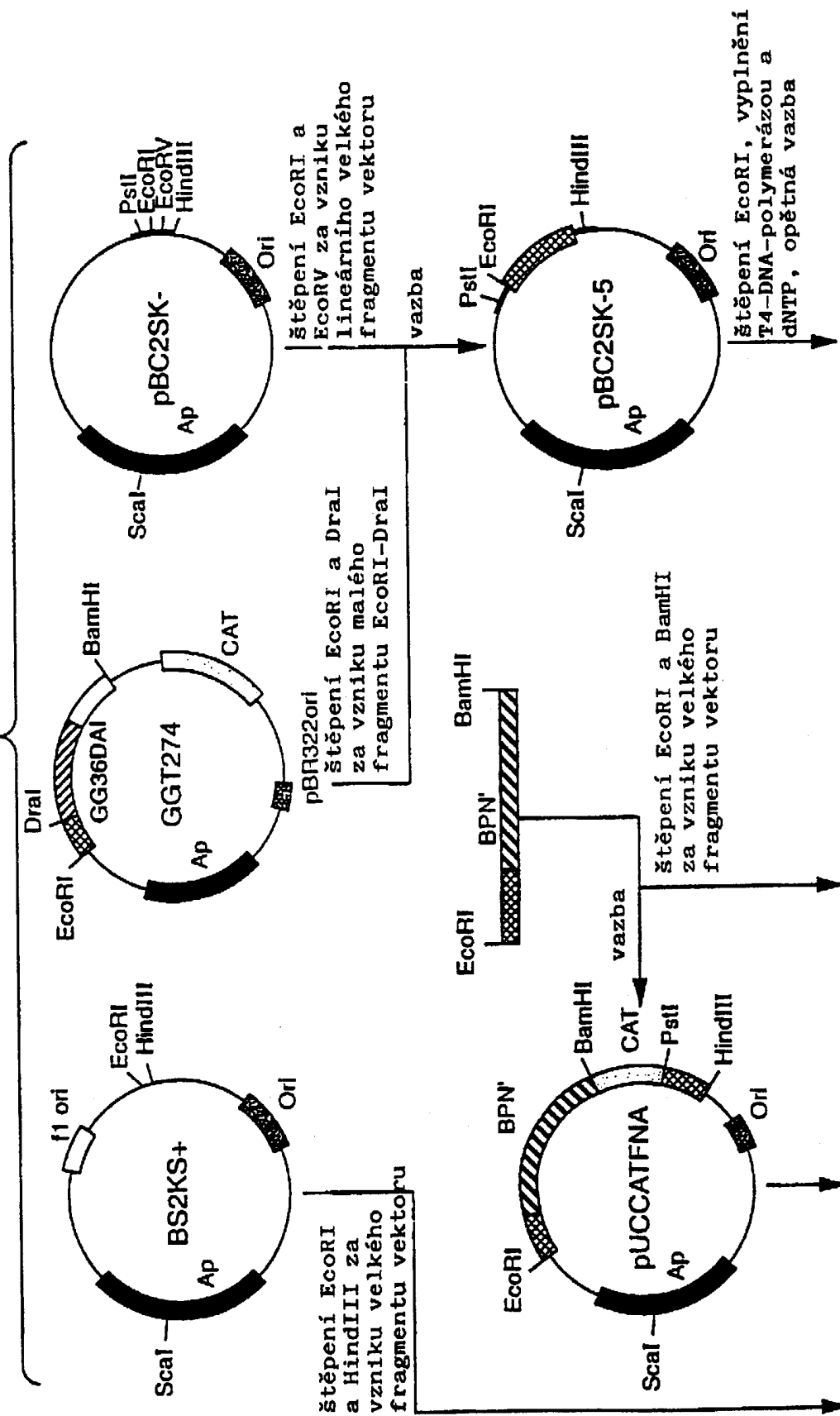
OBR.7

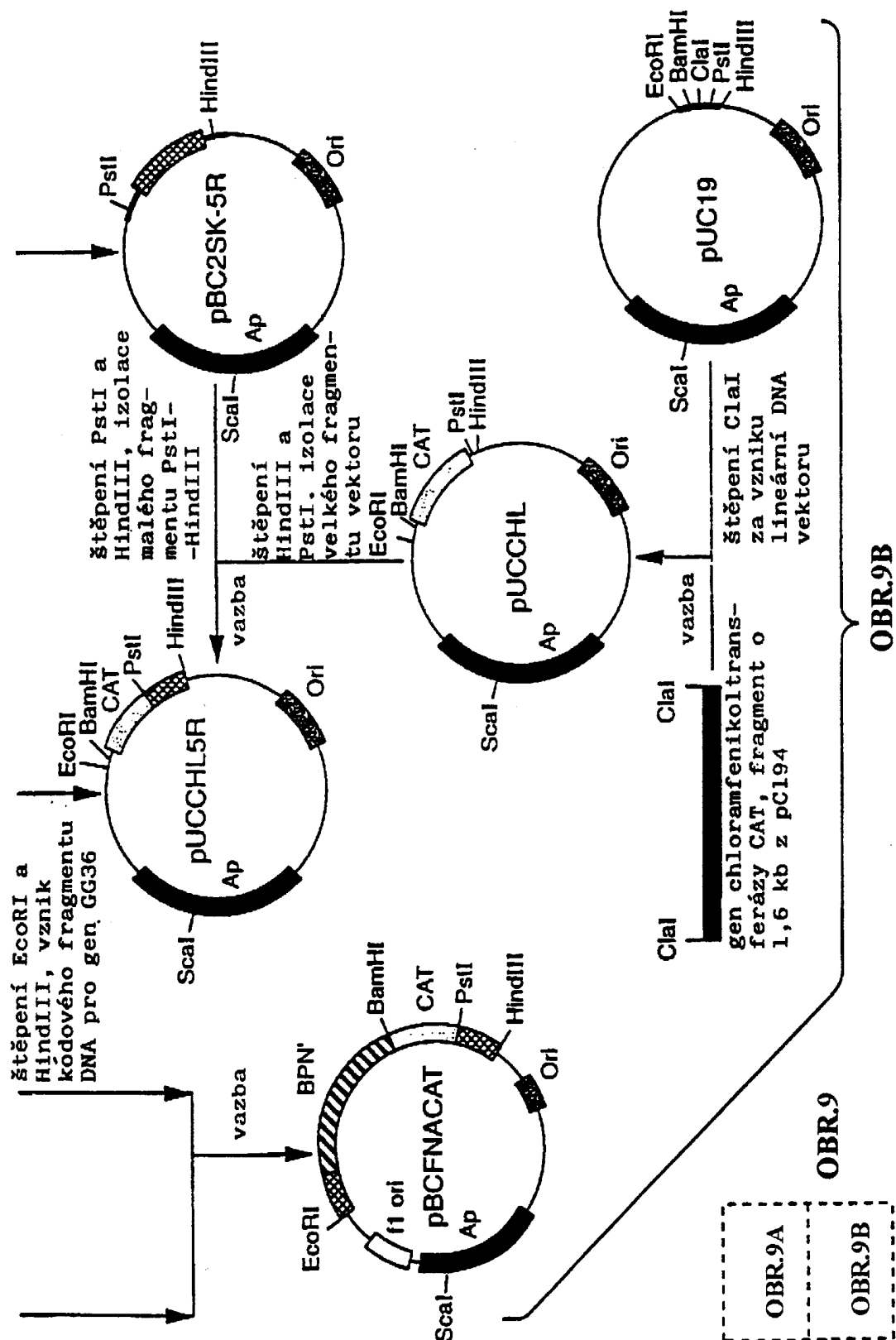
