(19) **RU** (11) **2 136 756** (13) **C1**

(51) МПК[6] **C 12 N 15/57, 9/54**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: **96109372/13, 13.10.1994**

(24) Дата начала действия патента: **13.10.1994**

(30) Приоритет: **14.10.1993 US 137,240**

(46) Дата публикации: **10.09.1999**

(56) Ссылки: **EP 0405901 A1, 02.01.91. WO 89/09619 A1, 19.10.89. SU 1440922 A, 30.11.88.**

(85) Дата перевода заявки PCT на национальную фазу: **14.05.96**

(86) Заявка PCT:
US 94/11562 (13.10.94)

(87) Публикация PCT:
WO 95/10615 (20.04.95)

(98) Адрес для переписки:
103104, Москва, Б.Палашевский пер., д.3, офис. 2, "Гоулинг, Страти и Хендерсон", Патентному поверенному Дементьеву В.Н.

(71) Заявитель:
Жененкор Интернейшенл Инк. (US)

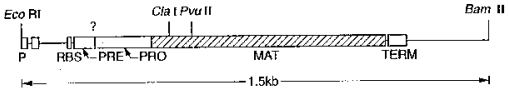
(72) Изобретатель: **Грейкар Томас П. (US), Ботт Ричард Р. (US), Уилсон Лори Дж. (US)**

(73) Патентообладатель:
Жененкор Интернейшенл Инк. (US)

(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЙ СУБТИЛИЗИН, ДНК, КОДИРУЮЩАЯ МОДИФИЦИРОВАННЫЙ СУБТИЛИЗИН, ВЕКТОР ЭКСПРЕССИИ, КОДИРУЮЩИЙ ДНК, И ШТАММ КУЛЬТУРЫ КЛЕТКИ ХОЗЯИНА

(57) Реферат:

Изобретение характеризует модифицированную карбонилгидролазу. В аминокислотной последовательности субтилизина заменены 76 аминокислотный остаток и по меньшей мере еще один аминокислотный остаток. Модификация позволяет повысить протолитическую активность фермента. 4 с. и 7 з.п. ф-лы, 10 ил., 7 табл.



ФИГ.1А

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

(19) **RU** (11) **2 136 756** (13) **C1**

(51) Int. Cl.[6] **C 12 N 15/57, 9/54**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 96109372/13, 13.10.1994

(24) Effective date for property rights: 13.10.1994

(30) Priority: 14.10.1993 US 137,240

(46) Date of publication: 10.09.1999

(85) Commencement of national phase: 14.05.96

(86) PCT application:
US 94/11562 (13.10.94)

(87) PCT publication:
WO 95/10615 (20.04.95)

(98) Mail address:
103104, Moskva, B.Palashevskij per., d.3,
ofis. 2, "Gouling, Strati i Khenderson",
Patentnomu poverennomu Dement'evu V.N.

(71) Applicant:
Zhenenkor Internejshenl Ink. (US)

(72) Inventor: Grejkar Tomas P. (US),
Bott Richard R. (US), Uilson Lori Dzh. (US)

(73) Proprietor:
Zhenenkor Internejshenl Ink. (US)

(54) MODIFIED SUBTILYSINE, DNA ENCODING MODIFIED SUBTILYSINE, EXPRESSION VECTOR ENCODING DNA AND STRAIN OF HOST CELL CULTURE

(57) Abstract:

FIELD: molecular biology, biochemistry. SUBSTANCE: invention relates to the modified carbonylhydrolase. In amino acid sequence of subtilysine 76 amino acid residues and at least one additional amino acid residue are substituted. EFFECT: enhanced proteolytic activity of enzyme by modification. 11 cl, 7 tbl, 24 dwg, 7 ex

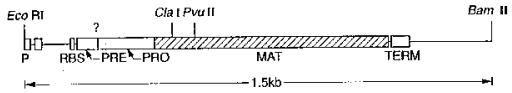


FIG. 1A

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

Настоящее изобретение относится к новым вариантам карбонилгидролазы с аминокислотными последовательностями, в которых многочисленные аминокислотные остатки предшественника карбонилгидролазы, особенно в положении, соответствующем или эквивалентном +760, в сочетании с одним или более аминокислотным остатком, выбранным из группы, включающей положения +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 и/или +274 в последовательности субтилизина Bacillus amyloliquefaciens замещены другими аминокислотами. Такие мутанты/варианты карбонилгидролазы в основном получают путем модификации in vitro последовательности ДНК, кодирующей предшественник природной или рекомбинантной карбонилгидролазы, так что в соответствующей аминокислотной последовательности предшественника карбонилгидролазы происходят замещения многочисленных аминокислотных остатков сами по себе или в сочетании с другими замещениями в других положениях, а также с другими инсерциями и делециями.

Предпосылки создания изобретения.

Сериновые протеиназы относятся к подгруппе карбонилгидролаз. Они составляют отдельный класс ферментов, обладающих широкой специфичностью и многочисленными биологическими функциями (см. Stroud.R. Sci.Amer., 131:74-88). Несмотря на функциональную разнородность, механизм каталитического расщепления сериновых протеиназ свойственен по крайней мере двум генетически различным семействам ферментов: субтилизинам и химотрипсину млекопитающих, родственным и гомологичным бактериальным сериновым протеиназам (например, трипсину и трипсину S. gresius). Эти два семейства сериновых протеиназ обнаруживают значительное сходство механизмов катализа (Kraut.J. (1977), Ann.Rev.Biochem. , 46: 331-358. Более того, несмотря на различие первичной структуры, третичную структуру ферментов этих двух семейств объединяет наличие каталитическиактивной триады аминокислот, состоящей из серина, гистидина и аспартата.

Субтилизин представляет собой сериновую эндопротеиназу (м.масса 27,500), которая в больших количествах секретируется многими видами Bacillus и другими микроорганизмами. Белковая последовательность субтилизина определена по крайней мере у четырех различных видов Bacillus. (Markland.F.S., et al., Honne-Seyler's Z. Physiol. Chem., 364:1537-1540). Опубликована и трехмерная кристаллографическая структура субтилизина Bacillus amyloliquefaciens при разрешении 2,5 A. (Wright, C.S., et al., (1969), Nature, 221:235- 242: Drenth. J., et al.,(1972), Eur.J.Biochem., 26:177-181. Эти исследования показывают, что несмотря на отсутствие генетического родства субтилизина с сериновыми протеиназами млекопитающих, указанные ферменты имеют сходное строение активного центра. Кристаллические структуры субтилизина (полученные при использовании рентгеновских лучей), содержащие ковалентно-связанные пептидные ингибиторы (Robertus. J.D., et al., (1972), Biochemistry, 11:2439-2449) или комплексы продукта (Robertus. J. D. , et al., (1976), J.Biol. Chem., 251: 1097-1103) также позволяют судить об активном центре и предполагаемой субстратсвязывающей "щели" субтилизина. Кроме того, опубликовано множество исследований, посвященных кинетической активности и химическим модификациям пневмолизина (Philipp, M., et a1. (1983), Mol.Cell.Biochem., 51:5-32; Svendsen, B. (1976), Carlsberg Res.Comm., 41;237-291; Markland, F.S., Id.). По крайней мере в одной работе описан субтилизин, у которого боковая цепь метионина в положении 222 под действием перекиси водорода превращена в метионинсульфоксид (Stauffer, D.C., et al., (1965), J.Biol.Chem., 244: 5333-5338), а боковая цепь серина в положении 221 путем химической модификации преобразована в цистеин (Polgar, et al., (1981), Biochimica et Biophysica Acta, 667:351-354.)

В патенте США N 4,760,025 (RE 34,606) описывается субтилизин, содержащий модифицированные аминокислотные остатки, соответствующие следующим аминокислотам субтилизина Bacillus amyloliquefaciens: тирозин -1, аспартат +32, аспарагин +155, тирозин +104, метионин +222, глицин +166, гистидин +64, глицин +169, фенилаланин +189, серин +33, серин +221, тирозин +217, глутамат +156 и аланин +152. В патенте США N 5,182,204 описан пневмолизин, содержащий модифицированный аминокислотный остаток в положении +224 субтилизина Bacillus amyloliquefaciens и других субтилизинов, причем модификацию осуществляют путем замещения, инсерции или делеции, и она может быть скомбинирована с модификациями аминокислотных остатков, указанных в патенте США 4,760,025 (RE 34,606), что приводит к получению полезных мутантных форм или вариантов субтилизина. В патенте США N 5,155,033 описываются сходные мутантные формы субтилизина, имеющие модифицированный аминокислотный остаток в положении +225 B. amyloliquefaciens. В патентах США N 5,185,258 и 5,204,015 описываются мутантные формы субтилизинов, имеющие модифицированные аминокислотные остатки в положениях+123 и/или +274. Указанные документы приведены здесь в качестве ссылок, так же как и заявка на патент США SN 07/898,382, в которой охарактеризован субтилизин, имеющий модифицированные аминокислотные остатки в положениях +99, +101, +103, +107, +126, +128, +135, +197 и +204. Все указанные патенты и заявки легко доступны. В патенте США N 4,914, 031 описываются некоторые аналоги субтилизина, включая субтилизин с модифицированным аминокислотным остатком в положении +76. Данный патент также приведен здесь в качестве ссылки. Однако аминокислотные остатки, модифицированные согласно настоящему изобретению, и/или особые их комбинации, заявленные в формуле, в указанных выше источниках информации не раскрыты.

В соответствии с вышесказанным, один из заявленных объектов относится к вариантам карбонилгидролазы (предпочтительно

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

субтилизину Bacillus amyloliquefaciens), содержащим многочисленные замены аминокислотных остатков в предшественнике карбонилгидролазы, в том числе +76 в сочетании с одной или более заменами, выбранными из группы, включающей положения + 99, +4101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210,+216, +217, +218, +222, +260, +265 4 и/или +274. Такие варианты в целом имеют по крайней мере одно свойство, отличное от аналогичного свойства предшественника карбонилгидролазы, из аминокислотной последовательности которого получена аминокислотная последовательность данного варианта.

Другими объектами изобретения являются последовательности ДНК, кодирующие варианты карбонилгидролазы, а также векторы экспрессии, содержащие указанные ДНК-последовательности.

Еще одним объектом изобретения являются клетки-хозяева, трансформированные указанными векторами, так же как и клетки-хозяева, способные экспрессировать соответствующие ДНК с образованием вариантов карбонилгидролазы как внутриклеточно, так и внеклеточно.

Указанные выше ссылки приведены здесь исключительно для описания уровня техники, известного на дату подачи заявки, и ничто не может поставить под сомнение право изобретателей использовать с этой целью информацию, основанную на ранее поданных заявках.

Краткое описание изобретения.

Изобретение относится к неприродным вариантам карбонилгидролаз, имеющим измененные протеолитическую активность, стабильность, субстратную специфичность, pH-профиль и/или физико-химические свойства по сравнению с предшественником карбонилгидролазы, из аминокислотной последовательности которого получают аминокислотную последовательность того или иного варианта. Предшественник карбонилгидролазы может быть природной или рекомбинантной карбонилгидролазой. Указанные варианты карбонилгидролазы имеют аминокислотную последовательность, которая не обнаруживается в природе, и образована в результате замещений многочисленных аминокислотных остатков в предшественнике- карбонилгидролазы другими аминокислотами. Эти многочисленные аминокислотные остатки в ферменте-предшественнике соответствуют положению +76 в сочетании с одним или более следующими положениями: +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 и/или +274, причем данная нумерация соответствует порядку аминокислот в природном субтилизине Bacillus amyloliquefaciens или эквивалентным аминокислотным остаткам в других карбонилгидролазах или субтилизинах, например в субтилизине Bacillus lentus. Варианты карбонилгидролазы, заявленные в настоящем изобретении, содержат замещение аминокислотного остатка в положении +76 в сочетании с одной или более другими модификациями.

Предпочтительные варианты ферментов, заявленные в настоящем изобретении, содержат замещения, делеции или инсерции аминокислотных остатков в следующих комбинациях: 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 и/или 76/103/104/222. Наиболее предпочтительные варианты ферментов, заявленные в настоящем изобретении, содержат замещения, делеции или инсерции аминокислотных остатков в субтилизине B. amyloliquefaciens в следующих комбинациях: 76/99; 76/104; 76/99/104; 76/103/104; 76/104/107; 76/101/103/104; 76/99/101/103/104 и 76/101/104.

Изобретение также относится к вариантам ДНК-последовательностей, кодирующим указанные варианты карбонилгидролаз или субтилизина. Такие варианты ДНК-последовательностей происходят из ДНК-последовательности предшественника, которая кодирует природный или рекомбинантный фермент.

Для получения вариантов ДНК-последовательностей последовательность предшественника модифицируют так, что новая последовательность кодирует замещения одного или более специфических аминокислотных остатков, соответствующих положениям: 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 и/или 274 или их комбинациям в субтилизине Bacillus amyloliquefaciens. Несмотря на то, что аминокислотные остатки, подлежащие модификации, соответствуют таковым B. amyloliquefaciens (нумерация остатков подходит и для всех других субтилизинов), предпочтительной ДНК-последовательностью предшественника, используемой для осуществления настоящего изобретения, является ДНК-последовательность субтилизина Bacillus lentus, приведенная на фиг.6 (SEQ ID N 11).

Варианты ДНК-последовательностей, заявленные в настоящем изобретении, кодируют инсерции или замещения аминокислот в положении +76 в сочетании с одной или более другими модификациями. Предпочтительные варианты ДНК-последовательностей кодируют замещения или инсерции аминокислотных остатков в следующих сочетаниях: 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;

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

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 и/или 76/103/104/222. Наиболее предпочтительные варианты ДНК- последовательностей кодируют следующие модифицированные комбинации аминокислотных остатков: 76/99; 76/104; 76/103/104; 76/104/107; 76/101/103/104; 76/99/101/103/104 и 76/101/104. Указанные рекомбинантные ДНК-последовательности кодируют варианты карбонилгидролазы, имеющие новые последовательности аминокислот и, в целом, по крайней мере одно свойство, существенно отличающееся от аналогичного свойства предшественника карбонилгидролазы. К таким свойствам относятся протеолитическая активность, субстратная специфичность, стабильность, измененный pH-профиль и/или другие физико-химические признаки.

Настоящее изобретение относится к замещениям любой из 19 природных L-аминокислот в установленных положениях аминокислотной последовательности. Такие замещения могут осуществляться в любом предшественнике субтилизина (прокариотическом, эукариотическом, субтилизине млекопитающих и т.д.). Предпочтительно замещения осуществляют в каждом из идентифицированных положений аминокислотных остатков, которые не ограничиваются указанными: замещения в положении 76 включают D, H, E, G, F, K, P и N; замещения в положении 99 включают D, T, N, Q, G, и S; замещения в положении 101 включают G, D, K, L, A, E, S и R; замещения в положении 103 включают Q, T, D, E, Y, K, G, R, S и A; замещения в положении 104 включают все девятнадцать природных аминокислот; замещения в положении 107 включают V, L, M, Y, G, E, F, T, S, A, N и I; замещения в положении 123 включают N, T, I, G, A, C и S; замещения в положении 27 включают K, N, C, V и T; замещения в положении 105 включают A, D, G, R и N: замещения в положении 107 включают A, L, V, Y, G, F, T, S, и A; замещения в положении 109 включают S, K, R, A, N и D; замещения в положении 126 включают A, F, I, V и G: замещения в положении 128 включают G, L и A; замещения в положении 135 включают A, F, I, S и V; замещения в положении 156 включают D, E, A, G, Q, и K; замещения в положении 166 включают все девятнадцать природных аминокислот; замещения в положении 195 включают E; замещения в положении 197 включают E; замещения в положении 204 включают A, G, C, S и D; замещения в положении 206 включают L, Y, N, D и E; замещения в положении 210 включают L, I, S, C и F; замещения в положении 216 включают V, E, T и K; замещения в положении 217 включают все девятнадцать природных аминокислот; замещения в положении 218 включают S, A, G, T и V; замещения в положении 222 включают все девятнадцать природных аминокислот; замещения в положении 260 включают P, N, G, A, S, C, K и D; замещения в положении 265 включают N, G, A, S, C, K, Y и H; и замещения в положении 274 включают A и S. Особенно предпочтительные аминокислотные остатки, которые подлежат замещению в каждом из указанных положений, приведены в табл. 1. (см.в конце описания). Несмотря на это, следует понимать, что в каждом положении можно произвести замену на любую аминокислоту.

