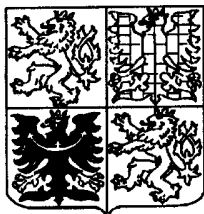


ČESKÁ  
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

# ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 31.08.94  
(32) 15.09.93, 11.08.94  
(31) 93/121437, 94/287461  
(33) US, US  
(40) 12.06.96

(21) 791-96

(13) A3

6(51)

C 12 N 15/57  
C 12 N 9/50  
C 12 N 9/54  
C 11 D 3/386

- (71) THE PROCTER & GAMBLE COMPANY, Cincinnati, OH, US;
- (72) Brode Philip Frederick III, Cincinnati, OH, US;  
Barnett Bobby Lee, Cincinnati, OH, US;  
Rubingh Donn Nelton, Cincinnati, OH, US;
- (54) **Subtilisinové BPN' varianty se sníženou adsorpcí a zvýšenou hydrolýzou, čistící prostředek obsahující tyto varianty a gen kodující tuto variantu**
- (57) Jsou popsány subtilisinové BPN' varianty, které alespoň v jedné nebo ve více polohách z poloh 190 až 220 aminokyselinyové sekvence obsahují jinou aminokyselinu než tu, která se vyskytuje v přírodním subtilisinovém BPN'. Tyto BPN' varianty vykazují sníženou adsorpci na nerozpustný substrát a zvýšenou hydrolýzu tohoto substrátu při srovnání s přírodním subtilisinovým BPN'.

\*79/196

č.j.	0 1 9 5
DOŠLO	1 5 . III . 9
URAD PRŮMYŠLOVÉHO VLASTNICTVÍ	
Příl.	

Subtilisinové BPN' varianty se sníženou adsorpcí a zvýšenou hydrolyzou, čistící prostředek obsahující tyto varianty a genu kodující tuto variantu

Oblast techniky

Tento vynález se týká subtilisinových BPN' variant se sníženou adsorpcí a zvýšenou hydrolyzou, čistícího prostředku obsahujícího tyto varianty a genu kodujícího tuto variantu.

Dosavadní stav techniky

Enzymy tvoří největší skupinu přirozeně se vyskytujících proteinů. Každá skupina enzymů obvykle katalyzuje (urychluje reakce bez toho, aby byla spotřebována) jiný druh chemické reakce. Jedna skupina enzymů, známá jako proteasy, je známa pro svoji schopnost hydrolyzovat (rozkládat sloučeninu na dvě nebo více jednodušších sloučenin s tím, že se přijímá H a OH část molekuly vody na stranách vazby, která je štěpena) jiné proteiny. Tato schopnost hydrolyzovat proteiny se s výhodou provádí zahrnutím přirozeně se vyskytujících a synteticky připravených proteas jako přísad do pracích detergentních prostředků. Mnoho skvrn na šatech je proteinového původu a proteasy se širokou specifičností mohou podstatně zlepšit odstraňování těchto skvrn.

Naneštěstí hladina účinnosti těchto proteinů v jejich přirozeném bakteriálním prostředí se často nepřenáší na relativně nepřirozené prací prostředí. Konkrétně takové vlastnosti proteas, jako je tepelná stabilita, stabilita při různém pH, stabilita při oxidaci a substrátová specifičnost, nejsou nutně optimalizovány pro použití mimo přirozené prostředí enzymu.

Aminokyselinová sekvence proteasy určuje vlastnosti proteas. Změna aminokyselinové sekvence proteasy může měnit vlastnosti enzymu do různého stupně nebo dokonce může enzym deaktivovat, podle umístění, povahy a/nebo velikosti změny aminoky-

selinové sekvence. Existuje několik přístupů pro měnění přírodní aminokyselinové sekvence proteas při pokusech zlepšit jejich vlastnosti s cílem zvýšit účinnost proteas v pracovním prostředí. Mezi tyto přístupy patří měnění aminokyselinové sekvence tak, aby se zvýšila tepelná stabilita a aby se zlepšila stabilita k oxidaci za rozdílných podmínek.

Přes různé přístupy popsané v oblasti techniky existuje stále ještě neustálá potřeba nových efektivních variant proteas užitečných pro čištění rozmanitých povrchů.

### Podstata vynálezu

Předmětem předloženého vynálezu je získat varianty subtilisinového enzymu, které mají zlepšenou hydrolýzu při srovnání s přírodním typem tohoto enzymu.

Předmětem předloženého vynálezu je také získat takové čisticí prostředky, které obsahují tyto varianty subtilisinového enzymu.

Předložený vynález se týká subtilisinových BPN' variant, které obsahují v alespoň jedné, dvou nebo třech aminokyselinových polohách jiné aminokyseliny než ty, které se vyskytují v přírodním subtilisinovém BPN' (tj. jde o substituci) ve specificky identifikovaných polohách, při čemž tyto BPN' varianty mají sníženou adsorpci k nerozpustnému substrátu a zvýšenou hydrolýzu tohoto nerozpustného substrátu při srovnání s přírodním subtilisinovým BPN'. Tento vynález se týká také genů, které kodují tyto subtilisinové BPN' varianty. Tento vynález se týká také prostředků obsahujících tyto subtilisinové BPN' varianty pro čištění rozmanitých povrchů.

Tento vynález se týká subtilisinových enzymů, zvláště BPN', které jsou modifikovány mutací různých nukleotidových sekvencí, které kodují tento enzym, tedy modifikováním aminokyselinové sekvence enzymu. Modifikované subtilisinové enzymy

(zde dále uváděné jako "BPN' varianty") podle předloženého vynálezu mají sníženou adsorpci k nerozpustnému substrátu a zvýšenou hydrolýzu tohoto nerozpustného substrátu při srovnání s přírodním subtilisinem. Předložený vynález se týká také genů mutantu kodujícího tyto BPN' varianty.