OBR.8A

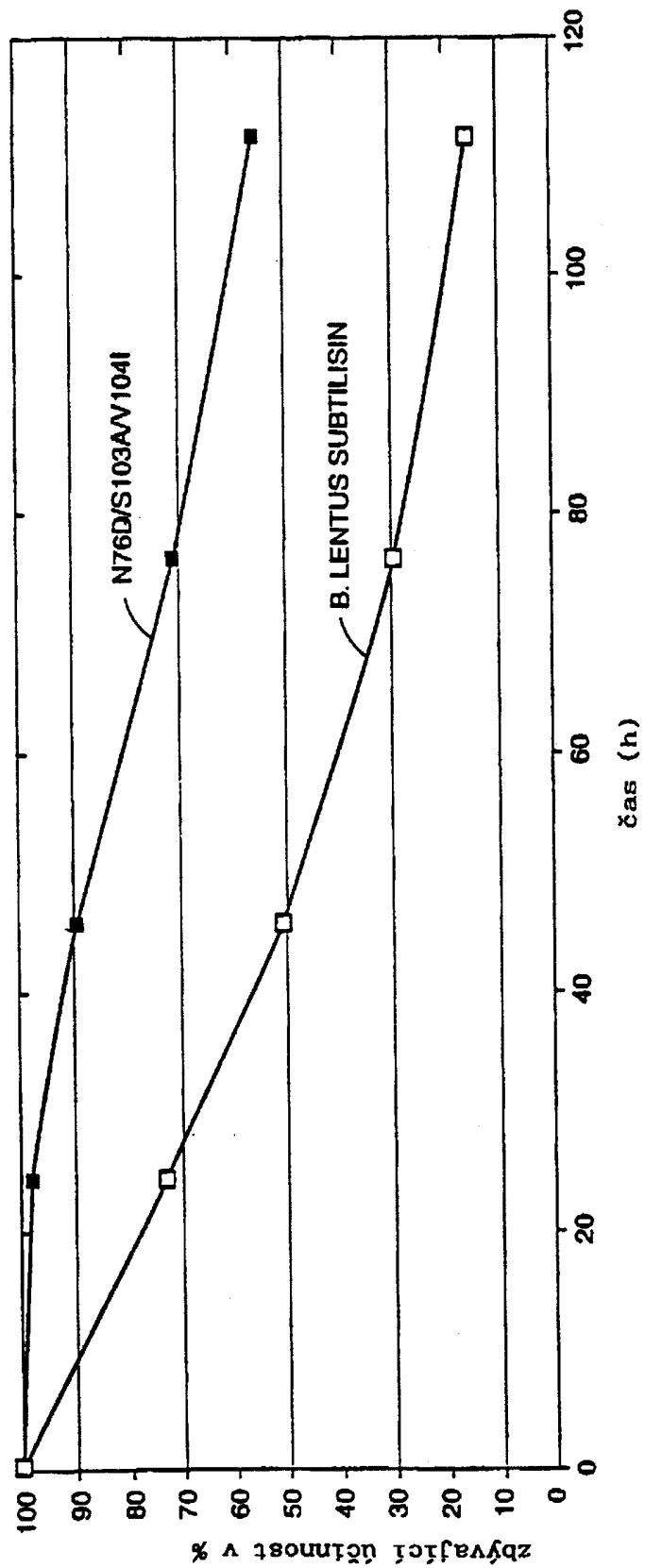




OBR.9A







OBR.10

Konec dokumentu