Кроме того, в настоящее изобретение включены векторы экспрессии, содержащие указанные варианты ДНК-последовательностей карбонилгидролазы, а также клетки-хозяева, трансформированные такими векторами и способные продуцировать указанные варианты. Изобретение относится также к детергентным композициям, в состав которых входят заявленные в настоящем изобретении варианты карбонилгидролазы.

Краткое описание рисунков.

На фиг. 1A-C приведены последовательности аминокислот и ДНК для субтилизина Bacillus amyloliquefaciens и частичная рестрикционная карта гена (SEQ ID N 6).

На фиг. 2 приведены консервативные аминокислотные остатки субтилизинов Bacillus amyloliquefaciens (BPN') и Bacillus lentis (дикий тип).

На фиг. 3A и 3B приведены аминокислотные последовательности четырех субтилизинов. Верхняя строка соответствует аминокислотной последовательности субтилизина Bacillus amyloliquefaciens (иногда обозначаемого как субтилизин BPN') (SEQ ID N 7). Вторая строка соответствует аминокислотной последовательности субтилизина Bacillus subtilis (SEQ ID N 8). Третья строка соответствует аминокислотной последовательности субтилизина B.licheniformis (SEQ ID N9). Четвертая строка соответствует аминокислотной последовательности субтилизина Bacillus lentis (также обозначаемого как субтилизин 309 в заявке PCT W089/06276) (SEQ ID N 10). Звездочка означает отсутствие специфических аминокислотных остатков в сравнении с субтилизином BPN'.

На фиг.4 приведена схема конструирования плазмиды GGA274.

На фиг. 5 приведена схема конструирования плазмиды GGT274, которая является промежуточной плазмидой по отношению к некоторым плазмидам экспрессии, используемым при осуществлении изобретения.

На фиг. 6A и 6B приведена аминокислотная последовательность субтилизина Bacillus lentis (SEQ ID N 11). Зрелый белок субтилизина кодируется последовательностью, начинающейся с кодона GCG (334-336), соответствующего аминокислоте аланину.

На фиг.7A и 7B приведены последовательности аминокислот и ДНК для субтилизина в случае предпочтительного варианта осуществления изобретения (N76D/S103A/V104I) (SEQ ID N 12). ДНК была модифицирована описанными способами, чтобы в положении 76 был закодирован аспартат, в положении 103 -аланин и в положении 104 - изолейцин. Вариант зрелого белка субтилизина кодируется последовательностью, начинающейся с кодона GCG (334-336), соответствующему аминокислоте аланину.

На фиг.8 приведена схема конструирования вектора pBCDAICAT.

На фиг.9 приведена схема

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

конструирования вектора pUCCATFNA.

Фиг.10 иллюстрирует стабильность предпочтительной мутантной формы фермента по сравнению с формой дикого типа в жидкой среде с детергентом.

Подробное описание изобретения.

Обнаружено, что полученные in vitro мутации в субтилизине B.lentus, затрагивающие аминокислотный остаток, эквивалентный таковому в положении +76 субтилизина Bacillus amyloliquefaciens, обеспечивают образование вариантов субтилизина, проявляющих измененную стабильность (например, измененную стабильность к аутопротеолизу) по сравнению с предшественником субтилизина. (см. табл.IV и VI в конце описания).

Кроме того, обнаружено, что полученные in vitro мутации в аминокислотных остатках в положениях +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 и/или +274 аминокислотной последовательности субтилизина Bacillus amyloliquefaciens как по отдельности, так и в комбинации друг с другом и в любом сочетании с мутациями в положении +76 приводят к образованию вариантов субтилизина с измененной протеолитической активностью, термостабильностью, субстратной специфичностью, а также с измененными профилем pH и физико-химическими свойствами.

Карбонилгидролазы относятся к ферментам, которые гидролизуют соединения, содержащие



связи, в которых X представляет собой кислород или азот. Известны карбонилгидролазы природного происхождения и рекомбинантные. К природным карбонилгидролазам относятся собственно гидролазы, например пептидные гидролазы, такие как субтилизины или металлопротеиназы. Пептидные гидролазы включают альфа-аминоацилпептидную гидролазу, пептидиламинокислотную гидролазу, ациламиногидролазу, сериновую карбоксипептидазу, металлокарбоксипептидазу, тиоловую протеиназу, карбоксилпротеиназу и металлопротеиназу. К сериновым, тиоловым, аминокислотным и металлопротеиназам относятся как эндо-, так и экзопротеиназы.

К рекомбинантной карбонилгидролазе относится карбонилгидролаза с модифицированной последовательностью ДНК, для получения которой в ДНК природной карбонилгидролазы генерируют мутации, определяющие замену, инсерцию или делецию одного или более аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности природной карбонилгидролазы. Соответствующие способы модификации описаны в настоящей заявке, а также в патентах США N 4,760,025 (RE 34,606), N 5,204,015 и 5,185,258, которые приведены здесь в качестве ссылок.

Субтилизины представляют собой бактериальные или грибные карбонилгидролазы, которые в основном расщепляют пептидные связи в белках и пептидах. Используемое здесь понятие "субтилизин" относится как к природному, так и к рекомбинантному субтилизину. Известно, что различные виды микроорганизмов продуцируют и во многих случаях секретируют определенные природные субтилизины. Их аминокислотные последовательности не полностью гомологичны. Однако указанные субтилизины обнаруживают сходный тип протеолитической активности. Этот класс сериновых протеиназ имеет общий аминокислотный участок, а именно каталитическую триаду аминокислот, которая отлична от таковой у родственного химотрипсину класса сериновых протеиназ. Субтилизины и родственные химотрипсину сериновые протеиназы имеют каталитическую триаду аминокислот, включающую аспартат, гистидин и серин. В родственных субтилизину протеиназах относительный порядок указанных аминокислот в направлении от аминотерминального к карбокситерминальному концу следующий: аспартат, гистидин, серин. В родственных химотрипсину протеиназах аминокислоты расположены в следующем порядке: гистидин, аспартат, серин. Таким образом, описываемый здесь субтилизин относится к сериновым протеиназам, имеющим каталитическую триаду родственных субтилизину протеиназ. Примеры относятся к субтилизинам, приведенным на фиг.3, но не ограничиваются указанными ферментами.

К "рекомбинантному субтилизину" относится субтилизин с модифицированной последовательностью ДНК (вариант ДНК-последовательности или мутантная ДНК-последовательность), которая включает замещение, делецию или инсерцию одной или более аминокислот по сравнению с аминокислотной последовательностью природного субтилизина. Подходящие способы получения таких модификаций раскрыты в настоящем описании и в патентах США N 4,760,025 (RE 34,606), N 5,204,015 и 5,185,258.

"Карбонилгидролазы не человеческого происхождения" и кодирующие их последовательности ДНК могут быть получены из многих прокариотических и эукариотических организмов. Примерами соответствующих прокариотических организмов служат грамотрицательные бактерии, такие как E.coli или Pseudomonas, и грамположительные бактерии, такие как Micrococcus или Bacillus. Примерами эукариотических организмов, из которых могут быть получены карбонилгидролазы и кодирующие их гены, являются дрожжи, например Saccharomyces cerevisiae, грибы, например Aspergillus sp. и млекопитающие, например бык (получение гена, кодирующего карбонилгидролазу химозин). Так же, как и в случае субтилизинов, определенные карбонилгидролазы могут быть получены из различных родственных видов, причем аминокислотные последовательности таких карбонилгидролаз не полностью гомологичны, но ферменты обнаруживают одинаковый или сходный вид биологической активности. Таким образом, описываемые здесь карбонилгидролазы не человеческого происхождения имеют функциональную активность карбонилгидролаз, которая непосредственно или опосредованным

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

образом ассоциируется с активностью карбонилгидролаз из прокариотических и эукариотических источников.

"Вариант карбонилгидролазы" имеет аминокислотную последовательность, которая получена на основе аминокислотной последовательности "предшественника карбонилгидролазы". Предшественник карбонилгидролаз (например субтилизин) включает как природные карбонилгидролазы (субтилизин), так и рекомбинантные карбонилгидролазы (субтилизин). Аминокислотная последовательность варианта карбонилгидролазы "происходит" из аминокислотной последовательности предшественника гидролазы в результате замещения, делеции или инсерции одной или более аминокислот в последовательности предшественника. Такие модификации затрагивают последовательность ДНК предшественника, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность (субтилизина) в противовес манипуляциям карбонилгидролазным предшественником (субтилизином) per se (т.е. на уровне белка). Подходящие способы модификаций последовательности ДНК предшественника описаны здесь, а также известны специалистам в данной области исследований (см., например, EP 0328299, WO 89/06279 и патенты и заявки США, указанные ранее).

Мутациям подвергаются специфические аминокислотные остатки субтилизина Bacillus amyloliquefaciens, соответствующие положению +76 в сочетании с одним или более аминокислотными остатками в следующих положениях: +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 и/или +274. Предпочтительными комбинациями модифицированных остатков являются следующие: 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 и/или 76/103/104/222; наиболее предпочтительными являются сочетания 76/99; 76/104; 76/99/104; 76/103/104; 76/104/107; 76/101/103/104; 76/99/101/103/104 и 76/101/ 104. Указанные аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с их положением в молекуле зрелого субтилизина Bacillus amyloliquefaciens, чья аминокислотная последовательность приведена на фиг.1. Однако данное изобретение не ограничивается получением только этого мутантного субтилизина, но относится и к предшественнику карбонилгидролазы, содержащему мутантные аминокислотные остатки в положениях, которые эквивалентны положению специфических аминокислотных остатков в субтилизине Bacillus amyloliquefaciens. В предпочтительном варианте осуществления изобретения предшественником субтилизина является субтилизин Bacillus lentus, и замещения, делеции или инсерции осуществляются по отношению к аминокислотным остаткам B.lentus, эквивалентным указанным выше.

Аминокислотный остаток (аминокислота) в предшественнике карбонилгидролазы считается эквивалентным остатку субтилизина Bacillus amyloliquefaciens, если он гомологичен (т.е. соответствует по положению в первичной или третичной структуре) или аналогичен специфическому остатку или его части в субтилизине Bacillus amyloliquefaciens (т.е. имеет ту же самую или сходную функциональную способность к химическому комбинированию, реагированию или взаимодействию).

Для установления гомологии по первичной структуре аминокислотную последовательность предшественника карбонилгидролазы непосредственным образом сравнивают с первичной аминокислотной последовательностью субтилизина Bacillus amyloliquefaciens и в особенности с набором аминокислотных остатков, про которые известно, что они инвариантны в установленных последовательностях субтилизинов. На фиг.2 показаны консервативные аминокислотные остатки в субтилизинах B.amyloliquefaciens и B.lentus. После установления порядка расположения консервативных последовательностей, что необходимо для поддержания определенного характера инсерций и делеций (т.е. для исключения элиминации консервативных аминокислотных остатков в результате случайной делеций или инсерций), выявляют остатки, эквивалентные специфическим аминокислотам в первичной последовательности субтилизина Bacillus amyloliquefaciens. При сопоставлении аминокислотных остатков предпочтительным считается совпадение консервативных остатков на 100%. Однако совпадение более чем на 75% и даже на 50% является адекватным для идентификации эквивалентных аминокислотных остатков. При этом следует поддерживать консервативность каталитической триады Asp32/His64/Ser221.

В качестве примера на фиг.3 приведен порядок расположения аминокислотных остатков в молекуле субтилизинов Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis (carlsbergensis) и Bacillus lentus для выявления гомологии между аминокислотными последовательностями. Сравнение их показывает, что в каждой последовательности имеются многочисленные консервативные аминокислотные остатки. Эти остатки (в сравнении BPN' с субтилизином B.lentus) приведены на фиг.2.

Указанные консервативные аминокислотные остатки, таким образом, могут служить для выявления эквивалентных остатков субтилизина Bacillus amyloliquefaciens в других карбонилгидролазах, таких как субтилизин Bacillus lentus (заявка PCT N WO/06279, опубликованная 13.07.89), предпочтительном предшественнике описываемого здесь субтилизина, или же в субтилизине, называемом PB 92 (EP 0328299), который

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

обладает высокой гомологией с предпочтительным субтилизином Bacillus lentus. Аминокислотные последовательности некоторых из указанных субтилизинов приведены на фиг.3А и 3В в сравнении с последовательностью субтилизина Bacillus amyloliquefaciens для выявления максимальной гомологии консервативных аминокислотных остатков. Как можно видеть из рисунков, имеется определенное число делеций в последовательности субтилизина Bacillus lentus в сравнении с субтилизином Bacillus amyloliquefaciens. Так, например эквивалентная аминокислота для Val165 в субтилизине Bacillus aplyloliquefaciens в субтилизинах B.lentus и B.licheniformis является изолейцином.

Таким образом, например, в положении +76 субтилизинов B.amyloliquefaciens и B.lentus находится аминокислота аспарагин (N). Однако в предпочтительном варианте осуществления изобретения аминокислоту, эквивалентную находящейся в положении +76 субтилизина Bacillus amyloliquefaciens, замещают на аспартат (D). Сравнение некоторых аминокислотных остатков, подлежащих замещению, в противоположность наиболее предпочтительным заменам для каждого положения приведены в табл. II в иллюстративных целях (см.в конце описания).

Эквивалентные аминокислотные остатки могут быть также выявлены путем установления гомологии на уровне третичной структуры предшественника карбонилгидролазы, определенной с помощью рентгеновской кристаллографии. Эквивалентными остатками считаются такие, для которых два или более атома в основной цепи специфического аминокислотного остатка в предшественнике карбонилгидролазы и субтилизина Bacillus amyloliquefaciens располагаются в пределах 0,13 нм и предпочтительно 0,1 нм после сопоставления. Сопоставление проводят вслед за определением ориентации и расположения наилучшей модели третичной структуры с целью достижения максимального перекрывания неводородных атомов белка карбонилгидролазы в сравнении с субтилизином Bacillus amyloliquefaciens. Наилучшая модель - это такая кристаллографическая модель, при которой обеспечивается наименьшее значение R-фактора для экспериментальных данных по дифракции при наивысшем возможном разрешении.

$$R_{\text{фактор}} = \frac{\sum_h \left| |F_o(h)| - |Fc(h)| \right|}{\sum_h |Fo(h)|}.$$

Эквивалентные аминокислотные остатки в предшественнике карбонилгидролазы считаются функционально аналогичными специфическому остатку в субтилизине Bacillus amyloliquefaciens, если они влияют на конформацию таким образом, что изменяют, модифицируют или поддерживают структуру белка, а также связывание с субстратом или каталитические свойства так же, как и специфический аминокислотный остаток в субтилизине Bacillus amyloliquefaciens. Более того, к ним относятся такие остатки в предшественнике карбонилгидролазы (для которого путем рентгеновской кристаллографии установлена третичная структура), которые занимают аналогичное положение в заданных пределах так, что, несмотря на то, что атомы основной цепи данного остатка могут и не соответствовать критерию эквивалентности в смысле занимания гомологичной позиции, по крайней мере два атома боковой цепи остатка расположены в пределах 0,13 нм в соответствии с атомами боковой цепи в субтилизине Bacillus amyloliquefaciens. Параметры трехмерной структуры субтилизина Bacillus amyloliquefaciens раскрыты в опубликованной заявке на Европейский патент N 0251446 (эквивалентной заявке на патент США SN 08/212,291 и приведенной здесь в качестве ссылки) и могут быть использованы, как описано выше, для выявления эквивалентных остатков на уровне третичной структуры.