Subtilisinové enzymy podle vynálezu patří do skupiny enzymů známých jako proteasy. Proteasa je katalyzátor štěpení peptidových vazeb. Jedním typem proteasy je serinová proteasa. Serinová proteasa se odlišuje tím, že má v aktivním místě esenciální serinový zbytek.

Je dobře dokumentováno, že se enzymová rychlost hydrolýzy rozpustných substrátů zvyšuje s koncentrací enzymu. Zdálo by se tedy přijatelné, že u substrátů navázaných na povrch, jak se s nimi setkáváme při mnoha čistících aplikacích, by se rychlost hydrolýzy zvyšovala se zvyšující se koncentrací na povrchu. Bylo ukázáno, že tomu tak skutečně je (Brode P.F. III a D.S.Rauch, Langmuir, "Subtilisin BPN': Activity on an Immobilized Substrate" 8, 1325 (1992).). Ve skutečnosti byla zjištěna lineární závislost rychlosti na povrchové koncentraci pro nerozpustné substráty, jestliže se mění koncentrace enzymu na povrchu (Rubingh D.N., Bauer M.D.: "Catalysis of Hydrolysis by Proteases at the Protein-Solution Interface" v Polymer Solutions, Blends and Interfaces, I. Noda a D.N.Rubingh (red.), Elsevier, str. 464 (1992).). Když byla při výzkumu variant proteas, které poskytují lepší čištění, hledána aplikace tohoto principu, překvapivě jsme nezjistili, že enzymy, které více adsorbují, poskytují lepší čištění. Ve skutečnosti jsme překvapivě zjistili opak tohoto případu: snížená adsorpce enzymu na substrát vedla ke zvýšené hydrolýze substrátu (tj. k lepšímu čištění).

Bez ohledu na teorii předpokládáme, že zlepšené provedení, jestliže se srovnává jedna varianta s druhou, je výsledkem skutečnosti, že enzymy, které méně adsorbují, jsou také méně pevně vázány a jsou tedy mobilnější na povrchu, ze kterého se má od-



Ile Asp Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asp Leu Lys Val Ala	35	40	45
Gly Gly Ala Ser Met Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Phe Gln Asp	50	55	60
Asn Asn Ser His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu	65	70	75
Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser Leu	80	85	90
Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser	95	100	105
Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu Trp Ala Ile Ala Asn Asn Met Asp	110	115	120
Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro Ser Gly Ser Ala Ala Leu	125	130	135
Lys Ala Ala Val Asp Lys Ala Val Ala Ser Gly Val Val Val Val	140	145	150
Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Thr Ser Gly Ser Ser Ser Thr Val	155	160	165
Gly Tyr Pro Gly Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala Val Gly Ala Val	170	175	180
Asp Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly Pro Glu	185	190	195
Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr Leu Pro	200	205	210

Gly	Asn	Lys	Tyr	Gly	Ala	Tyr	Asn	Gly	Thr	Ser	Met	Ala	Ser	Pro
				215					220					225

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

Trp	Thr	Asn	Thr	Gln	Val	Arg	Ser	Ser	Leu	Glu	Asn	Thr	Thr	Thr
				245					250					255

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

Gln	Ala	Ala	Ala	Gln
				275

(sekvence id. č. 1).

Aminokyselinová sekvence subtilisinového BPN' je dále popsána Wellsem J. A., Ferrarim E., Hennerem D.J., Estellem D.A. a Chenem E.Y. v práci: *Nucleic Acids Research* 2, 7911 (1993), která je zde zařazena jako citace.

Pojem "přírodní aminokyselinová sekvence" zahrnuje jak shora uvedenou sekvenci identifikační číslo 1 tak sekvenci identifikační číslo 1 s jinými modifikacemi aminokyselinové sekvence než v kterékoliv z poloh 199 až 220.

Pojem "hydrofilnější aminokyselina" tak, jak se zde používá, znamená jakoukoliv jinou aminokyselinu s větší hydrofilností než předmětná aminokyselina, jak je to uvedeno v tabulce hydrofilností níže. Následující tabulka hydrofilností (tabulka 1) uvádí aminokyseliny v pořadí zvyšující se hydrofilností (viz Hopp T.P. a Woods K.R.: "Prediction of Protein Antigenic Determinants from Amino Acid Sequences", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 78, 3824 (1981), zahrnuté sem jako citace).

Tabulka 1

aminokyselina	hydrofilnost
Trp	-3,4
Phe	-2,5
Tyr	-2,3
Leu, Ile	-1,8
Val	-1,5
Met	-1,3
Cys	-1,0
Ala, His	-0,5
Thr	-0,4
Pro, Gly	-0,0
Gln, Asn	0,2
Ser	0,3
Arg <sup>+</sup> , Lys <sup>+</sup> ,	
Glu <sup>-</sup> , Asp <sup>-</sup>	3,0

Tabulka 1 také ukazuje, která aminokyselina nese náboj (tato vlastnost je odvozena od pH v rozmezí asi 8 až 9). Positivně nabitě aminokyseliny jsou Arg a Lys, negativně nabitě aminokyseliny jsou Glu a Asp, zbývající aminokyseliny jsou neutrální. Ve výhodném provedení podle předloženého vynálezu je substituující aminokyselina buď neutrální nebo negativně nabitá, výhodněji negativně nabitá (tj. Glu nebo Asp).

Tak například konstatování "substituovat Gln stejně hydrofilní nebo hydrofilnější aminokyselinou, která je neutrální nebo má negativní náboj", znamená, že Gln by byl substituován Asn (která je stejně hydrofilní jako Gln) nebo Ser, Glu nebo Asp (které jsou hydrofilnější než Gln). Každá z nich je neutrální nebo nese negativní náboj a má větší hydrofilnost při srovnání s Gln. Podobně konstatování "substituovat Pro hydrofilnější aminokyselinou, která je neutrální nebo má negativní náboj" znamená, že Pro by měl být substituován Gln, Asn, Ser, Glu nebo

Asp.

V této části spisu budou popsány varianty, které obsahují alespoň jednu substituci aminokyselin.