Некоторые аминокислотные остатки, подлежащие замещению, инсерции или делеции, являются консервативными, в то время как другие - нет. В случае неконсервативных остатков замещения одной или более аминокислот ограничиваются теми, которые приводят к образованию варианта с аминокислотной последовательностью, не встречающейся в природе. В случае консервативных остатков такие замещения также не приводят к получению природных последовательностей. Варианты карбонилгидролазы, описанные в настоящей заявке, включают как зрелые формы вариантов карбонилгидролазы, так и их про- и пре-про-формы. Пре-про-формы являются предпочтительными, поскольку в этом случае облегчаются экспрессия, секреция и созревание вариантов карбонилгидролазы.

"Про-последовательность" означает последовательность аминокислот, связанную с N-терминальным участком зрелой формы карбонилгидролазы, удаление которой приводит к образованию свободной зрелой формы карбонилгидролазы. Многие протеолитические ферменты обнаруживаются в природе в виде проферментных продуктов трансляции и в отсутствие посттрансляционного процессинга, экспрессируются именно в такой форме. Предпочтительная последовательность для получения вариантов карбонилгидролазы, в особенности вариантов субтилизина, представляет собой генетическую про-последовательность субтилизина Bacillus amyloliquefaciens, хотя могут быть использованы и другие пропоследовательности субтилизина. В примерах 1 и 2 используется гипотетическая про-последовательность субтилизина Bacillus lentus (ATCC 21536).

"Сигнальная последовательность" или "пре-последовательность" означает какую-либо последовательность аминокислот, связанную с N-терминальным участком карбонилгидролазы или с N-терминальным участком прогидролазы, которая принимает участие в секреции зрелой формы или проформы гидролазы. Такое определение сигнальной последовательности является функциональным и относится ко всем аминокислотным последовательностям, кодируемым N-терминальным участком гена субтилизина или других секретируемых карбонилгидролаз, которые обеспечивают эффективную секрецию субтилизина или

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

других карбонилгидролаз в нативных условиях. В настоящем изобретении такие последовательности используются для обеспечения секреции вариантов карбонилгидролазы. Предпочтительная сигнальная последовательность, используемая в примере 1, содержит первые семь аминокислотных остатков сигнальной последовательности субтилизина Bacillus subtilis, слитых с оставшейся частью сигнальной последовательности субтилизина Bacillus lentus (ATCC 21 536).

"Пре-про-форма" карбонилгидролазы представляет собой зрелую гидролазу, имеющую про-последовательность, функционально соединенную с аминотерминальным участком гидролазы, и "пре" или "сигнальную" последовательность, функционально связанную с аминотерминальным участком про-последовательности. "Вектор экспрессии" представляет собой ДНК-конструкт, содержащий последовательность ДНК, функционально связанную с соответствующей контролирующей последовательностью, способной обеспечивать экспрессию указанной ДНК в соответствующем хозяине. Такие контролирующие последовательности включают промотор, обеспечивающий эффективную транскрипцию, факультативную операторную последовательность для контроля транскрипции, последовательность, кодирующую сайт связывания с рибосомой в молекуле мРНК, и последовательности, контролирующие терминацию транскрипции и трансляции. Вектор может быть плазмидой, фаговой частицей или просто потенциальной геномной вставкой. Введенный путем трансформации в подходящую хозяйскую клетку, вектор может реплицироваться и функционировать независимо от генома хозяина, а может, в некоторых случаях, интегрировать в его геном. В настоящем описании термины "плазмида" и "вектор" иногда используются взаимозаменяемо, поскольку плазмида является наиболее часто используемой формой вектора. Однако для осуществления изобретения могут использоваться и другие формы векторов экспрессии, выполняющие эквивалентные функции и известные специалистам в данной области исследований.

"Клетки-хозяева", используемые в настоящем изобретении, являются прокариотическими или эукариотическими клетками, которые с помощью методов, описанных в патенте США N 4,760,025 (RE 34,606) изменяют таким образом, что они теряют способность к секреции энзиматически активных эндопептидаз.

Предпочтительными клетками-хозяевами для экспрессии субтилизина являются клетки штамма бактерий Bacillus BG2036, дефектного по энзиматически активной нейтральной протеиназе и алкалинпротеиназе (субтилизину). Получение штамма BG2036 подробно описано в патенте США N 5,264,366. Другими клетками-хозяевами для экспрессии субтилизина являются клетки штамма Bacillus subtilis I168 (также описанного в патенте США N 4,760,025 (RE 34,606) и в патенте США N 5,264,366, которые приводятся здесь в качестве ссылки), а также клетки любого другого подходящего штамма Bacillus, например B. licheniformis, B. lentus и т.д.

Клетки-хозяева трансформируют или трансфицируют векторами, полученными с помощью технологии рекомбинантных ДНК. Такие трансформированные клетки-хозяева способны к репликации векторов, кодирующих варианты карбонилгидролазы, и к экспрессии необходимого варианта. При использовании векторов, кодирующих пре- или пре-проформу варианта карбонилгидролазы, такие варианты после экспрессии обычно секретируются из клетки-хозяина в культуральную среду.

Понятие "функционально-связанный" при описании взаимодействий между двумя участками ДНК просто означает, что они имеют функциональное отношение друг к другу. Например, пре-последовательность функционально связана с пептидом, если ее функции как сигнальной последовательности, принимающей участие в секреции зрелой формы белка, с наибольшей вероятностью включают и отщепление сигнальной последовательности. Промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если он контролирует транскрипцию последовательности: сайт связывания с рибосомой функционально связан с кодирующей последовательностью, если его расположение обеспечивает трансляцию.

Гены, кодирующие природный предшественник карбонилгидролазы, могут быть получены в соответствии с основными методами, известными специалистам в данной области исследований. Такие методы обычно включают синтезирование меченых проб, имеющих предполагаемые последовательности кодирующих участков гена соответствующей гидролазы, получение геномных библиотек из организмов, экспрессирующих гидролазу, и скрининг библиотек для выделения нужного гена путем гибридизации с пробами. Клоны, положительные по результатам гибридизации, затем картируют и секвенируют. Ген B. lentus, используемый в примерах, был клонирован, как описано в примере 1 патента США N 5,185,258, который приводится здесь в качестве ссылки. Ген BPN', используемый в примере 5, был клонирован, как описано в примере 1 заявки США N 34,606, который также приводится здесь в качестве ссылки.

Клонированный ген карбонилгидролазы затем используют для трансформации клеток-хозяев с целью экспрессии гидролазы. Ген гидролазы встраивают в высококопийную плазмиду. Эта плазмида реплицируется в клетках-хозяевах и содержит хорошо известные элементы, необходимые для репликации плазмиды: промотор, функционально-связанный с нужным геном (который может быть собственным гомологичным промотором данного гена, если он распознается, т. е. транскрибируется клеткой-хозяином), терминатор транскрипции и участок полиаденилирования (необходимый для обеспечения стабильности мРНК, транскрибируемой с гена гидролазы в некоторых эукариотических клетках-хозяевах), который может быть экзогенным или же входить в комплекс с эндогенным терминаторным участком гена гидролазы, и, желательно, маркерный ген селекции, например ген устойчивости к антибиотику,

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

который определяет длительное культивирование "инфицированных" плазмидой клеток-хозяев в среде, содержащей антибиотик. Высококопийные плазмиды также содержат ориджин репликации, который обеспечивает их размножение в больших количествах в цитоплазме клетки-хозяина вне зависимости от хромосомы. Однако в объеме настоящего изобретения решается задача интегрирования многочисленных копий гена гидролазы в геном клетки-хозяина. Для этого используют прокариотические и эукариотические организмы, которые в особенности способны к гомологичной рекомбинации. Гены, используемые в излагаемых здесь примерах, являются природными генами B.lentus и B. amyloliquefaciens. Альтернативно могут быть использованы синтетические гены, кодирующие природные или мутантные формы предшественника карбонилгидролазы (субтилизина). Для этого определяют последовательность ДНК или аминокислотную последовательность предшественника гидролазы (субтилизина). Затем синтезируют многочисленные перекрывающиеся одноцепочечные фрагменты ДНК, с помощью которых в результате гибридизации и лигирования получают синтетическую ДНК, кодирующую предшественник гидролазы. Одна из синтетических генных конструкций приведена в примере 3 патента США N 5,204,015, который указывается здесь в качестве ссылки.

После клонирования природного или синтетического гена предшественника карбонилгидролазы для расширения возможностей использования данного гена (помимо обеспечения синтеза природного предшественника карбонилгидролазы) осуществляют многочисленные его модификации. Такие модификации обеспечивают получение рекомбинантных карбонилгидролаз, как описывается в патенте США N 4,760,025 (RE 34,606) и опубликованной заявке на Европейский патент N 0251446, и вариантов карбонилгидролаз, раскрытых в настоящем изобретении.

Излагаемый ниже метод кассетного мутагенеза может быть использован для конструирования и идентификации вариантов карбонилгидролазы, заявленных в настоящем изобретении, однако могут быть применены и другие методы, например сайт-направленный мутагенез. В первую очередь получают природный ген, кодирующий гидролазу, и секвенируют его полностью или частично. Затем последовательность сканируют, чтобы определить точку, в которой желательно осуществить мутацию (делецию, инсерцию или замещение) одной или более аминокислот. Последовательности, фланкирующие эту точку, исследуют на наличие сайтов рестрикции для замещения короткого генного сегмента олигонуклеотидами, при экспрессии которых образуются различные мутантные формы. Такие сайты рестрикции преимущественно являются уникальными сайтами гена гидролазы и обеспечивают замену генного сегмента. Однако может быть использован любой подходящий сайт рестрикции, не часто встречающийся в гене гидролазы, так что генные фрагменты, полученные в результате рестрикционного расщепления, способны собираться в нужную последовательность. Если сайты рестрикции не обнаруживаются на подходящем расстоянии от выбранной точки (10-15 нуклеотидов), такие сайты могут быть созданы путем замещения нуклеотидов в гене таким образом, что ни рамка считывания, ни кодирующие аминокислоты в конечной конструкции не изменяются. Мутации гена, изменяющие его структуру с целью получения желаемой последовательности, осуществляют при использовании праймера M13 в соответствии с хорошо известными методами. Задача выявления локализации подходящих фланкирующих участков и оценки необходимых изменений в двух соответствующих рестрикционных сайтах решается без особых проблем с учетом вырожденности генетического кода, рестрикционной карты гена и с помощью многочисленных рестрикционных ферментов. Следует иметь в виду, что при доступности подходящего фланкирующего сайта рестрикции, указанный выше подход используют всегда принимая во внимание и наличие фланкирующего участка, не содержащего сайта рестрикции.

После клонирования природной или синтетической ДНК, рестрикционные сайты, фланкирующие участки, в которых будут генерированы мутации, расщепляют соответствующими рестриктазами, и в ген встраивают многочисленные олигонуклеотидные кассеты, комплементарные концевым терминальным последовательностям. При этом процесс мутагенеза упрощается, поскольку могут быть синтезированы все олигонуклеотиды, имеющие те же самые рестрикционные сайты, и отпадает необходимость в создании рестрикционных сайтов с помощью синтетических линкеров.

Под протеолитической активностью при описании настоящего изобретения понимается скорость гидролиза пептидных связей в расчете на 1 мг активного фермента. Для определения протеолитической активности используются различные хорошо известные методы (см., например, K.M.Kalisz, "Микробные протеиназы", Достижения биохимической инженерии/биотехнологии, под ред.A.Fichter, 1988.) Помимо модифицированной протеолитической активности, варианты ферментов, заявленных в настоящем изобретении, могут иметь другие модифицированные свойства, такие как Км, Ккат, отношение Ккат/Км, и/или измененную субстратную специфичность и/или модифицированный профиль pH-активности. Указанные ферменты могут соответствовать определенному субстрату, который, например, может присутствовать в препарате пептидов. Они могут успешно использоваться для гидролиза пептидов и входить в состав стиральных средств.

Один аспект настоящего изобретения заключается в получении варианта карбонилгидролазы, имеющей измененную протеолитическую активность в сравнении с предшественником карбонилгидролазы, поскольку существенное увеличение такой активности обеспечивает большую эффективность взаимодействия фермента с субстратом. Кроме того, желательно

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

получение вариантов ферментов, имеющих измененную термостабильность и/или измененную субстратную специфичность по сравнению с предшественником. Предпочтительная карбонилгидролаза, в которой следует генерировать мутации, представляет собой субтилизин. Специфические аминокислоты, обеспечивающие получение заданного результата по отношению к карбонилгидролазам типа субтилизина, эквивалентны следующим приведенным в примерах аминокислотным остаткам или их любым комбинациям в субтилизине Bacillus amyloliquefaciens: +76, +99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +22, +260 и/или +274. В некоторых случаях желательно получить более низкую протеолитическую активность. Например, уменьшение протеолитической активности может быть полезно при использовании синтетической активности карбонилгидролаз (в частности, при синтезе пептидов). Протеолитическая активность способна "разрушить" продукт такого синтеза. В других случаях, наоборот, желательно увеличение протеолитической активности варианта фермента в сравнении с предшественником. Кроме того, иногда необходимо изменение стабильности варианта фермента, например устойчивости к щелочи или температурным воздействиям. Увеличение или уменьшение Ккат, Км или Ккат/Км зависит от субстрата, используемого для определения этих кинетических параметров.

Другой аспект настоящего изобретения заключается в установлении того факта, что аминокислотные остатки, эквивалентные остаткам в положении +76 в сочетании с другими модификациями в молекуле субтилизина, имеют важное значение для генерации сверхвысокой стабильности и/или протеолитической активности фермента. Так (см. примеры), в случае предпочтительного варианта осуществления изобретения, для получения повышенной стабильности и/или активности целевой мутантной формы фермента аспарагин (N), эквивалентный остатку в положении +76 в молекуле субтилизина Bacillus lentus, может быть замещен на аспартат (D) в сочетании с модификацией одной или более следующих аминокислот: +99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260 и/или +274.

Наиболее предпочтительные варианты осуществления изобретения изложены в примерах. При этом используются следующие специфические комбинации замещаемых аминокислотных остатков: N76D/S99D; N76D/V104I; N76D/ S99D/V104I; N76D/S103A/V104I; N76D/V104I/I107V; N76D/V104Y/I107V и N76D/S101R/S103A/V104I. Кроме того, в примерах описаны все комбинации мутантных форм, заявленные в формуле настоящего изобретения. Указанные замещения предпочтительно осуществляют в молекуле субтилизина Bacillus lentus (рекомбинантного или природного), однако могут быть произведены и в молекуле любого субтилизина бактерий рода Bacillus. Из результатов, полученных с указанным и другими вариантами субтилизина, с очевидностью следует, что для обеспечения протеолитической активности, стабильности и/или других существенных свойств ферментов, например отмывающей способности, важное значение имеют аминокислотные остатки в карбонилгидролазах (предпочтительно в субтилизине), эквивалентные следующим положениям аминокислот в субтилизине Bacillus amyloliquefaciens: +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 и/или +274.

Многие варианты карбонилгидролазы, заявленные в настоящем изобретении, в особенности субтилизин, могут быть полезны для приготовления различных детергентных композиций. Известные ранее соединения являются подходящими сурфактантами, используемыми в композициях, содержащих мутантные формы заявленной карбонилгидролазы. К ним относятся неионные, анионные, катионные или цвиттерионные детергенты, описанные в патенте США N 44,404,128 Barry J. Anderson и в патенте США N 4,261,868 Jiri Flora, et al. Подходящая детергентная композиция описана в примере 7 патента США N 5,204,015 и упоминается здесь в качестве ссылки. Указанные композиции могут быть использованы как моющие средства. Помимо обычных моющих композиций, варианты субтилизина, полученные согласно настоящему изобретению, могут быть применены для любых целей, так же как и нативные субтилизины и субтилизины дикого типа. Так, данные варианты могут быть использованы, например, для получения твердого или жидкого мыла, средств для мытья посуды, увлажнителей, растворов для протирания контактных линз, стиральных порошков, а также в качестве ферментов пептидного гидролиза, ферментов слияния/расщепления при синтезе пептидов и т. д. Заявленные варианты карбонилгидролаз могут усиливать детергентные свойства композиций по сравнению с предшественниками фермента. Как описано здесь, такое усиление определяется повышенной способностью некоторых ферментов к взаимодействию с такими загрязнителями, как трава или кровь, что подтверждается обычными измерениями, которые проводят после цикла "отмывания".

Полученные согласно настоящему изобретению субтилизины могут входить в состав известных жидких или порошкообразных детергентов, имеющих pH в интервале 6,5 и 12,0, в весовом количестве 0,01%- 5% (предпочтительно 0,1%-0,5%). Указанные моющие детергентные композиции могут включать и другие ферменты, например известные протеиназы, амилазы, целлюлазы, липазы или эндогликозидазы, так же как и основные компоненты и стабилизаторы. Добавление заявленных субтилизинов к обычным моющим композициям не создает каких-либо ограничений. Иными словами, температура и pH, подходящие для детергента, также подходят и для приготавливаемой композиции, при том что значение pH находится в пределах указанного

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

выше интервала, а температура - ниже описанной температуры денатурации субтилизина. Кроме того, заявленные субтилизины могут быть применены и в моющих композициях, не содержащих детергентов, как сами по себе, так и в сочетании с основными компонентами и стабилизаторами.

Приведенные ниже примеры не следует считать ограничивающими объем изобретения, изложенный в формуле.

Пример 1. Получение плазмиды для экспрессии гена GG36 в Bacillus subtilis.

Клонирование и конструирование гена из B.subtilis для экспрессии субтилизина осуществляют так же, как описано в патенте США N 5,185,258. Плазмиду GGA274 (см. фиг. 5) модифицируют как показано на этом же рисунке. PstI-сайт, введенный в процессе конструирования в плазмиду GGA274, удаляют путем олигонуклеотид-направленного мутагенеза (см. пример 2) с помощью олигонуклеотида, имеющего следующую последовательность:

5'-GAAGCTGCA

5′-GAAGCTGCAACTCGTTAAA-3′

CTCGTTAAA-3' (SEQ ID N 1).

Подчеркнутый нуклеотид "A" элиминирует последовательность, распознаваемую ферментом рестрикции PstI, и изменяет соответствующий аминокислотный остаток в положении 274 с аланина на треонин. Треонин в положении 274 представляет собой остаток дикого типа, первоначально обнаруженный в клонированной генной последовательности B.lentus. ДНК-фрагмент, кодирующий субтилизин, вырезают из плазмиды GGA274 или ее производных (например, GGT274, показанной на фиг. 5) с помощью рестриктаз EcoRI и BamHI. Затем ДНК фрагмент субклонируют в векторе на основе бактериофага M13 для осуществления мутагенеза. После мутагенеза и клонирования мутантный ген субтилизина вырезают при помощи рестриктаз EcoRI и Hind III и переносят его в плазмиду экспрессии, подобную GGA274, для обеспечения продуцирования и выделения мутантных белков субтилизина.

Пример 2. Олигонуклеотид-направленный мутагенез.

Олигонуклеотид-направленный мутагенез осуществляют, как описано в работе Joller, M. et al., (1983), Methods Enzymol. 100: 468-500. Например, для изменения аминокислотного остатка в положении 76 с аспарагина (N) на аспартат (D) (N76D) используют синтетический олигонуклеотид **5′GCTGCTCTAGACAATTCG-3′** (SEQ ID N 2).

Подчеркнутые нуклеотиды "G" и "C" обусловливают изменения по сравнению с последовательностью дикого типа. Нуклеотиды **CA** определяют наличие лейцина в положении +75 и изменения аминокислотной последовательности для введения сайта рестрикции, распознаваемого рестриктазой XbaI (TCTAGA), в то время как изменение **GAC** обусловливает замещение аспарагина в положении +76 на аспартат.

Для осуществления мутагенеза в положениях 99, 101, 103 и 104 используют различные олигонуклеотиды в зависимости от сочетаний желаемых мутаций. Например, для одновременного введения изменений S99D, S101R, S103A и VI 041 в одну молекулу субтилизина использовали следующий олигонуклеотид:

5′-GTATTAGGGGCGGACGGTCGAGGCGCCATCAGCTGGATT-3′

(SEQ ID NO.3)

Сходным образом, для генерации изменений I107V и N123S использовались соответственно следующие олигонуклеотиды:

5′-TCAGGTTCGGTCTCGAGCGTTGCCCAAGGATTG-3′

(SEQ ID NO.4) И
5′-CAGTTGCTAGCTTGAGTTTAG-3′ (SEQ ID NO.5)

Опять же подчеркнутые нуклеотиды определяют изменения аминокислотных остатков или введение необходимых сайтов распознавания ферментами рестрикции в сравнении с последовательностями дикого типа.

Пример 3. Протеолитическая активность вариантов субтилизина.

В соответствии с методами, описанными в примере 2, получают варианты субтилизина, которые перечислены в таблице III. Протеолитическая активность с каждого варианта субтилизина показана в таблице III. Кинетические параметры Ккат, Km и Ккат/Km определяли на основании гидролиза синтетического пептидного субстрата сукцинил-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-нитроанилида с помощью метода, описанного в работе P.Bonneau, et al., (1991), J.Am.Chem.Soc., Vol. 113, N 3, p.1030. Небольшую аликвоту исходного раствора варианта субтилизина добавляли в 1-см кювету, содержащую субстрат, растворенный в 0,1 M трис-HCl-буфере, pH 8,6, и помещали кювету в термостат при 425 °C. Течение реакции регистрировали спектрофотометрически, измеряя поглощение продукта реакции p-нитроанилина при 410 нм. Кинетические параметры вычисляли, используя нелинейный алгоритм регрессии, соответствующий скорости реакции и концентрации продукта для каждой отдельной реакции в соответствии с уравнением Михаэлиса-Ментен.

Результаты, приведенные в табл. III, свидетельствуют о том, что все тестированные варианты субтилизина обладают протеолитической активностью. Более того, детальный анализ приведенных данных выявляет значительное изменение протеолитической активности вариантов субтилизина Bacillus lentus, имеющих замещения аминокислотных остатков, эквивалентных остаткам, находящимся в положениях 76,99, 101, 103, 104, 107 и 123 субтилизина Bacillus amyloliquefaciens.

Пример 4. Термоустойчивость вариантов субтилизина.

Сравнение термостабильности субтилизина Bacillus lentus и вариантов, полученных согласно настоящему изобретению, как описано в примере 2, приведено в табл. IV. Аликвоты очищенных ферментов (15 мкг/мл в 0,1 M глицине и 0,01%-ном Твине-80, pH 10,0, с добавлением или без 50 мМ $CaCl_2$) помещают в небольшие пробирки и инкубируют при 10°C в течение 5 мин, затем при 10°C-60°C в течение 1 мин и при 60°C в течение 20 мин.

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

Далее пробирки на 10 мин помещают в лед. Аликвоты из пробирок исследуют на энзиматическую активность, перенося их из пробирок в 1-см кюветы, содержащие 1,2 мМ синтетического пептидного субстрата сукцинил-L-Ala-L-Ala-Pro-L-Phe-p-нитроанилид а, растворенного в 0,1 М Трис-HCl буфере, pH 8,6. Кюветы помещают в термостат при 25°C. Первоначальную линейную скорость реакции как функцию времени оценивают спектрофотометрически, измеряя поглощение продукта реакции p-нитроанилина при 410 нм. Данные выражают в процентах активности в сравнении с активностью, предшествующей нагреванию фермента. Результаты исследований, приведенные в табл. IV, показывают, что значительная часть вариантов субтилизина (24 из 26) проявляет термоустойчивость, сравнимую с термоустойчивостью субтилизина Bacillus lentus при осуществлении теста с добавлением 50 мМ $CaCl_2$. Однако в отсутствие $CaCl_2$ существенная доля вариантов субтилизина (19 из 26) оказывается значительно более стабильной, чем субтилизин Bacillus lentus.

Более того, варианты N76D/S99D, N76D/V1041, N76D/S99D/V1041, N76D/S103A/V1041, N76D/V104I/I107V, N76D/V104Y/I107V и N76D/S101R/S103A/V104I обладают гораздо большей устойчивостью, чем вариант с одним замещением в положении +76 (N76D), при осуществлении теста с добавлением 50 мМ $CaCl_2$.

Пример 5. Олигонуклеотид-направленный мутагенез с одноцепочечной ДНК-матрицей, полученной из фагемиды.

A. Получение вариантов B.lentus

Мутагенез осуществляют так же, как описано выше в примере 2. Одноцепочечную ДНК-матрицу получают при использовании фагемиды. С этой целью для конструирования фагемидного вектора в первую очередь конструируют вектор pBCDAICAT. Схема конструирования вектора приведена на фиг.8. Сначала ClaI-ClaI-фрагмент, кодирующий ген CAT, из плазмиды pC194 (Horinouchi.S. and Weisblum. B. , J.Bacteriol., 150:8-15, 1982) клонируют в AccI-сайт полилинкерного участка плазмиды pUC19 (New England Biolabs, Beverly, MA) с получением плазмиды pUCCHL, а EcoRI-DraI-фрагмент (0,6 кб) с 5'-конца кодирующей ДНК GG36DAI клонируют в EcoRI и EcoRV сайты плазмиды pBSKS (Stratagene Inc., San Diego, CA) с получением плазмиды pBC2SK5. Один EcoRI-сайт плазмиды pBC2SK5 вырезают с помощью рестриктазы EcoRI, достраивают при использовании ДНК-полимеразы T4 и заново лигируют в плазмиду pBC2SK-5R, у которой отсутствует свой EcoRI-сайт. EcoRI-DraI-фрагмент, клонированный в pBCSK-5R, вырезают как PstI-HundIII-фрагмент и клонируют в PstI-Hind III-сайт pUCCHL (часть полилинкера pUC19) с получением плазмиды pUCCHL5R. Кодирующую последовательность гена GG36DAI вырезают как EcoRI-BamHI-фрагмент и клонируют в EcoRI-BamHI-сайты pUCCHL5R с получением pUCCAT. Большой EcoRI-HindIII-фрагмент pUCCAT затем клонируют в EcoRI-HindIII-сайты BS2KS+ с образованием плазмиды pBCDAICAT.

Для получения одноцепочечной ДНК бактерии E.coli, содержащие pBCDAICAT, инфицируют фагом R408 (Stratagene, San Diego, CA), следуя методике, описанной Russel, M. , Kidd, S. and Kelley, M.R., Gene, 45:333-338, 1986. После получения одноцепочечной ДНК-матрицы, проводят мутагенез с помощью стандартных методов, описанных выше в примере 2. Получение различных мутантов подробно описано ниже в иллюсстративных целях.

Для получения B.lentus (GG36) N76D/S103A/V104I/L217H EcoRI-BamHi-фрагмент ДНК, кодирующий GG36 N76D/S103A/V1041 используют для конструирования pUCCAT (см. фиг. 8) с последующим образованием плазмиды pBCDAICAT. После того, как получают одноцепочечную ДНК-матрицу, как описано выше, используют следующий праймер для мутагенеза

**** ** x ClaI

5'TATGCCAGCCACAACGGTACTTCGATGGCT-3' (SEQ ID NO.13)

с целью получения L217H. Как и ранее, подчеркнутые нуклеотиды обозначают изменяемые участки, x ClaI указывает на то, что ClaI-сайт после осуществления мутагенеза элиминируют. Мутагенез проводят согласно методике, описанной в примере 2. После мутагенеза плазмидную ДНК в первую очередь скринируют на отсутствие сайта ClaI и клоны, утратившие его, подвергают анализу, чтобы убедиться в замене L на H в положении 217 аминокислотной последовательности.

B. Получение BPN' вариантов и осуществление экспрессии в B.subtilis.

B. amyloliquefaciens (BPN') N76D/Q103A/V104I/Y217L получают практически так же, как описано выше, за исключением двух этапов. В первую очередь N76D вводят в BPN' Y217L с получением BNP' 76D/Y217L, а затем осуществляют вторую стадию мутагенеза для превращения BPN' N76D/Y217L в BPN' N76D/Q103A/Y104I/Y217L. Для получения одноцепочечной ДНК-матрицы для первого этапа мутагенеза EcoRI-BamHI-фрагмент, кодирующий субтилизин BPN' Y217L (происходящий из плазмиды Y217L, описанной Wells, J., et al., PNAS, 84, 5167, 1087) используют для получения плазмиды pUCCATFNA (см. фиг.9). Плазмиду pUCCATFNA, содержащую BPN' Y217L, используют для конструирования плазмиды pBCFNACAT (фиг.9). Одноцепочечную ДНК получают, как описано выше. Для получения BPN' N76D/Y217L с целью внесения изменения N76D используют олигонуклеотидный праймер последовательности

* *** ** x XbaI

5'CACAGTTGCGGCTCTAGATAACTCAATCGGTG-3'

(SEQ ID NO.14).

Одноцепочечную ДНК затем получают из плазмиды pBCFNACAT, содержащей BPN' N76D/Y217L (плазмида pBCFNACAT после N76D-мутагенеза) и подвергают мутагенезу при использовании последовательности

* *** ** x PvuII

5'-GCTGACGGTTCCGGCGCTATTAGTTGGATCATT-3'

(SEQ ID NO.15)

с образованием BPN'

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

N76D/Q103A/Y1041/Y217L. Все этапы клонирования, получения одноцепочечной ДНК, осуществления мутагенеза и скрининга мутантов проводят, как описано выше.

Экспрессия гена BPN' и его вариантов достигается при интегрировании плазмидной ДНК (pBCFNACAT, содержащей различные варианты BPN'-гена) непосредственно в дефектный по протеиназе штамм Bacillus subtilis, как описано в заявке США RE 34,606. Получают многочисленные варианты ферментов, как указано в примерах 2 и 5. Определяют их кинетические свойства и термоустойчивость. Кинетические свойства определяют с помощью методов, описанных в примере 3. Результаты исследований приведены в таблице V. Стабильность исследуют, как описано ниже. Результаты приведены в таблице VI.

Методика определения термоустойчивости.

Очищенный фермент переводят в 0,1 М глициновый буфер, pH 10,0, с 0,01%-ным Твином-80 путем нанесения фермента на колонку, содержащую Сефадекс G-25 и уравновешенную указанным буфером, с последующей элюцией фермента с колонки данным буфером. Переведенный в буфер фермент добавляют в пробирку, содержащую 0,1 М глицин, 0,01%-ный Твин-80, pH 10,0 до конечной концентрации фермента 15 мкг/мл. Затем пробирку помещают в термостат при 60 °C.