V jednom provedení podle předloženého vynálezu BPN' varianta obsahuje přírodní aminokyselinovou sekvenci, při čemž tato přírodní aminokyselinová sekvence je substituována v jedné nebo více z poloh 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219 a 220, při čemž tato BPN' varianta má sníženou adsorpci na nerozpustný substrát nebo zvýšenou hydrolýzu nerozpustného substrátu při srovnání s přírodním subtilisinovým BPN'. Výhodnými polohami, které mají substituované aminokyseliny, jsou 199, 200, 201, 202, 205, 207, 208, 209, 210, 211, 212 nebo 215, výhodněji 200, 201, 202, 205 nebo 207.

Substituující aminokyselinou pro polohu 199 je s výhodou Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 200 je s výhodou His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 201 je s výhodou Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 202 je s výhodou Pro, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 203 je s výhodou Met, Cys, His, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 204 je s výhodou Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 205 je s výhodou Leu, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo

Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 206 je s výhodou Pro, Asn nebo Ser.

Substituující aminokyselinou pro polohu 207 je s výhodou Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 208 je s výhodou Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 209 je s výhodou Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 210 je s výhodou Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 211 je s výhodou Ala, Pro, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 212 je s výhodou Gln, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 213 je s výhodou Trp, Phe, Tyr, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 214 je s výhodou Phe, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Pro, Gly, Gln, Asn, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 215 je s výhodou Thr, Pro, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 216 je s výhodou His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 218 je s výhodou Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 219 je s výhodou Pro, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 220 je s výhodou Pro, Gly, Gln, Asn, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro kteroukoliv z poloh 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 219 a 220 je výhodnější s odkazem na tabulku 1 neutrální nebo negativně nabitá a stejně hydrofilní nebo hydrofilnější, s výhodou hydrofilnější, aminokyselina než je aminokyselina v příslušné poloze přírodního subtilisinového BPN'.

Substituující aminokyselinou pro kteroukoliv z poloh 199, 200, 201, 202, 203, 205, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 219 a 220 je ještě výhodněji Asp nebo Glu a substituující aminokyselinou pro polohu 204 nebo 218 je Glu.

V této části spisu budou popsány varianty, které obsahují alespoň dvě substituce aminokyselin.

V jiném provedení podle předloženého vynálezu BPN' varianta obsahuje přírodní aminokyselinovou sekvenci, při čemž tato přírodní aminokyselinová sekvence je substituována ve dvou nebo více polohách z poloh 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219 a 220, při čemž tato BPN' varianta má sníženou adsorpci na nerozpustný substrát a zvýšenou hydrolýzu nerozpustného substrátu při srovnání s přírodním subtilisinovým BPN'. Výhodnými polohami, které mají substituované aminokyseliny, jsou polohy 199, 200, 201, 202, 205, 207, 208, 209, 210, 211, 212 nebo 215, výhodněji 200, 201, 202, 205 nebo 207.

Substituující aminokyselinou pro polohu 199 je s výhodou Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 200 je s výhodou His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 201 je s výhodou Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 202 je s výhodou Pro, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 203 je s výhodou Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 204 je s výhodou Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 205 je s výhodou Leu, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 206 je s výhodou Pro, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 207 je s výhodou Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 208 je s výhodou Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 209 je s výhodou Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 210 je s výhodou Ala, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 211 je s výhodou Ala, Pro, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 212 je s výhodou Gln, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 213 je s výhodou Trp, Phe, Tyr, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 214 je s výhodou Phe, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 215 je s výhodou Thr, Pro, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 216 je s výhodou His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 217 je s výhodou Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 218 je s výhodou Gln, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 219 je s výhodou Pro, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 220 je s výhodou Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro kteroukoliv z poloh 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219 a 220 je s výhodou s odkazem na tabulku 1 neutrální nebo negativně nabitá a stejně hy-

drofilní nebo hydrofilnější, výhodněji hydrofilnější aminokyselina než je aminokyselina v příslušné poloze přírodního subtilisinového BPN'.

Substituující aminokyselinou pro kteroukoliv z poloh 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219 a 220 je ještě výhodněji Asp nebo Glu.

V této části spisu budou popsány varianty, které obsahují alespoň tři substituce aminokyselin.

V jiném provedení podle předloženého vynálezu BPN' varianta obsahuje přírodní aminokyselinovou sekvenci, při čemž tato přírodní aminokyselinová sekvence je substituována ve třech nebo více polohách z poloh 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219 a 220, při čemž tato BPN' varianta má sníženou adsorpci na nerozpustný substrát nebo zvýšenou hydrolýzu nerozpustného substrátu při srovnání s přírodním subtilisinovým BPN'. Výhodnými polohami, které mají substituované aminokyseliny, jsou polohy 199, 200, 201, 202, 205, 207, 208, 209, 210, 211, 212 nebo 215, výhodněji 200, 201, 202, 205 nebo 207.

Substituující aminokyselinou pro polohu 199 je s výhodou Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 200 je s výhodou His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 201 je s výhodou Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 202 je s výhodou Pro, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 203 je s výhodou

Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 204 je s výhodou Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 205 je s výhodou Leu, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 206 je s výhodou Pro, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 207 je s výhodou Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 208 je s výhodou Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 209 je s výhodou Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 210 je s výhodou Ala, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 211 je s výhodou Ala, Pro, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 212 je s výhodou Gln, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 213 je s výhodou Trp, Phe, Tyr, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 214 je s výhodou Phe, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln,

Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 215 je s výhodou Thr, Pro, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 216 je s výhodou His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 217 je s výhodou Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 218 je s výhodou Gln, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 219 je s výhodou Pro, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro polohu 220 je s výhodou Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

Substituující aminokyselinou pro kteroukoliv z poloh 199, 200, 201, 202, 203, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219 a 220 je s výhodou s odkazem na tabulku 1 neutrální nebo negativně nabitá a stejně hydrofilní nebo hydrofilnější, s výhodou hydrofilnější, aminokyselina než je aminokyselina v příslušné poloze přírodního subtilisového BPN'.