Во время инкубации при 60°C в различные временные интервалы отбирают аликвоты фермента и сразу же исследуют их на энзиматическую активность, добавляя указанные аликвоты в 1-см кювету, содержащую 1,2 мМ синтетического пептидного субстрата сукцинил-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-нитроанилида, растворенного в 0,1 М трис-HCl буфере, pH 8,6. Затем кюветы помещают в термостат при 25°C. Первоначальную линейную скорость реакции как функцию времени определяют спектрофотометрически, измеряя поглощение продукта реакции p-нитроанилина при 410 нм.

Период полужизни, определяемый как промежуток времени, в течение которого происходит 50%-ная инактивация фермента, вычисляют по первому участку графика зависимости скорости реакции от времени инкубации при 60°C.

Результаты, приведенные в табл. VI, выражены в процентном отношении периода полужизни полученных вариантов к периоду полужизни субтилизина Bacillus lentus (GG36) в идентичных условиях.

Пример 6. Тестирование отмывающей способности.

Отмывающую способность вариантов, описанных в предыдущих примерах, определяют по степени удаления загрязнителей (кровь/молоко/уголь) с образцов хлопковой ткани EMPA 116 (Testfabrics Inc., Middlsex, NJ 07030).

Шесть образцов ткани EMPA 116 с зубчатыми краями размером 3 x 4-1/2 дюйма помещают в специальные сосуды модели 7243S Terg-O-Tometer (United States TestingCo. , Inc. , Hoboken.NJ), содержащие 1000 мл воды с жесткостью 15 gpg (Ca^{++}: Mg^{++}::3:1::вес:вес), 7 г детергента и соответствующее количество фермента. Основным детергентом является детергент WFK1 (wfk-Testgewebe Gmbh, Adlerstrasse 42, Postfach 1307 62, D-47759 Krefeld, Germany):

Компонент - % конечного содержания
Цеолит A - 25
Сульфат натрия - 25
Сода Ash - 10
Линейный алкилбензенсульфонат - 8,8
Спиртовой этоксилат (7-8 EO) - 4,5
Натриевое мыло - 3
Силикат натрия (SiO_2:Na_2O::3,3:1) - 3

К этому базовому детергенту добавляют следующие соединения:

Компонент - % конечного содержания
Перборат моногидрат натрия - 13
Сополимер (Сокалан CP5) - 4
TAED (Микон ATC Зеленый) - 3
Фермент - 0,5
Краситель (Тинопал AMS-GX) - 0,2

Перборат моногидрат натрия получают от фирмы Degussa Corporation, Ridgefield-Park, NJ 07760. Сокалан CP5 получают от фирмы BASF Corporation, Parsipanny, NJ 07054. Микон ATC Зеленый (TAED, тетраацетилэтилендиамин) получают от фирмы Warwick International, Limited, Mostyn, Holywell, Clwyd CH8 9HE, England. Тинопал AMS-GX получают от фирмы Ciba-Geigy Corporation, Greensboro, NC 27419.

Шесть образцов ткани EMPA 116 обрабатывают детергентом в присутствии фермента в течение 30 мин при 60°C и затем последовательно отмывают два раза в течение 5 мин в 1000 мл воды. Ферменты добавляют до конечной концентрации 0,05-1 ppm для получения стандартных кривых и 0,25 ppm для обычных исследований. Образцы ткани высушивают и разглаживают под давлением и области пятен исследуют с помощью L-величины по $L^*a^*b^*$-шкале прибора Minolta Chroma Meter, Model CR-200 (Minolta Corporation, Ramsey, NJ 07446). Отмывающую способность ферментов выражают в процентах по отношению к протеиназе B. lentus (GG36) и вычисляют как отношение количества протеиназы B.lentus (GG36) к количеству протеиназы-варианта, которое необходимо для проявления такой же активности, умноженное на 100. Результаты исследований приведены в таблице VII.

Пример 7. Стабильность протеина в жидкой среде с детергентом.

Сравнение стабильности протеиназ в жидкой среде с детергентом проводят в отношении субтилизина Bacillus lentus и его варианта N76D/S103A/V104I, как описано ниже. Для эксперимента используют коммерческий расфасованный жидкий детергент для прачечных Tide Ultra, выпускаемый компанией Procter and Gamble, США. Чтобы инактивировать содержащиеся в детергенте протеиназы, его прогревают в течение 4,5 часов при 96 C. Затем к охлажденному до комнатной температуры детергенту добавляют концентрированные препараты (20 г/л) субтилизина B. lentus и его варианта N76D/S103A/V104I до конечной концентрации 0,3 г/л. Далее детергент, содержащий протеиназы, инкубируют на термостатированной водяной бане при 50°C. Из пробирок отбирают аликвоты исследуемого раствора через 0, 24, 46, 76 и 124 ч и исследуют на энзиматическую активность в 1-см кюветах, содержащих 1,2

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

мМ синтетического пептидного субстрата сук-Ala-Ala-Pro-phe-p-нитроанилида, растворенного в 0,1 М Трис-HCl буфере, pH 6,8, помещенных в термостат при 25°C. Первоначальную линейную скорость реакции как функцию времени определяют спектрофотометрически, измеряя поглощение продукта реакции p-нитроанилина при 410 нм. Как показано на фиг.10, вариант субтилизина N76D/S103A/V104I проявляет гораздо большую стабильность по сравнению с нативным ферментом B.lentus. Период полураспада в детергенте Tide Ultra, определенный в специфических условиях теста, составляет 45 ч для субтилизина B.lentus и 125 ч для его варианта N76D/S103A/V104I.

При описании изобретения использовался одно- или трехбуквенный аминокислотный код. Расшифровка кода приведена в книге Dale.J.W. (1989), Molecular Genetics of Bacteria, John Wiley & Sons, Ltd., Приложение B.

Несмотря на то, что выше были изложены предпочтительные варианты осуществления изобретения, для специалиста в данной области исследований очевидно, что после оценки изобретения в целом, могут быть осуществлены его различные изменения и эквивалентные модификации без выхода за рамки объема притязаний, изложенного в формуле.

Формула изобретения:

1. Модифицированный субтилизин, в котором заменены 76 аминокислотный остаток и и по меньшей мере один из аминокислотных остатков в положениях: +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 и/или +274 в субтилизине Bacillus amyloliguefaciens.

2. Модифицированный субтилизин по п.1, отличающийся тем, что замещения произведены в положениях, эквивалентных положениям 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, 27/76/104/109/123/274, 27/76/104/123/218/274, 27/76/104/123, 27/76/104/107/123, 27/76/104/109/123, 27, 76, 104, 109, 123, 218/274, 27/76/104/123/197, 27/76/104/123/204, 27/76/104/123/206, 27/76/104/123/216, 27/76/104/123/218, 27/76/104/123/260, 27/76/104/123/195/197, 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, 27/76/104/123/195/197/218, 76/103/104/217, 76/103/104/156, 76/103/104/166, 76/103/104/105, 76/101/103/104, 76/103/104/128, 76/103/104/210, 76/103/104/107, 76/103/104/204, 76/217, 76/103/104/156/166 и 76/103/104/128.

3. Модифицированный субтилизин по п.2, отличающийся тем, что сочетания замещений произведены в положениях, эквивалентных положениям 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 и/или 76/103/104/222.

4. Модифицированный субтилизин по п. 3, отличающийся тем, что они выбраны из группы, включающей замещения в положениях, эквивалентных положениям 76/99, 76/104, 76/99/104, 76/103/104, 76/104/107, 76/101/103/104, 76/99/101/103/104 и 76/101/104.

5. Модифицированный субтилизин по п.3, отличающийся тем, что представляет собой 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/I1007V; N76D/V104I/N123S; N76D/I107V/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A; N76D/S99D/S101R/V104I; N76D/S99D/S103A/V104I; N76D/S101R/S103A/V104I; N76D/S103A/V104I/N123S; N76D/V104I/I107V/N123S; N76D/S99D/S101R/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/V1041/L135I; N76D/S103A/V104I/L126F; N76D/S103A/V104T/L107T; N76D/S103A/V104I/P210I; N76D/S103A/V104I/L126F/S265N и N76D/S103A/V104I/M222A.

6. Модифицированный субтилизин по п.5, отличающийся тем, что он представляет собой N76D/S99D, N76D/V104I, N76D/S99D/V104I, N76D/S103A/V104I, N76D/V104I/I107V, N76D/V104Y/I107V, N76D/S101R/S103A/V104I, N76D/S99D/S101R/S103A/V104I и N76D/S101R/V104I.

7. Модифицированный субтилизин по п.1, отличающийся тем, что он получен из субтилизина Bacillus.

8. Модифицированный субтилизин по п.7, отличающийся тем, что он получен из субтилизина Bacillus lentus.

9. ДНК, кодирующая модифицированный субтилизин, по п. 1.

10. Вектор экспрессии, кодирующий ДНК, по п.9.

11. Штамм культуры клетки-хозяина, трансформированный вектором экспрессии, по п.10.

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

Таблица I

Остаток аминокислоты	Аминокислота, предпочтительная для замены/вставки
+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

Таблица II

	+76	+99	+101	+103	+104	+107	+123
B. amyloliquefaciens (дикий тип)	N	D	S	Q	Y	I	N
B. lentus (дикий тип)	N	S	S	S	V	I	N
Наиболее предпочтительные замещения	D	D	R	A	I/Y	V	S

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

Таблица III.

Кинетические параметры Ккат, Km и Ккат/Km, определенные для субтилизина Bacillus lentus и вариантов

Фермент	Ккат(s^{-1})	Km(M)	Ккат/Km (s^{-1} M^{-1})
B.lentus subtilisin	170	0.00078	$2.18x10^5$
N76D	219	0.0008	$2.74x10^5$
N76D/S99D	88	0.00061	$1.44x10^5$
N76D/S103A	400	0.0014	$2.86x10^5$
N76D/V104I	459	0.0011	$4.17x10^5$
N76D/I107V	219	0.0011	$1.99x10^5$
N76D/N123S	115	0.0018	$6.40x10^4$
N76D/S99D/S101R	146	0.00038	$3.84x10^5$
N76D/S99D/S103A	157	0.0012	$1.31x10^5$
N76D/S99D/V104I	247	0.00097	$2.55x10^5$
N76D/S101R/S103A	405	0.00069	$5.90x10^5$
N76D/S101R/V104I	540	0.00049	$1.10x10^6$
N76D/S103A/V104I	832	0.0016	$5.20x10^5$
N76D/V104I/I107V	497	0.00045	$1.10x10^6$
N76D/V104Y/I107V	330	0.00017	$1.90x10^6$
N76D/V104I/N123S	251	0.0026	$9.65x10^4$
N76D/I107V/N123S	147	0.0035	$4.20x10^4$
N476D/S99D/S101R/S103A	242	0.00074	$3.27x10^5$
N76D/S99D/S101R/V104I	403	0.00072	$5.60x10^5$
N76D/S99D/S103A/V104I	420	0.0016	$2.62x10^5$
N76D/S101R/S103A/V104I	731	0.00065	$1.12x10^6$
N76D/S103A/V104I/N123S	321	0.0026	$1.23x10^5$
N76D/V104I/I107V/N123S	231	0.003	$7.70x10^4$
N76D/S99D/S101R/ S103A/V104I	624	0.00098	$6.37x10^5$
N76D/S99D/S103A/V104I/N123S	194	0.0043	$4.51x10^4$
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S	311	0.0023	$1.35x10^5$

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

Таблица 4.

Термоусточивость субтилизина Bacillus lentus и вариантов при pH 10,0; 60°C; +/- 50 mM CaCl2

Фермент	Оставшийся % исходной активности	
	-CaCl2	+CaCl2
B.lentus субтилизин	2	96
N76D	34	97
N76D/S99S	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/V104Y/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

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

Таблица V

Фермент	Ккат (s^{-1})	КМ (mM)	Ккат/КМ ($s^{-1}M^{-1}$)
B. lentus СУБТИЛИЗИН	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/S265N	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 СУБТИЛИЗИН (BPN')	50	0.14	3.60E+05
BPN'-N76D/Y217L*	380	0.46	8.30E+05

* ЭТИ МУТАНТЫ ПОЛУЧЕНЫ, КАК ОПИСАНО В ПРИМЕРЕ 5, ВСЕ ОСТАЛЬНЫЕ - КАК В ПРИМЕРЕ 2.

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

Таблица VI

Фермент	Термостабильность /% полужизни к нативному ферменту/
B. lentus субтилизин	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

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

Таблица VI (продолжение)

N76D/S103A/V104I/L126V	320
N76D/S103A/V104I/S128G*	640
N76D/S103A/V104I/S128L*	760
N76D/S103A/V104I/L135A	230
N76D/S103A/V104I/L135F	200
N76D/S103A/V104I/L135I	510
N76D/S103A/V104I/L135V	500
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*	60
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	60
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
B. amyloliquefaciens субтилизин (BPN')	100
BPN'-N76D/Y217L*	420

* эти мутанты получены как в Примере 5, все остальные как в Примере 2

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

Таблица VII.

Фермент	Отмывающая способность
B.lentus subtilisin	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/ 0S99S/S101R/S103A	220
N76D/S99D/S101R/V104I	140
N76D/S101G/S103A/V104I	170
N76D/S103R/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

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

(1) ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

(i) ЗАЯВИТЕЛЬ: Graycar, Thomas P.
Bott, Richard R.
Wilson, Lori J.