Substituující aminokyselinou pro kteroukoliv z poloh 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219 a 220 je ještě výhodněji Asp nebo Glu.

#### Příklady provedení vynálezu

V této části budou popsány přípravy enzymových variant.

## Příklad 1

## Geny mutantu BPN'

Fagemid (pSS-5) obsahující přírodní subtilisinový BPN' gen (Mitchinson C. a J.A.Wells: "Protein Engineering of Disulfide Bonds in Subtilisin BPN'", *Biochemistry* 28, 4807 (1989).) se transformuje do *Escherichia coli* ung-kmen CJ236. Pomocí VCSM13 pomocného fágu se připraví jednovláknový uracil-obsahující DNA templát (Kunkel T.A., Roberts J.D., Zakour R.A.: "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection", *Methods in Enzymology* 154, 367 (1987) podle modifikace Yuckenberg P.D., Witneyho F., Geisselsodera J. a McClaryho J.: "Site-directed in vitro mutagenesis using uracil-containing DNA and phagemid vectors", *Directed Mutagenesis - A Practical Approach*, M.J.McPherson (red.), str. 27 až 48 (1991), obě práce jsou zde zahrnuty jako citace). Pro přípravu všech mutantů (v podstatě tak, jak je popsáno Yuckenbergem a spol.: viz shora 1991) se používá modifikace místně řízené mutagenese jediného primeru způsobem podle Zollera a Smithe (Zoller M.J., Smith M.: "Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any fragment of DNA", *Nucl. Acids Res.* 10, 6487 (1982), tato práce je zde zahrnuta jako odkaz). Oligonukleotidy se připravují syntetizátorem Applied Biosystem Inc. 380B DNA synthesizer. Reakční produkty mutagenese se transformují do *Escherichia coli* kmene MM294 (Americká sbírka typů kultur, *E. coli* 33625). Všechny mutanty se potvrdí DNA sekvenováním. Isolovaná DNA se transformuje do *Bacillus subtilis* expresního kmene BG2036 (Yang M.Y., Ferrari E., Henner D.J.: "Cloning of the Neutral Protease Gene of *Bacillus subtilis* and the Use of the Cloned Gene to Create an In Vitro-derived Deletion Mutation", *J. Bacteriol.* 160, 15 (1984).). Pro stejné mutanty se při přípravě uracilového templátu použije modifikovaný pSS-5 s posunovou mutací stop kodonu na aminokyselině 217. Oligonukleotidy jsou určeny pro restaurování příslušné čtecí oblasti v poloze 217 a jsou také kodovány pro náhodné substituce v polohách 199,

200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219 a 220 (ekvimolární a/ nebo proměnné směsi všech čtyř nukleotidů pro všechny tři báze v těchto kodonech). Mutace, které opravují posunutý stop kodon a produkují funkční enzym, se identifikují jejich schopností štěpit kasein. Náhodné substituce se stanoví DNA sekvenováním.

## Příklad 2

### Fermentace

Buňky *Bacillus subtilis* (BE2036) obsahující příslušný subtilisinový mutant se nechají vyrůst do střední log fáze v jednom litru kultury LB-glukosová živná páda a naočkují se do fermentoru Biostat ED (B. Braun Biotech, Inc., Allentown, Pennsylvania) v celkovém objemu 10 litrů. Fermentační medium obsahuje kvasinkový extrakt, škrob, protipěšivě činidlo, pufry a stopy minerálů (viz Fermentation: A Practical Approach, B. McNeil, Harvey L.M. (red.), (1990).). Živná páda se během fermentace udržuje na konstantním pH 7,0. Pro antibiotickou selekci mutovaného plasmidu se přidá chloramfenikol. Buňky se nechají růst přes noc při 37 °C do  $A_{600}$  kolem 60. Potom se izolují.

## Příklad 3

### Čištění

Aby se získal čistý enzym fermentační živné prostředí se zpracuje podle následujících stupňů. Živné prostředí se zbaví buněk *Bacillus subtilis* odstředováním a vyčeří se odstraněním jemných částic membránou zadržující částice o molekulové hmotnosti nad 100 000. Následuje odstředování membránou, která zadržuje částice o molekulové hmotnosti 10 000. Dialýsou se sníží iontová síla. 0,025M MES pufrem (2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina) se pH upraví na hodnotu 5,5. Enzym se dále vyčistí nanesením buď na kolonu s iontoměničem nebo na kolonu s afinitním adsorpčním nosičem. Z kolony se eluuje gradientem chloridu

sodného nebo propylenglykolu (viz Scopes R.K.: Protein Purification Principles and Practice, Springer Verlag, New York (1984), tato publikace je zde zahrnuta jako citace).

Pro stanovení koncentrace aktivního enzymu ve frakcích izolovaných během gradientové eluce se použije pNA test (DelMar E.G., Largman C., Brodrick J.W., Geokas M.C.: Anal. Biochem. 99, 316 (1979); tato práce je zde zahrnuta jako citace.). Tímto testem se měří rychlost, kterou se uvolňuje p-nitroanilin podle toho, jak enzym hydrolyzuje rozpustný syntetický substrát, sukcinyl-alanin-alanin-prolin-fenylalanin-p-nitroanilid (sAAPF-pNA). Rychlost vzniku žlutého zbarvení při hydrolyzační reakci se měří spektrofotometrem při 410 nm. Tato rychlost je úměrná koncentraci aktivního enzymu. Pro stanovení celkové koncentrace proteinu se použije měření absorbance při 280 nm. Poměr aktivní protein/celkový protein udává čistotu enzymu. Používá se pro identifikování frakcí, které se spojí jako zásobní roztok.

Abychom se během skladování vyhnuli autolyse enzymu, přidá se ke spojeným frakcím získaným z chromatografické kolony stejná hmotnost propylenglykolu. Po ukončení čištění se čistota zásobního enzymového roztoku zkontroluje SDS-PAGE (elektroforesa na polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným). Absolutní koncentrace enzymu se stanoví titrací aktivních míst trypsinovým inhibitorem typu II-T: vejce krávy od firmy Sigma Chemical Company (St. Louis, Missouri). Změřené faktory konverze ukazují, které změny v molekule enzymu v různých polohách vedou k enzymové variantě se zvýšenou aktivitou na rozpustný substrát pNA při srovnání s přírodním typem.