(ii) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ: Варианты субтилизина

(iii) ЧИСЛО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: 15

(iv) АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ:
(A) АДРЕСАТ: Genencor International, Inc.
(B) УЛИЦА : 180 Kimball Way
(C) ГОРОД: So. San Francisco
(D) ШТАТ: CA
(E) СТРАНА: USA
(F) ПОЧТОВЫЙ КОД: 94080

(v) ФОРМА ДЛЯ РАБОТЫ С КОМПЬЮТЕРОМ:

(A) НОСИТЕЛЬ ИНФОРМАЦИИ: Дискета
(B) КОМПЬЮТЕР: IBM-совместимый
(C) ОПЕРАЦИОННАЯ СИСТЕМА: PC-DOS/MS-DOS
(D) ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ: PatentIn Release #1.0
Version # 1.25

(vi) ТЕКУЩИЕ ДАННЫЕ ПО ЗАЯВКЕ:

(A) НОМЕР ЗАЯВКИ:
(B) ДАТА ПОДАЧИ: 13 октября 1994
(C) КЛАССИФИКАЦИЯ:

(viii) ИНФОРМАЦИЯ О ПАТЕНТНОМ ПОВЕРЕННОМ:

(A) ИМЯ: Horn, Margaret A.
(B) РЕГИСТРАЦИОННЫЙ НОМЕР: 33,401
(C) РЕФЕРЕНС/ДОКЕТ НОМЕР: GC235-2

(ix) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ТЕЛЕКОММУНИКАЦИИ:

(A) ТЕЛЕФОН: (415) 742-7536
(B) ТЕЛЕФАКС:(415) 742-7217

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 1:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 19 пар оснований
(B) ТИП: нуклеиновая кислота
(C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO:1:

GAAGCTGCAA CTCGTTAAA

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:2:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:
(A) ДЛИНА: 18 пар оснований
(B) ТИП: нуклеиновая кислота
(C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii)МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: ДНК (геномная)

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 2:

GCTGCTCTAG ACAATTCG

(4) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 3:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 39 пар оснований
(B) ТИП: нуклеиновая кислота
(C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: ДНК (геномная)

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 3:

GTATTAGGGG CGGACGGTCG AGGCGCCATC AGCTCGATT

(5) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:4:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 33 пары оснований
(B) ТИП: нуклеиновая кислота
(C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: ДНК (геномная)

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:4:

TCAGGTTCGG TCTCGAGCGT TGCCCAAGGA TTG

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 5:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

(A) ДЛИНА: 22 пары оснований
(B) ТИП: нуклеиновая кислота
(C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: ДНК (геномная)

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO:5:

CACGTTGCTA GCTTGAGTTT AG

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:6:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:
(A) ДЛИНА: 1497 пар оснований
(B) ТИП: нуклеиновая кислота
(C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: ДНК (геномная)

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ : SEQ ID NO: 6

GGTCTACTAA AATATTATTC CATACTATAC AATTAATACA CAGAATAATC TGTCTATTGG 60

TTATTCTGCA AATGAAAAAA AGGAGAGGAT AAAGAGTGAG AGGCAAAAAA GTATGGATCA 120

TTGCTGTT TGCTTTAGCG TTAATCTTTA CGATGGCGTT CGGCAGCACA TCCTCTGCCC 180

AGGCGGCAGG GAAATCAAAC GGGGAAAAGA AATATATTGT CGGGTTTAAA CAGACAATGA 240

GCACGATGAG CGCCGCTAAG AAGAAAGATG TCATTTCTGA AAAAGGCGGG AAAGTGCAAA 300

AGCAATTCAA ATATGTAGAC GCAGCTTCAG TCACATTAAA CGAAAAAGCT GTAAAAGAAT 360

TGAAAAAAGA CCCGAGCGTC GCTTACGTTG AAGAAGATCA CGTAGCACAT GCGTACGCGC 420

AGTCCGTGCC TTACGGCGTA TCACAAATTA AAGCCCCTGC TCTGCACTCT CAAGGCTACA 480

CTGGATCAAA TGTTAAAGTA GCGGTTATCG ACAGCGGTAT CGATTCTTCT CATCCTGATT 540

TAAAGGTAGC AAGCGGAGCC AGCATGGTTC CTTCTGAAAC AAATCCTTTC CAAGACAACA 600

ACTCTCACGG AACTCACGTT GCCGGCACAG TTGCGGCTCT TAATAACTCA ATCGGTGTAT 660

TAGGCGTTGC GCCAAGCGCA TCACTTTACG CTGTAAAAGT TCTCGGTGCT GACGGTTCCG 720

GCCAATACAG CTGGATCATT AACGGAATCG AGTGGGCGAT CGCAAACAAT ATGGACGTTA 780

TTAACATGAG CCTCGGCGGA CCTTCTGGTT CTGCTGCTTT AAAAGCGGCA GTTGATAAAG 840

CCGTTGCATC CGGCGTCGTA GTCGTTGCGG CAGCCGGTAA CGAAGGCACT TCCGGCAGCT 900

CAAGCACAGT GGGCTACCCT GGTAAATACC CTTCTGTCAT TGCAGTAGGC GCTGTTGACA 960

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

GCAGCAACCA AAGAGCATCT TTCTCAAGCG TAGGACCTGA GCTTGATGTC ATGGCACCTG 1020

GCGTATCTAT CCAAAGCACG CTTCCTGGAA ACAAATACGG GGCGTACAAC GGTACGTCAA 1080

TGGCATCTCC GCACGTTGCC GGAGCGGCTG CTTTGATTCT TTCTAAGCAC CCGAACTGGA 1140

CAAACACTCA AGTCCGCAGC AGTTTAGAAA ACACCACTAC AAAACTTGGT GATTCTTTGT 1200

ACTATGGAAA AGGGCTGATC AACGTACAAG CGGCAGCTCA GTAAAACATA AAAAACCGGC 1260

CTTGGCCCCG CCGGTTTTTT ATTATTTTTC TTCCTCCGCA TGTTCAATCC GCTCCATAAT 1320

CGACGGATGG CTCCCTCTGA AAATTTTAAC GAGAAACGGC GGGTTGACCC GGCTCAGTCC 1380

CGTAACGGCC AACTCCTGAA ACGTCTCAAT CGCCGCTTCC CGGTTTCCGG TCAGCTCAAT 1440

GCCATAACGG TCGGCGGCGT TTTCCTGATA CCGGGAGACG GCATTCGTAA TCGGATC 1497

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:7:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:
(A) ДЛИНА: 275 аминокислот
(B) ТИП: аминокислота
(C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: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

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

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) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:8:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:
(A) ДЛИНА: 275 аминокислот
(B) ТИП: аминокислота
(C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: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

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

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) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:9:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:
(A) ДЛИНА: 274 аминокислоты
(B) ТИП: аминокислота
(C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:9;

Ala Gln Thr Val Pro Tyr Gly Ile Pro Leu Ile Lys Ala Asp Lys Val
1 5 10 15

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

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) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:10:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:
(A) ДЛИНА: 269 аминокислот

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

(B) ТИП: аминокислота
(C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: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
165 170 175

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

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
260 265

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:11:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:
(A) ДЛИНА: 1140 пар оснований
(B) ТИП: нуклеиновая кислота
(C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: ДНК (геномная)

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:11:

ATGAAGAAAC CGTTGGGGAA AATTGTCGCA AGCACCGCAC TACTCATTTC TGTTGCTTTT 60

AGTTCATCGA TCGCATCGGC TGCTGAAGAA GCAAAAGAAA AATATTTAAT TGGCTTTAAT 120

GAGCAGGAAG CTGTCAGTGA GTTTGTAGAA CAAGTAGAGG CAAATGACGA GGTCGCCATT 180

CTCTCTGAGG AAGAGGAAGT CGAAATTGAA TTGCTTCATG AATTTGAAAC GATTCCTGTT 240

TTATCCGTTG AGTTAAGCCC AGAAGATGTG GACGCGCTTG AACTCGATCC AGCGATTTCT 300

TATATTGAAG AGGATGCAGA AGTAACGACA ATGGCGCAAT CAGTGCCATG GGGAATTAGC 360

CGTGTGCAAG CCCCAGCTGC CCATAACCGT GGATTGACAG GTTCTGGTGT AAAAGTTGCT 420

GTCCTCGATA CAGGTATTTC CACTCATCCA GACTTAAATA TTCGTGGTGG CGCTAGCTTT 480

GTACCAGGGG AACCATCCAC TCAAGATGGG AATGGGCATG GCACGCATGT GGCCGGGACG 540

ATTGCTGCTT TAAACAATTC GATTGGCGTT CTTGGCGTAG CGCCGAGCGC GGAACTATAC 600

GCTGTTAAAG TATTAGGGGC GAGCGGTTCA GGTTCGGTCA GCTCGATTGC CCAAGGATTG 660

GAATGGGCAG GGAACAATGG CATGCACGTT GCTAATTTGA GTTTAGGAAG CCCTTCGCCA 720

AGTGCCACAC TTGAGCAAGC TGTTAATAGC GCGACTTCTA GAGGCGTTCT TGTTGTAGCG 780

GCATCTGGGA ATTCAGGTGC AGGCTCAATC AGCTATCCGG CCCGTTATGC GAACGCAATG 840

GCAGTCGGAG CTACTGACCA AAACAACAAC CGCGCCAGCT TTTCACAGTA TGGCGCAGGG 900

CTTGACATTG TCGCACCAGG TGTAAACGTG CAGAGCACAT ACCCAGGTTC AACGTATGCC 960

AGCTTAAACG GTACATCGAT GGCTACTCCT CATGTTGCAG GTGCAGCAGC CCTTGTTAAA 1020

CAAAAGAACC CATCTTGGTC CAATGTACAA ATCCGCAATC ATCTAAAGAA TACGGCAACG 1080

AGCTTAGGAA GCACGAACTT GTATGGAAGC GGACTTGTCA ATGCAGAAGC GGCAACACGC 1140

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 12:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:
(A) ДЛИНА: 1140 пар оснований
(B) ТИП: нуклеиновая кислота
(C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: ДНК (геномная)

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 12:

ATGAAGAAAC CGTTGGGGAA AATTGTCGCA AGCACCGCAC TACTCATTTC TGTTGCTTTT 60

AGTTCATCGA TCGCATCGGC TGCTGAAGAA GCAAAAGAAA AATATTTAAT TGGCTTTAAT 120

GAGCAGGAAG CTGTCAGTGA GTTTGTAGAA CAAGTAGAGG CAAATGACGA GGTCGCCATT 180

CTCTCTGAGG AAGAGGAAGT CGAAATTGAA TTGCTTCATG AATTTGAAAC GATTCCTGTT 240

TTATCCGTTG AGTTAAGCCC AGAAGATGTG GACGCGCTTG AACTCGATCC AGCGATTTCT 300

TATATTGAAG AGGATGCAGA AGTAACGACA ATGGCGCAAT CAGTGCCATG GGGAATTAGC 360

CGTGTGCAAG CCCCAGCTGC CCATAACCGT GGATTGACAG GTTCTGGTGT AAAAGTTGCT 420

GTCCTCGATA CAGGTATTTC CACTCATCCA GACTTAAATA TTCGTGGTGG CGCTAGCTTT 480

GTACCAGGGG AACCATCCAC TCAAGATGGG AATGGGCATG GCACGCATGT GGCCGGGACG 540

ATTGCTGCTT TAGACAACTC GATTGGCGTT CTTGGCGTAG CGCCGAGCGC GGAACTCTAC 600

GCTGTTAAAG TATTAGGGGC GAGCGGTTCA GGCGCCATCA GCTCGATTGC CCAAGGATTG 660

GAATGGGCAG GGAACAATGG CATGCACGTT GCTAATTTGA GTTTAGGAAG CCCTTCGCCA 720

AGTGCCACAC TTGAGCAAGC TGTTAATAGC GCGACTTCTA GAGGCGTTCT TGTTGTAGCG 780

GCATCTGGGA ATTCAGGTGC AGGCTCAATC AGCTATCCGG CCCGTTATGC GAACGCAATG 840

GCAGTCGGAG CTACTGACCA AAACAACAAC CGCGCCAGCT TTTCACAGTA TGGCGCAGGG 900

CTTGACATTG TCGCACCAGG TGTAAACGTG CAGAGCACAT ACCCAGGTTC AACGTATGCC 960

AGCTTAAACG GTACATCGAT GGCTACTCCT CATGTTGCAG GTGCAGCAGC CCTTGTTAAA 1020

CAAAAGAACC CATCTTGGTC CAATGTACAA ATCCGCAATC ATCTAAAGAA TACGGCAACG 1080

AGCTTAGGAA GCACGAACTT GTATGGAAGC GGACTTGTCA ATGCAGAAGC GGCAACACGC 1140

2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 13:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:
(A) ДЛИНА: 30 пар оснований
(B) ТИП: нуклеиновая кислота

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

(C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: ДНК (геномная)

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 13:

TATGCCAGCC ACAACGGTAC TTCGATGGCT

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:14:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 31 пара оснований
(B) ТИП: нуклеиновая кислота
(C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: ДНК (геномная)

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:14:

CACAGTTGCG GCTCTAGATA ACTCAATCGG T

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:15:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 33 пары оснований
(B) ТИП: нуклеиновая кислота
(C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

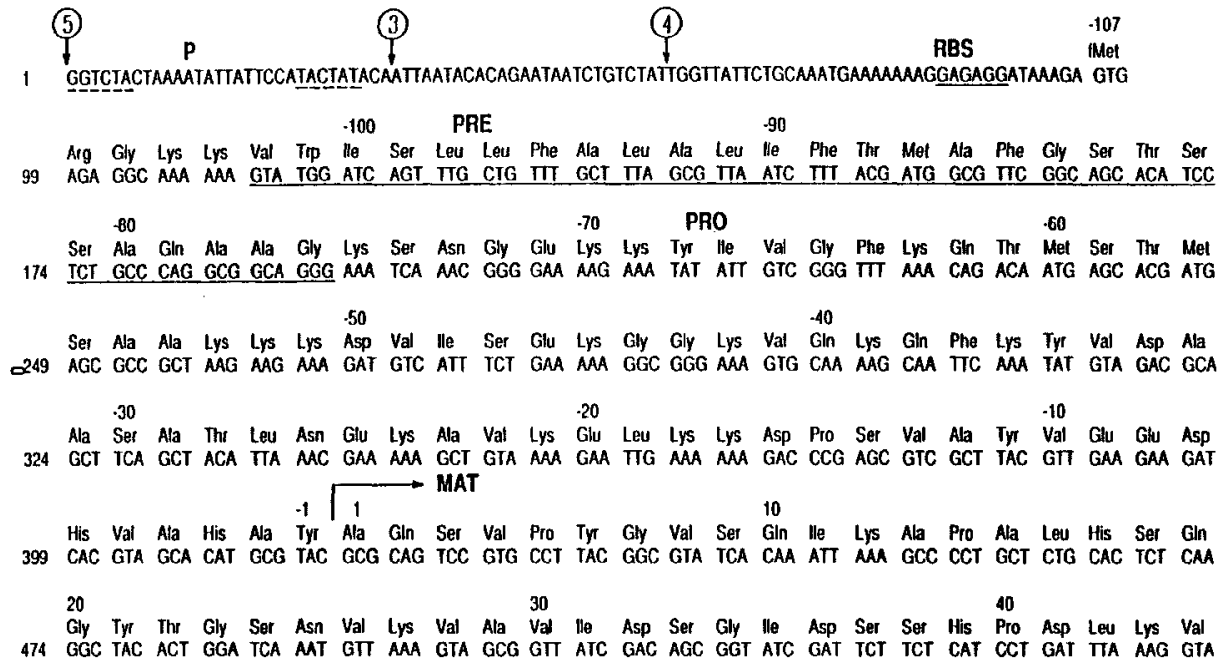
(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: ДНК (геномная)

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:15:

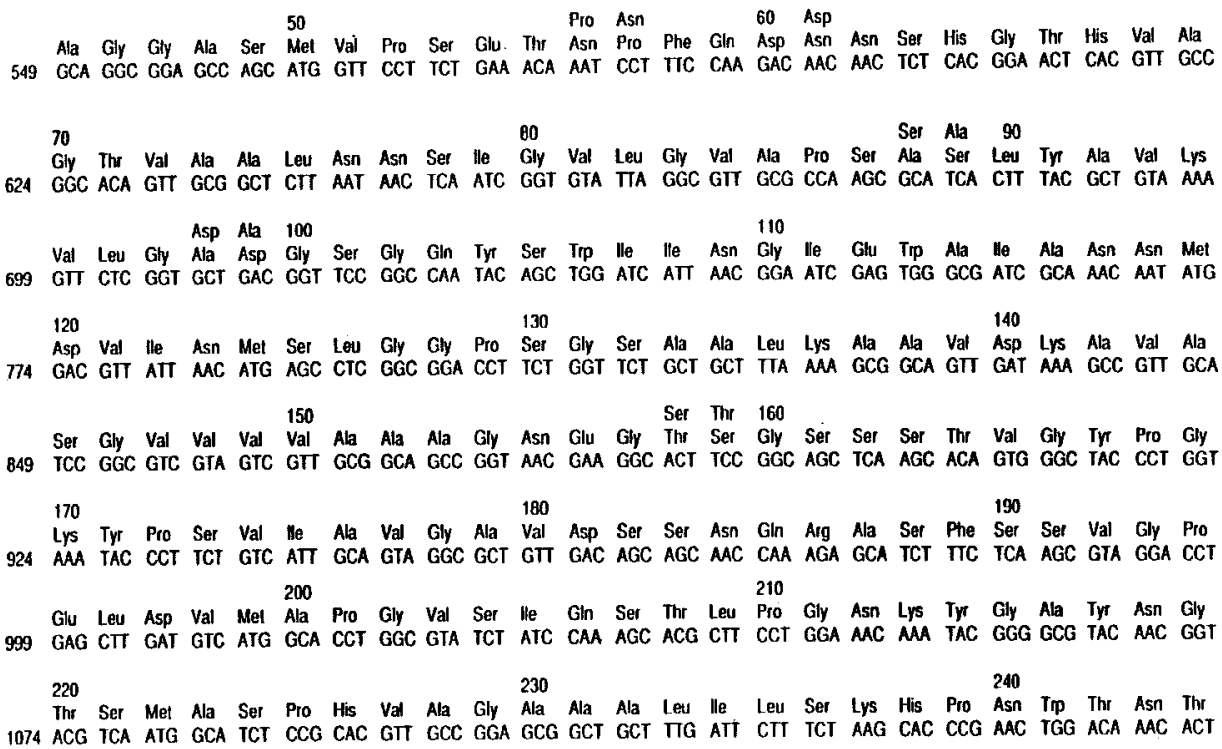
GCTGACGGTT CCGGCGCTAT TAGTTGGATC ATT

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1



ФИГ.1В-1



ФИГ.1В-2

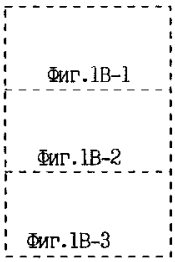
RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

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

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

1316 ATAATCGACGGATGGCTCCCTCTGAAAATTTTAACGAGAAACGGCGGGTTGACCCGGCTCAGTCCCGTAACGGCCAAGTCCTGAAACGTCTCAATCGCCG

1416 CTTCCCGGTTTCCGGTCAGCTCAATGCCGTAACGGTCGGCGGCGTTTTCCTGATACCGGGAGACGGCATTCGTAATCGGATC
```

ФИГ.1В-3

ФИГ.1В



RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

Консервативные аминокислотные остатки в субтилизинах

```
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 . .
```

ФИГ.2

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

Сравнение аминокислотных последовательностей субтилизина

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

```
01                  10                  20                  30
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

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

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

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

ФИГ.3А

```
161                 170                 180                 190
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 D S V I A V G A V D S N S N R A S F S S V G A E L E V M A
* * * * I S Y P A R Y A N A M A V G A T D Q N N N R A S F S Q Y G A G L D I V A

201                 210                 220                 230
P G V S I Q S T L P G N K Y G A Y N G T S M A S P H V A G A A A L I L S K H P N
P G V S I Q S T L P G G T Y G A Y N G T S M A T P H V A G A 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 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 T P H V A G A A A L V K Q K N P S

241                 250                 260                 270
W T N T Q V R S S L E N T T T K L G D S F Y Y G K G L I N V Q A A A A Q
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 A Q
L S A S Q V R N R L S S T A T Y L G S S F Y Y G K G L I N V E A A A A Q
W S N V Q I R N H L K N T A T S L G S T N L Y G S G L V N A E A A T R
```

ФИГ.3В

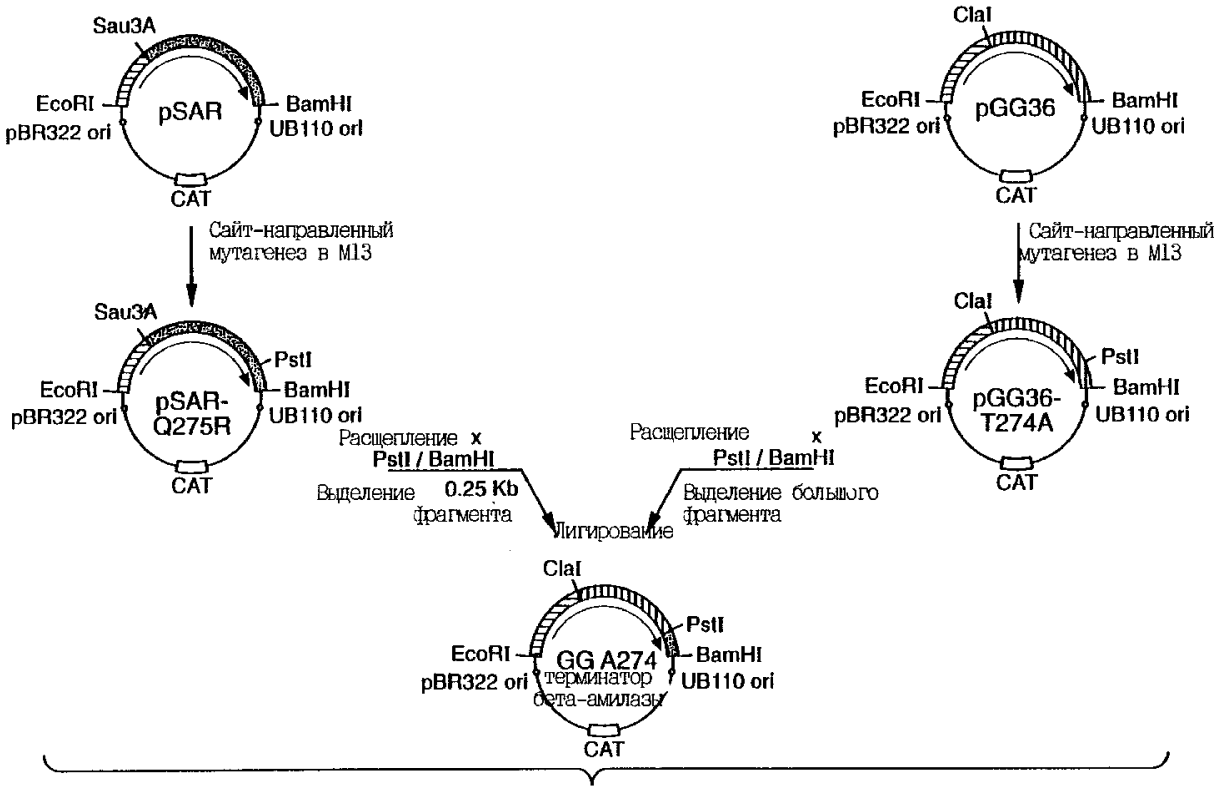
Фиг.3А

ФИГ.3

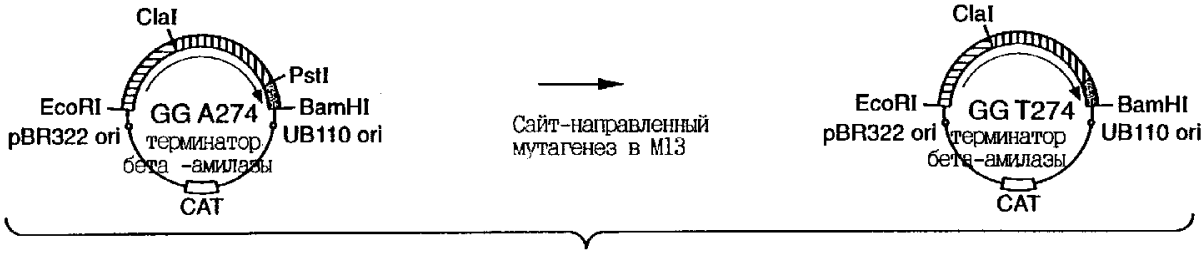
Фиг.3В

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1



ФИГ.4



ФИГ.5

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

```
          10                  30                  50
ATGAAGAAACCGTTGGGGAAAATTGTCGCAAGCACCGCACTACTCATTTCTGTTGCTTTT
MetLysLysProLeuGlyLysIleValAlaSerThrAlaLeuLeuIleSerValAlaPhe

          70                  90                  110
AGTTCATCGATCGCATCGGCTGCTGAAGAAGCAAAAGAAAAATATTTAATTGGCTTTAAT
SerSerSerIleAlaSerAlaAlaGluGluAlaLysGluLysTyrLeuIleGlyPheAsn

          130                 150                 170
GAGCAGGAAGCTGTCAGTGAGTTTGTAGAACAAGTAGAGGCAAATGACGAGGTCGCCATT
GluGlnGluAlaValSerGluPheValGluGlnValGluAlaAsnAspGluValAlaIle

          190                 210                 230
CTCTCTGAGGAAGAGGAAGTCGAAATTGAATTGCTTCATGAATTTGAAACGATTCCTGTT
LeuSerGluGluGluGluValGluIleGluLeuLeuHisGluPheGluThrIleProVal

          250                 270                 290
TTATCCGTTGAGTTAAGCCCAGAAGATGTGGACGCGCTTGAACTCGATCCAGCGATTTCT
LeuSerValGluLeuSerProGluAspValAspAlaLeuGluLeuAspProAlaIleSer

          310                 330                 350
TATATTGAAGAGGATGCAGAAGTAACGACAATGGCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGC
TyrIleGluGluAspAlaGluValThrThrMetAlaGlnSerValProTrpGlyIleSer

          370                 390                 410
CGTGTGCAAGCCCCAGCTGCCCATAACCGTGGATTGACAGGTTCTGGTGTAAAAGTTGCT
ArgValGlnAlaProAlaAlaHisAsnArgGlyLeuThrGlySerGlyValLysValAla
```

ФИГ.6А

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

```
       430                   450                   470
GTCCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTT
ValLeuAspThrGlyIleSerThrHisProAspLeuAsnIleArgGlyGlyAlaSerPhe

       490                   510                   530
GTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGACG
ValProGlyGluProSerThrGlnAspGlyAsnGlyHisGlyThrHisValAlaGlyThr

       550                   570                   590
ATTGCTGCTTTAAACAATTCGATTGGCGTTCTTGGCGTAGCGCCGAGCGCGGAACTATAC
IleAlaAlaLeuAsnAsnSerIleGlyValLeuGlyValAlaProSerAlaGluLeuTyr

       610                   630                   650
GCTGTTAAAGTATTAGGGGCGAGCGGTTCAGGTTCGGTCAGCTCGATTGCCCAAGGATTG
AlaValLysValLeuGlyAlaSerGlySerGlySerValSerSerIleAlaGlnGlyLeu

       670                   690                   710
GAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTTGCTAATTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCA
GluTrpAlaGlyAsnAsnGlyMetHisValAlaAsnLeuSerLeuGlySerProSerPro

       730                   750                   770
AGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGAGGCGTTCTTGTTGTAGCG
SerAlaThrLeuGluGlnAlaValAsnSerAlaThrSerArgGlyValLeuValValAla

       790                   810                   830
GCATCTGGGAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCGTTATGCGAACGCAATG
AlaSerGlyAsnSerGlyAlaGlySerIleSerTyrProAlaArgTyrAlaAsnAlaMet
```

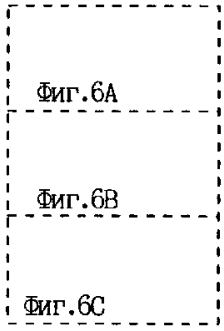
ФИГ.6В

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

```
       850                 870                 890
GCAGTCGGAGCTACTGACCAAAACAACAACCGCGCCAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGG
AlaValGlyAlaThrAspGlnAsnAsnAsnArgAlaSerPheSerGlnTyrGlyAlaGly

       910                 930                 950
CTTGACATTGTCGCACCAGGTGTAAACGTGCAGAGCACATACCCAGGTTCAACGTATGCC
LeuAspIleValAlaProGlyValAsnValGlnSerThrTyrProGlySerThrTyrAla

       970                 990                 1010
AGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAGCCCTTGTTAAA
SerLeuAsnGlyThrSerMetAlaThrProHisValAlaGlyAlaAlaAlaLeuValLys

      1030                1050                1070
CAAAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTACAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACG
GlnLysAsnProSerTrpSerAsnValGlnIleArgAsnHisLeuLysAsnThrAlaThr

      1090                1110                1130
AGCTTAGGAAGCACGAACTTGTATGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGC
SerLeuGlySerThrAsnLeuTyrGlySerGlyLeuValAsnAlaGluAlaAlaThrArg
```

ФИГ.6С



ФИГ.6

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

```
        10                  30                  50
ATGAAGAAACCGTTGGGGAAAATTGTCGCAAGCACCGCACTACTCATTTCTGTTGCTTTT
MetLysLysProLeuGlyLysIleValAlaSerThrAlaLeuLeuIleSerValAlaPhe

        70                  90                  110
AGTTCATCGATCGCATCGGCTGCTGAAGAAGCAAAAGAAAAATATTTAATTGGCTTTAAT
SerSerSerIleAlaSerAlaAlaGluGluAlaLysGluLysTyrLeuIleGlyPheAsn

       130                 150                 170
GAGCAGGAAGCTGTCAGTGAGTTTGTAGAACAAGTAGAGGCAAATGACGAGGTCGCCATT
GluGlnGluAlaValSerGluPheValGluGlnValGluAlaAsnAspGluValAlaIle

       190                 210                 230
CTCTCTGAGGAAGAGGAAGTCGAAATTGAATTGCTTCATGAATTTGAAACGATTCCTGTT
LeuSerGluGluGluGluValGluIleGluLeuLeuHisGluPheGluThrIleProVal

       250                 270                 290
TTATCCGTTGAGTTAAGCCCAGAAGATGTGGACGCGCTTGAACTCGATCCAGCGATTTCT
LeuSerValGluLeuSerProGluAspValAspAlaLeuGluLeuAspProAlaIleSer

       310                 330                 350
TATATTGAAGAGGATGCAGAAGTAACGACAATGGCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGC
TyrIleGluGluAspAlaGluValThrThrMetAlaGlnSerValProTrpGlyIleSer

       370                 390                 410
CGTGTGCAAGCCCCAGCTGCCCATAACCGTGGATTGACAGGTTCTGGTGTAAAAGTTGCT
ArgValGlnAlaProAlaAlaHisAsnArgGlyLeuThrGlySerGlyValLysValAla
```

ФИГ.7А

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

```
       430                   450                   470
GTCCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTT
ValLeuAspThrGlyIleSerThrHisProAspLeuAsnIleArgGlyGlyAlaSerPhe

       490                   510                   530
GTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGACG
ValProGlyGluProSerThrGlnAspGlyAsnGlyHisGlyThrHisValAlaGlyThr

       550                   570                   590
ATTGCTGCTTTAGACAACTCGATTGGCGTTCTTGGCGTAGCGCCGAGCGCGGAACTATAC
IleAlaAlaLeuAspAsnSerIleGlyValLeuGlyValAlaProSerAlaGluLeuTyr

       610                   630                   650
GCTGTTAAAGTATTAGGGGCGAGCGGTTCAGGCGCCATCAGCTCGATTGCCCAAGGATTG
AlaValLysValLeuGlyAlaSerGlySerGlyAlaIleSerSerIleAlaGlnGlyLeu

       670                   690                   710
GAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTTGCTAATTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCA
GluTrpAlaGlyAsnAsnGlyMetHisValAlaAsnLeuSerLeuGlySerProSerPro

       730                   750                   770
AGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGAGGCGTTCTTGTTGTAGCG
SerAlaThrLeuGluGlnAlaValAsnSerAlaThrSerArgGlyValLeuValValAla

       790                   810                   830
GCATCTGGGAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCGTTATGCGAACGCAATG
AlaSerGlyAsnSerGlyAlaGlySerIleSerTyrProAlaArgTyrAlaAsnAlaMet
```