Při přípravě pro použití se enzymový zásobní roztok eluuje kolonou s nosičem Sephadex-G25 (Pharmacia, Piscataway, New Jersey). Odstraní se tak propylenglykol a vymění se pufr. MES pufr v zásobním roztoku enzymu se vymění za 0,1M Tris pufr (trishydroxymethylaminomethan) obsahující 0,01M chlorid vápenatý a pH se kyselinou chlorovodíkovou upraví na 8,6. Všechny pokusy se

provádějí při pH 8,6 v Tris pufru udržovaném na 25 °C.

V následujících příkladech budou charakterizovány enzymové varianty.

#### Příklad 4

##### Příprava modelového povrchu

Jako nosič pro kovalentní připojení substrátu sAAPF-pNA získaného od firmy Bachem, Inc. (Torrence, Kalifornie) se použije aminopropyl-sklo s kontrolovanou velikostí porů (CPG) získané od firmy CPG Inc. (Fairfield, New Jersey). Reakce se provádí v dimethylsulfoxidu. Jako kondenzační činidlo se použije hydrochlorid 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]karbodiimidu (EDC). Po ukončení reakce (sledováno testem pNA) se nadbytek rozpouštědla odstraní a CPG:sAAPF-pNA se promyje dimethylsulfoxidem (DMSO) a dvakrát předestilovanou vodou. Následuje vysušení v sušárně v proudu dusíku při 70 °C. Reakční schéma a příprava imobilizovaného substrátu se provádí podle Brodeho P.F.III a D.S.Raucha: "Subtilisin BPN': Activity on an Immobilized Substrate", *Langmuir* 8, 1325 (1992); tato práce je zde zahrnuta jako odkaz.

CPG povrch má  $62\,000 \pm 7\,000$  pNA molekul/ $\mu\text{m}^2$ . Plocha povrchu  $50,0\text{ m}^2/\text{g}$  uvedená CPG Inc pro CPG se nemění. To ukazuje, že tento postup použitý pro přidání sAAPF-pNA k CPG nepoškozuje porézní strukturu (střední průměr je 48,6 nm).

#### Příklad 5

##### Test hydrolýzy na povrchu

Adsorpce enzymové varianty a hydrolýza peptidu navázaného na CPG se mohou měřit v jediném pokusu použitím CPG:sAAPF-pNA. K baňce, která obsahuje Tris pufr a CPG:sAAPF-pNA, z nichž byly odstraněny plyny, se přidá malý objem zásobního roztoku enzymo-

vé varianty. Tato baňka se třepe 90 minut. Během této doby se třepačka v různých časových intervalech zastavuje - například každé dvě minuty během stadií adsorpční hydrolýzy (např. prvních 20 minut a každých 10 minut ke konci pokusu). CPG:sAAPF-pNA se nechá usadit a odebere se vzorek. Jak experimentální postup tak výpočet adsorpce a hydrolýzy se provedou podle postupu, který popsali Brode a spol: viz shora 1992.

U všech enzymů se sleduje stabilita proti autolýze. Žádný enzym by neměl během pokusu vykazovat znatelné autolytické ztráty. Adsorpce enzymu se tedy může stanovovat měřením vyčerpání roztoku. Rozdíl mezi původní koncentrací enzymové varianty a koncentrací změřenou v každém jednotlivém bodu udává množství adsorbovaného enzymu. Množství pNA hydrolyzovaného z povrchu se změní odečtením absorbance podílu vzorku při 410 nm. Celkové množství hydrolyzovaného pNA se vypočte přidáním množství odebraného jako vzorek a množství zbývajících v baňce. Tato hodnota se opraví odečtením množství pNA, které je hydrolyzováno Tris puforem při pH 8,6, jestliže není přítomen žádný enzym. Tato hydrolýza se pohybuje mezi 7 a 29 % z celkové hydrolýzy podle účinnosti enzymu.

#### Příklad 6

#### Kinetická analýza rozpustného substrátu

Rychlosti hydrolýzy rozpustného substrátu sAAPF-pNA se sledují ze zvýšení absorbance jako funkce času při 410 nm měřením na spektrofotometru DU-70. Koncentrace enzymu se udržuje konstantní. Připraví se vzorek s koncentrací v rozmezí od 6 do 10nM, při čemž koncentrace substrátu se pro každé kinetické stanovení mění od 90 do 700  $\mu$ M sAAPF-pNA. Adsorbce se stanovuje každou vteřinu po dobu 900 vteřin. Tato data se přenesou na Lotus<sup>TM</sup> (Lotus Development Corporation, Cambridge, Massachusetts). Analýza kinetických parametrů se provádí standardní analýzou (Lineweaver Burk), při které data počáteční části analýzy (obvykle první minuta) na lineární regresní křivce dá-

vají  $v_0$ . Data  $v_0$  a  $s_0$  se vynesou standardním inverzním způsobem. Získají se  $K_M$  a  $k_{kat}$ .

V další části jsou uvedeny příklady BPN' variant.

Příklady BPN' variant podle předloženého vynálezu, které mají sníženou adsorpci na substráty vázané na povrch a zvýšenou hydrolýzu substrátů navázaných na povrchu, jsou uvedeny níže v tabulce 2. Při popisu příslušných mutací se původní aminokyselina, která se vyskytuje v přírodní sloučenině, uvádí jako první údaj, číslo polohy této aminokyseliny jako druhý údaj a substituující aminokyselina jako třetí údaj.

#### Tabulka 2

#### Příklady BPN' variant

---

##### Jediná mutace:

Lys213Glu

Ala216Glu

Ala216Asp

Ala216Gly

Ser204Glu

Val203Glu

##### Dvojitá mutace:

Lys213Glu + Tyr217Leu

Ile205Leu + Ala216Glu

Ile205Leu + Ala216Asp

Pro210Ala + Gly215Thr

Lys213Glu + Ala216Glu

Tyr214Phe + Tyr217Asn

Gln206Glu + Ala216Glu

Ala216Glu + Tyr217Leu

Gln206Glu + Tyr217Leu

Gln206Glu + Lys312Glu

Tabulka 2 (pokračování)

---

**Trojí mutace:**

Gln206Pro + Gly211Ala + Ala216Glu

Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu

Ile205Val + Pro210Ala + Lys213Glu

Gln206Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu

Gln206Glu + Lys213Glu + Tyr217Leu

**Čtyři mutace:**

Pro210Ala + Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu

Gln206Glu + Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu

Gln204Glu + Gln206Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu

**Pět mutací:**

Ile205Leu + Pro210Ala + Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu

Ser204Glu + Gln206Glu + Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu

---

Podle jiného provedení předloženého vynálezu se do prostředků užitečných pro čištění rozmanitých povrchů, které potřebují odstranit proteinové znečištění, používá efektivní množství jedné nebo více enzymových variant podle předloženého vynálezu. Mezi tyto čisticí prostředky patří detergentní prostředky pro čištění tvrdých povrchů bez omezení formy (např. kapalně nebo granulované), detergentní prostředky pro čištění látek bez omezení formy (např. granulované a kapalně prostředky nebo prostředky ve formě kostek), prostředky pro mytí nádobí (neomezené pokud jde o formu), orální čisticí prostředky bez omezení formy (např. prostředek pro čištění zubů, zubní pasta a ústní voda), čisticí prostředky pro zubní protézy bez omezení formy (např. kapalně prostředky, tablety) a čisticí prostředky pro čištění kontaktních čoček bez omezení formy (např. kapalina, tableta). Pojem "efektivní množství enzymové varianty" tak, jak se zde používá, znamená takové množství enzymové varianty, které je nutné k dosažení enzymové aktivity nutné pro specifický čisticí prostředek. Tato efektivní množství jsou snadno zji-

stítelná odborníkem z oblasti techniky a závisí na mnoha faktorech, jako je příslušná použitá enzymová varianta, typ čištění, specifické složení čistícího prostředku, zda jde o kapalinu nebo zda jde o suchou formu (např. granule, kostku) a podobně. Čistící prostředky podle předloženého vynálezu s výhodou obsahují 0,0001 až 10 % hmotn. jedné nebo více enzymových variant podle předloženého vynálezu, výhodněji od 0,001 do 1 %, ještě výhodněji od 0,01 do 0,1 % hmotn. Některé příklady různých čistících prostředků, v nichž se mohou používat enzymové varianty podle předloženého vynálezu, jsou zde dále diskutovány podrobněji. Všechny díly, procenta a poměry v tomto spisu jsou hmotnostní, pokud není uvedeno jinak.

Pojem "čistící prostředky určené pro látky" tak, jak se zde používá, znamená čistící prostředky pro tvrdé povrchy, prostředky pro mytí nádobí, orální čistící prostředky, čistící prostředky pro zubní protézy a čistící prostředky pro kontaktní čočky.

Čistící prostředky pro tvrdé povrchy, nádobí a látky: Enzymy podle předloženého vynálezu se mohou používat v jakémkoliv detergentním prostředku, kde je žádoucí vysoké pění a dobré odstraňování nerozpustného substrátu. Enzymové varianty podle předloženého vynálezu se tedy mohou používat s různými konvenčními složkami. Získají se tak úplné čistící prostředky pro tvrdé povrchy, pro mytí nádobí, pro praní látek a podobné. Prostředky mohou existovat ve formě kapalin, granulí, kostek a podobně. Tyto prostředky se mohou vyrábět jako moderní "koncentrované" detergenty, které obsahují až od 30 do 60 % hmotn. povrchově aktivních činidel.

Čistící prostředky podle vynálezu mohou popřípadě obsahovat a s výhodou obsahují různá aniontová, neiontová, obojetná atd. povrchově aktivní činidla. Tato povrchově aktivní činidla jsou v prostředcích typicky přítomna v množstvích od 5 do 35 % hmotn. z celkové hmotnosti prostředku.

Mezi neomezující příklady povrchově aktivních činidel užitečných podle tohoto vynálezu patří konvenční alkyl (s 11 až 18 atomy uhlíku) benzensulfonáty a primární a náhodné alkylsulfáty, sekundární (2,3)alkylsulfáty (s 10 až 18 atomy uhlíku) obecných vzorců  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x(\text{CHOSO}_3^- \text{M}^+)\text{CH}_3$  a  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_y(\text{CHOSO}_3^- \text{M}^+)\text{CH}_2\text{CH}_3$ , v nichž  $x$  a  $(y+1)$  znamenají alespoň číslo 7, s výhodou alespoň 9, a  $\text{M}$  znamená ve vodě rozpustný kation, zvláště kation sodíku, alkylalkoxysulfáty s 10 až 18 atomy uhlíku (zvláště 1 až 5 ethoxysulfáty), alkylalkoxykarboxyláty s 10 až 18 atomy uhlíku (zvláště 1 až 5 ethoxykarboxyláty), alkylpolyglykosidy s 10 až 18 atomy uhlíku a jejich odpovídající sulfatované polyglykosidy,  $\alpha$ -sulfonované estery mastných kyselin s 12 až 18 atomy uhlíku, alkyl a alkylfenolalkoxyláty s 12 až 18 atomy uhlíku (zvláště ethoxyláty a směsné ethoxy/propoxyderiváty), betainy s 12 až 18 atomy uhlíku a sulfobetainy ("sultainy") s 12 až 18 atomy uhlíku, aminoxidy s 10 až 18 atomy uhlíku a podobné. Alkylalkoxysulfáty (AES) a alkylalkoxykarboxyláty (AEC) jsou výhodné pro použití podle vynálezu. Výhodné je také použití těchto povrchově aktivních činidel v kombinaci se shora uvedeným aminoxidovým a/ nebo betainovým nebo sultainovým povrchově aktivním činidlem; závisí to na požadavcích toho, kdo tyto prostředky připravuje. Další konvenčně použitelná povrchově aktivní činidla jsou uvedena ve standardních textech. Mezi zvláště užitečná povrchově aktivní činidla patří N-methylglukamidy s 10 až 18 atomy uhlíku popsané v USA patentu 5 194 639 Connora a spol. z 16. března 1993, který je zde zahrnut jako citace.