ФИГ.7В

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

```
      850                 870                 890
GCAGTCGGAGCTACTGACCAAAACAACAACCGCGCCAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGG
AlaValGlyAlaThrAspGlnAsnAsnAsnArgAlaSerPheSerGlnTyrGlyAlaGly

      910                 930                 950
CTTGACATTGTCGCACCAGGTGTAAACGTGCAGAGCACATACCCAGGTTCAACGTATGCC
LeuAspIleValAlaProGlyValAsnValGlnSerThrTyrProGlySerThrTyrAla

      970                 990                 1010
AGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAGCCCTTGTTAAA
SerLeuAsnGlyThrSerMetAlaThrProHisValAlaGlyAlaAlaAlaLeuValLys

     1030                1050                1070
CAAAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTACAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACG
GlnLysAsnProSerTrpSerAsnValGlnIleArgAsnHisLeuLysAsnThrAlaThr

     1090                1110                1130
AGCTTAGGAAGCACGAACTTGTATGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGC
SerLeuGlySerThrAsnLeuTyrGlySerGlyLeuValAsnAlaGluAlaAlaThrArg
```

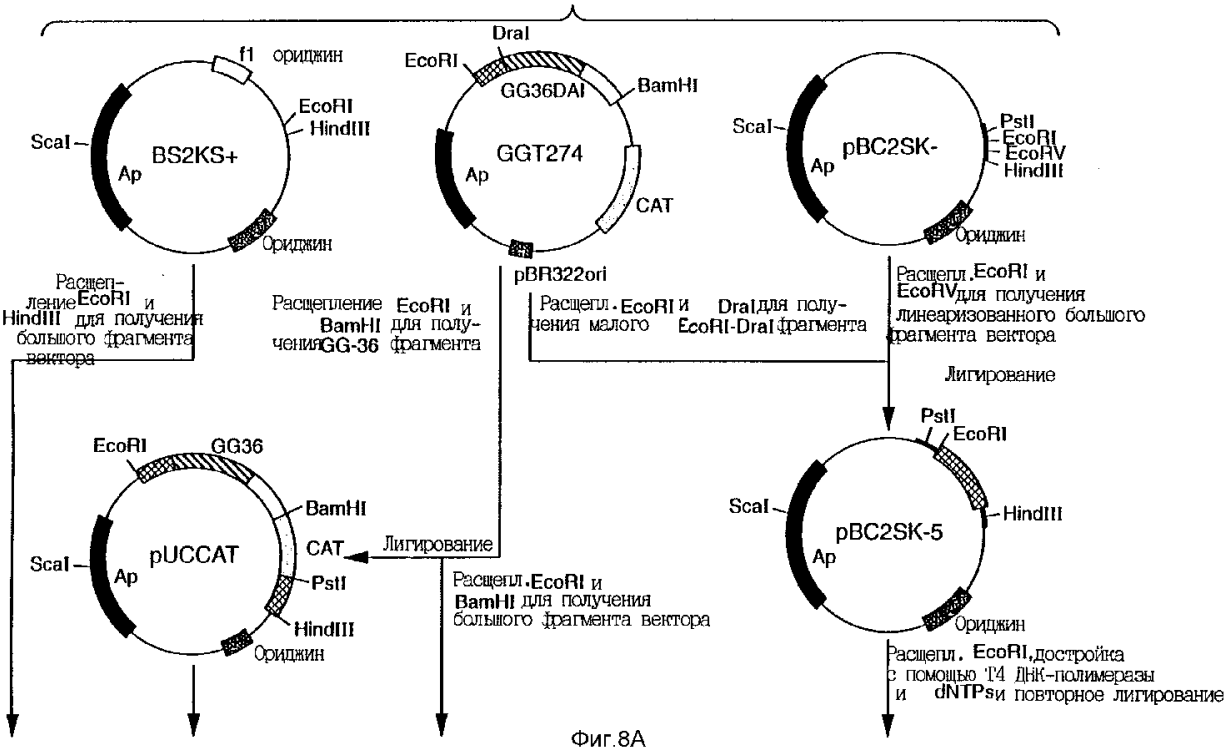
ФИГ.7С

Фиг.7А

Фиг.7В

Фиг.7С

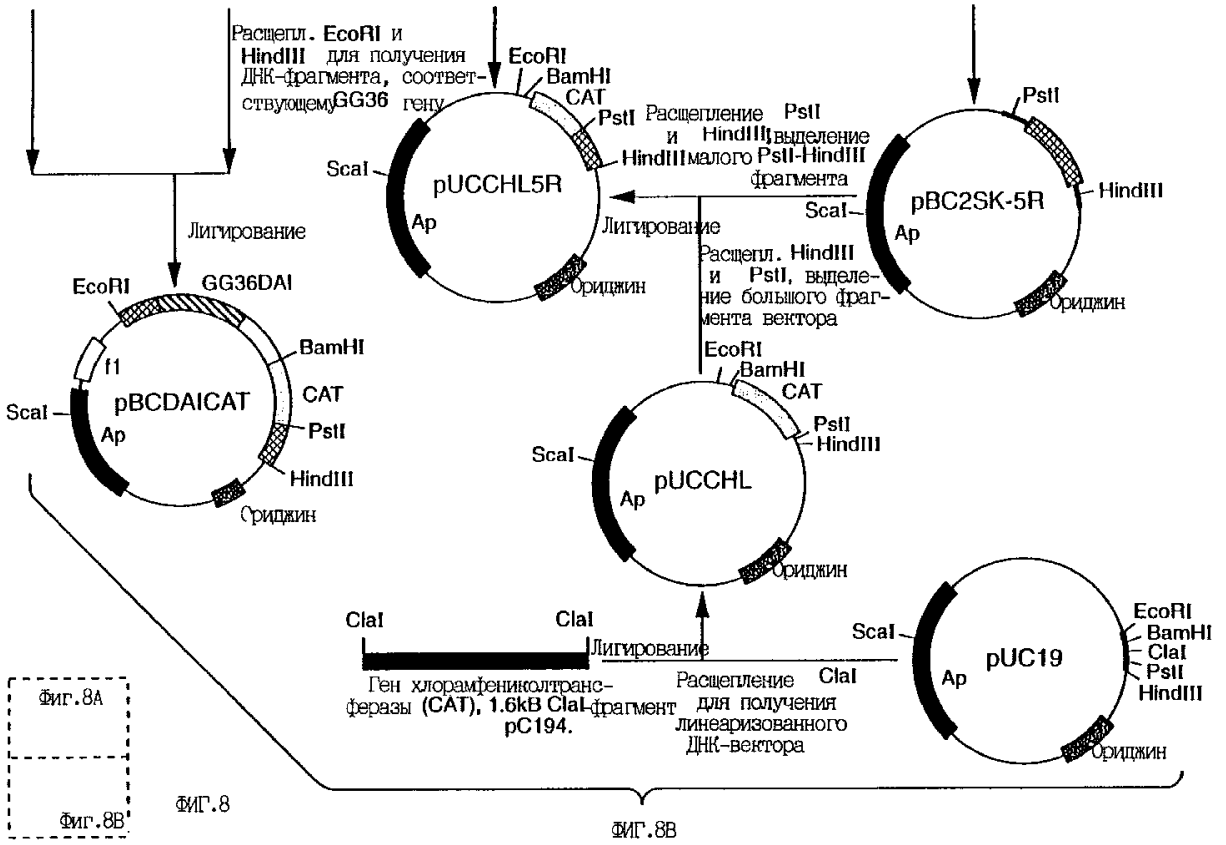
ФИГ.7



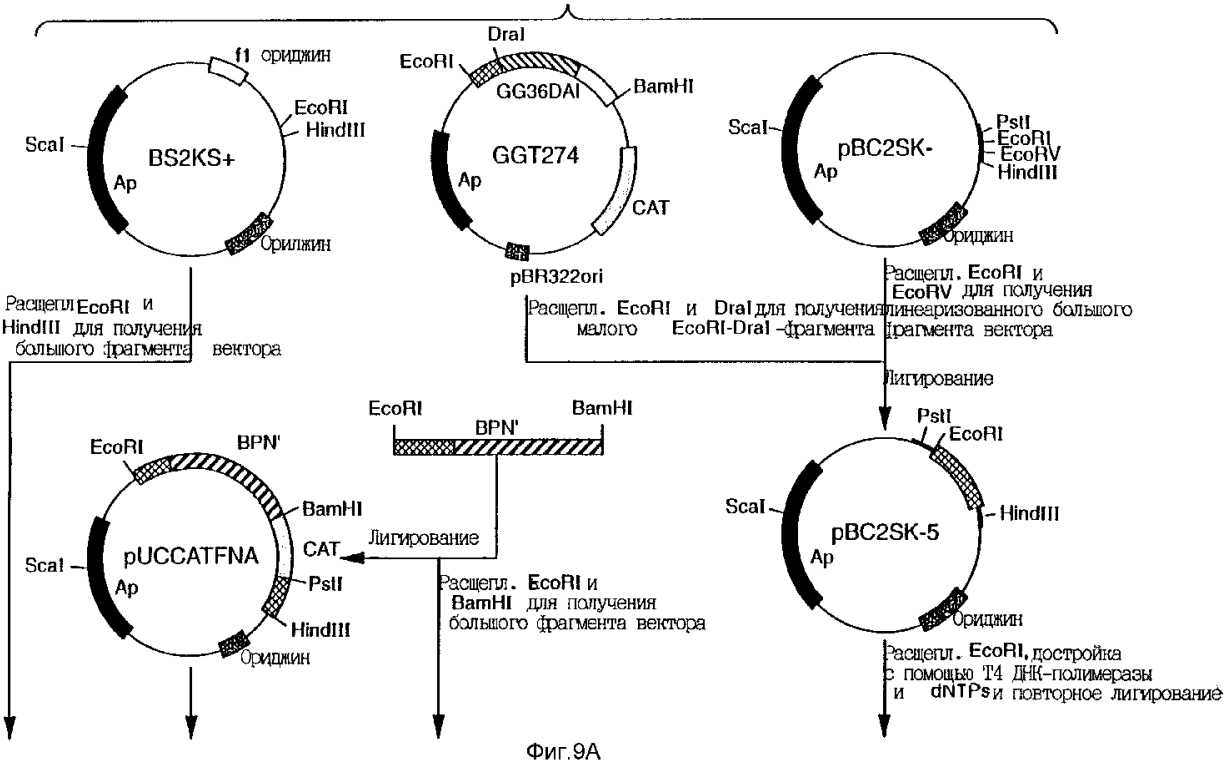
Фиг.8А

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1

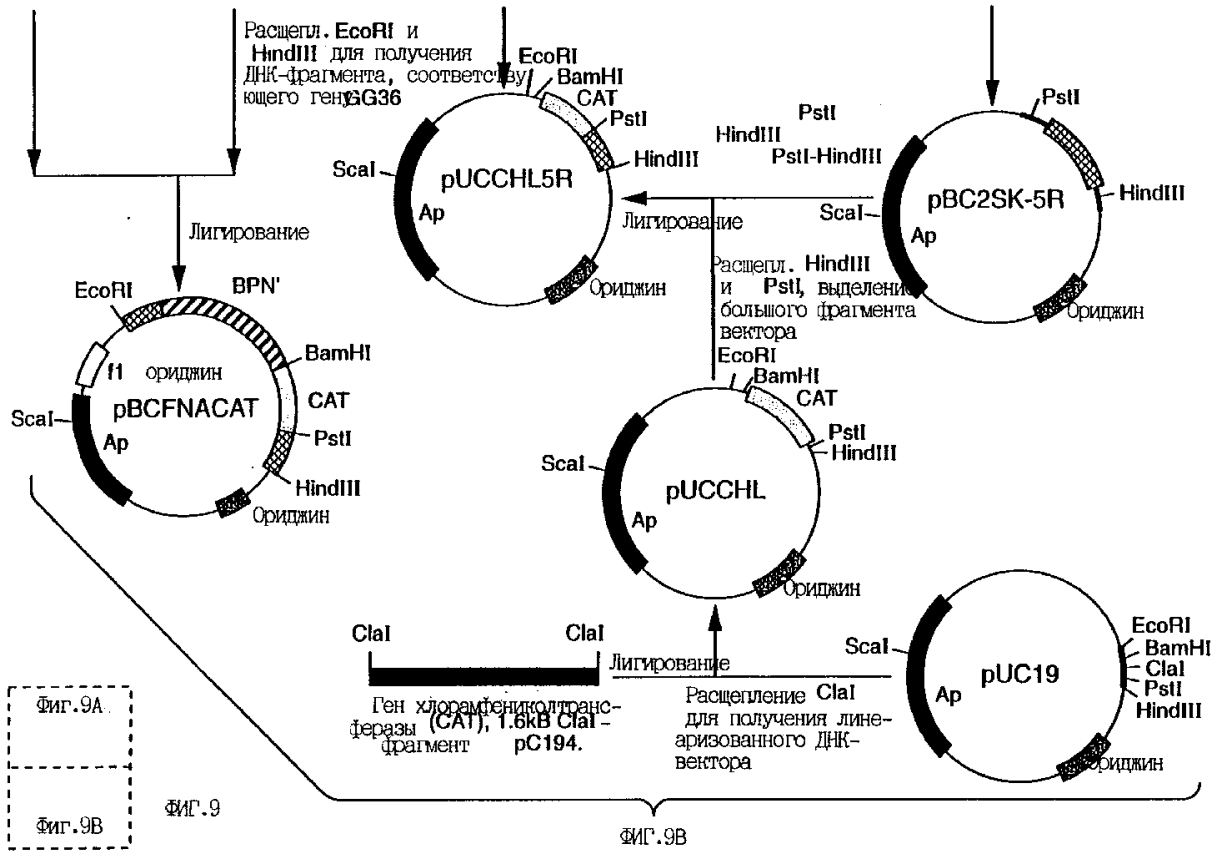


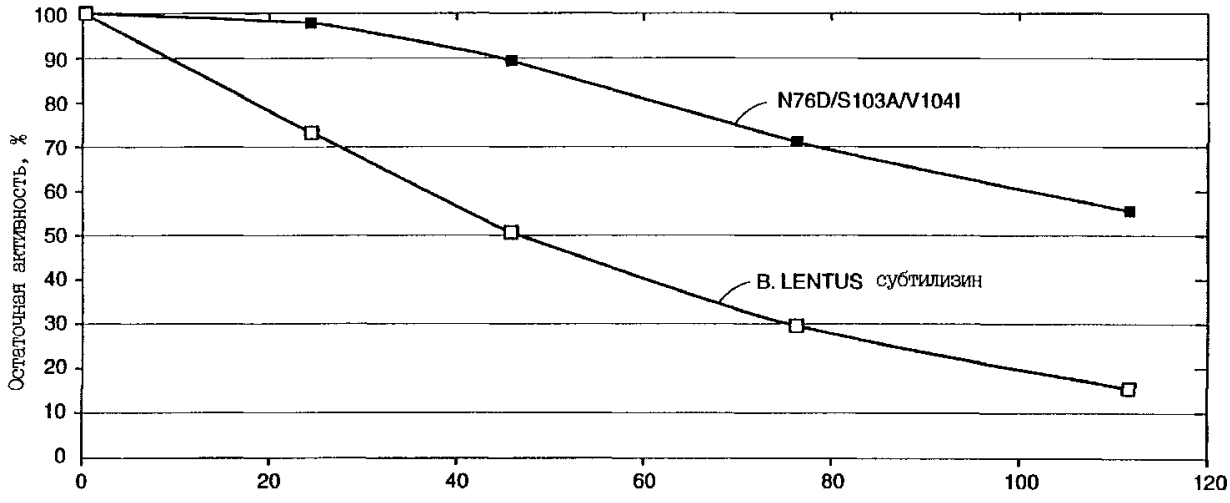
ФИГ.9A



Фиг.9A

RU 2136756 C1





ФИГ.10

RU 2136756 C1

RU 2136756 C1