V prostředcích podle vynálezu mohou být obsaženy rozmanité jiné složky užitečné v detergentních čistících prostředcích včetně jiných složek, nosičů, hydrotropů, činidel pro opracování, barviv nebo pigmentů, rozpouštědel pro kapalná prostředky atd. Jestliže je žádoucí zvýšit pění, zahrnou se do prostředku podporovatelé pění, jako jsou alkoholamidy s 10 až 16 atomy uhlíku, typicky v množství 1 až 10 % hmotn. Typickými skupinami těchto zesilovačů pění jsou monoethanol a diethanolamidy s 10 až 14 atomy uhlíku. Výhodné je také použití těchto zesilovačů pění s vysoce pěnívými povrchově aktivními činidly, jako

jsou shora uvedené aminoxidy, betainy a sultainy. Jestliže je to žádoucí, mohou se pro dosažení dalšího pění přidávat rozpustné hořečnaté soli, jako je  $MgCl_2$ ,  $MgSO_4$  a podobné, typicky v množstvích od 0,1 do 2 % hmotn.

Kapalné detergentní prostředky mohou obsahovat vodu a další rozpouštědla a nosiče. Vhodnými jsou primární nebo sekundární alkoholy s nízkou molekulovou hmotností, jako například methanol, ethanol, propanol a isopropanol. Monohydroxyalkoholy jsou výhodné pro rozpouštění povrchově aktivních činidel, ale mohou se používat i polyoly, jako polyoly s 2 až 6 atomy uhlíku a 2 až 6 hydroxylovými skupinami (např. 1,3-propandiol, ethylenglykol, glycerin a 1,2-propandiol). Prostředky mohou obsahovat od 5 do 90, s výhodou od 10 do 50 % hmotn. těchto nosičů.

Detergentní prostředky podle vynálezu se s výhodou připravují tak, aby během použití ve vodných čistících postupech měl vodný roztok pH mezi 6,8 a 11,0. Konečné produkty se typicky připravují s tímto rozmezím pH. Mezi způsoby, kterými se reguluje pH na doporučenou hodnotu, patří použití pufrů, alkalí, kyselin atd. Tyto způsoby jsou velmi dobře známy odborníkům z oblasti techniky.

Jestliže se připravují čistící prostředky pro tvrdé povrchy a prostředky pro čištění látek podle předloženého vynálezu, mohou se používat různé stavební složky v množství 5 až 50 % hmotn. Mezi typické stavební složky patří 1 až  $10\mu m$  zeolity, polykarboxyláty, jako citrát a oxidosukcináty, vrstvené křemičitany, fosforečnany a podobné. Další konvenční složky jsou uvedeny v standardních předpisech.

Podobně se mohou v těchto prostředcích používat různé další enzymy, jako jsou celulasy, lipasy, amylasy a proteasy, typicky v množstvích od 0,001 % do 1 % hmotn. Různé čistící prostředky a enzymy pečující o látky jsou dobře známy v oblasti techniky prací detergentních činidel.

V prostředcích se mohou používat různé bělicí sloučeniny, jako jsou peruhličitany, perboritany a podobné, typicky v množstvích od 1 do 15 % hmotn. Jestliže je to žádoucí, tyto prostředky mohou obsahovat také bělicí aktivátory, jako je tetraacetylethylendiamin, nonanoyloxybenzensulfonát a podobné, které jsou také známy z oblasti techniky. Typicky se používají množství od 1 do 10 % hmotn.

V těchto prostředcích se mohou používat různá činidla uvolňující ušpinění, zvláště typu aniontových oligoesterů, různá komplexující činidla, zvláště aminofosfonáty a ethylendiamin-disukcináty, různá činidla odstraňující ušpinění hlinkami, zvláště ethoxylovaný tetraethylenpentin, různá dispergační činidla, zvláště polyakryláty a polyaspartáty, různá zjasňovací činidla, zvláště aniontová zjasňovací činidla, různí potlačovatelé pění, zvláště silikony a sekundární alkoholy, různá činidla pro změkčování látek, zvláště smektitové hlinky, a podobná činidla v rozmezí od 1 do 35 % hmotn. Standardní předpisy a publikované patenty obsahují mnoho podrobných popisů těchto konvenčních materiálů.

V čistících prostředcích podle tohoto vynálezu se mohou používat také stabilizátory enzymů. Mezi takové stabilizátory enzymů patří propylenglykol (s výhodou od 1 do 10 % hmotn.), mravenčan sodný (s výhodou od 0,1 do 1 % hmotn.) a mravenčan vápenatý (s výhodou od 0,1 do 1 % hmotn.).

Pojem "čistící prostředky pro tvrdé povrchy" tak, jak se zde tento pojem používá, znamená kapalně a granulované detergentní prostředky pro čištění tvrdých povrchů, jako jsou podlahy, zdi, obklady koupelen a podobné. Čistící prostředky pro tvrdé povrchy podle předloženého vynálezu obsahují efektivní množství jedné nebo více enzymových variant podle předloženého vynálezu, s výhodou od 0,001 do 10 %, výhodněji od 0,01 do 5, ještě výhodněji od 0,05 do 1 % hmotn. aktivního enzymu z celkové hmotnosti prostředku. Vedle jedné nebo více enzymových variant podle předloženého vynálezu tyto čistící prostředky pro

tvrdé povrchy typicky obsahují povrchově aktivní činidlo a ve vodě rozpustnou maskovací stavební složku. V některých speciálních produktech, jako jsou rozprašovače pro čištění oken, se však někdy povrchově aktivní činidla nepoužívají, protože mohou zanechávat filmový/šmouhovitý zbytek na povrchu skla.

Povrchově aktivní složka, jestliže je přítomna, může být obsažena v množství i jenom 0,1 % hmotn. z celkové hmotnosti prostředku. Typicky však tyto prostředky obsahují od 0,25 do 10, výhodněji od 1 do 5 % hmotn. povrchově aktivního činidla.

Prostředky typicky obsahují od 0,5 do 50 % hmotn. detergentní složky, s výhodou od 1 do 10 % hmotn.

S výhodou by se pH mělo pohybovat v rozmezí od 8 do 12. Pro úpravu pH se mohou, pokud je to nutné, používat konvenční činidla pro úpravu pH, jako je NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> nebo HCl.

V prostředku mohou být obsažena rozpouštědla. Mezi užitečná rozpouštědla patří, ale nejsou na ně omezena, glykolethery, jako je monohexylether diethylenglykolu, monobutylether diethylenglykolu, monobutylether ethylenglykolu, monohexylether ethylenglykolu, monobutylether propylenglykolu a monobutylether diethylenglykolu, a dioly, jako je 2,2,4-trimethyl-1,3-pentandiol a 2-ethyl-1,3-hexandiol. Jestliže se používají, potom jsou tato rozpouštědla přítomna v množství typicky od 0,5 do 15, s výhodou od 3 do 11 % hmotn.

V předložených prostředcích se mohou používat také vysoce těkavá rozpouštědla, jako je isopropanol nebo ethanol, aby se usnadnilo rychlé odpaření prostředku z povrchů, jestliže se povrch po "plné" aplikaci prostředku na povrch neoplachuje. Jestliže se používají, potom jsou těkavá rozpouštědla v prostředku přítomna v množství typicky od 2 do 12 % hmotn.

Provedení čistících prostředků pro tvrdé povrchy podle předloženého vynálezu je ilustrováno následujícími příklady.

## Příklady 7 až 12

## Kapalné čisticí prostředky pro tvrdé povrchy

složka	příklad číslo:					
	7	8	9	10	11	12
Lys213Glu	0,05	0,50	0,02	0,03	0,10	0,03
Ile205Leu + Ala216Asp	-	-	-	-	0,20	0,02
Na <sub>2</sub> DIDA*						
EDTA**	-	-	2,90	2,90	-	-
citrát sodný	-	-	-	-	2,90	2,90
alkylbenzensulfonát						
sodný s 12 at. C	1,95	-	1,95	-	1,95	-
alkylsulfát sodný s						
12 at. C	-	2,20	-	2,20	-	2,20
ethoxysulfát*** sodný						
s 12 at C	-	2,20	-	2,20	-	2,20
dimethylaminoxid s						
12 at C	-	0,50	-	0,50	-	0,50
kumesulfonát sodný	1,30	-	1,30	-	1,30	-
hexylkarbitol***	6,30	6,30	6,30	6,30	6,30	6,30
voda****	doplnit do 100 % hmotn.					

\* N-diethylenglykol-N,N-iminodiacetát dvojsodný

\*\* čtyřsodná sůl ethyldiamindioctové kyseliny

\*\*\* monohexylether diethylenglykolu

\*\*\*\* všechny prostředky mají pH upraveno na hodnotu 7

BPN' varianty uvedené v tabulce 2, mimo jiné, v příkladech 7 až 10 jsou substituovány Lys213Glu s v podstatě podobnými výsledky.

BPN' varianty uvedené v tabulce 2, mimo jiné, v příkladech 11 až 12 jsou substituovány Lys213Glu a Ile205Leu + Ala216Asp s v podstatě podobnými výsledky.

## Příklady 13 až 18

Sprejové prostředky pro čištění tvrdých povrchů a pro odstraňování plísně v domácnosti

složka	příklad číslo:					
	13	14	15	16	17	18
Lys213Glu + Tyr217Leu	0,50	0,05	0,60	0,30	0,20	0,30
Ala216Glu	-	-	-	-	0,30	0,10
oktylsulfát sodný	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
dodecylsulfát sodný	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
hydroxid sodný	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80
křemičitan (sodný)	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
parfém	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
voda	doplnit do 100 % hmotn.					

Produkt má pH asi 7.

BPN' varianty uvedené v tabulce 2, mimo jiné, v příkladech 13 až 16 jsou substituovány Lys213Glu + Tyr217Leu s v podstatě podobnými výsledky.

Jakékoliv kombinace BPN' variant uvedených v tabulce 2, mimo jiné, v příkladech 17 až 18 jsou substituovány Lys213Glu + Tyr217Leu a Ala216Glu s v podstatě podobnými výsledky.

V další části popisu jsou uvedeny prostředky pro mytí nádobí. Prostředky pro mytí nádobí obsahují jednu nebo více enzymových variant podle předloženého vynálezu. Pojem "prostředek pro mytí nádobí" tak, jak se zde používá, znamená všechny formy prostředků pro čištění nádobí včetně, ale bez omezení jenom na ně, granulovaných a kapalných forem. Provedení prostředků pro mytí nádobí podle předloženého vynálezu jsou ilustrována následujícími příklady.

## Příklady 19 až 24

## neoplachujerstředky pro mytí nádobí

složka	příklad číslo:					
	19	20	21	22	23	24
Glu206Pro + Gly211Ala						
+ Ala216Glu	0,05	0,50	0,02	0,40	0,10	0,03
Ile205Leu + Ala216Asp	-	-	-	-	0,40	0,02
N-methylglukamid						
s 12 až 14 at. C	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90
ethoxysulfát s 12						
at. C	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00
2-methylundekanová						
kyselina	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50
ethoxykarboxylát s						
12 at. C	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50
alkoholethoxylát s						
12 at. C	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
aminoxid s 12 at. C	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
kumensulfonát sodný	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
ethanol	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
hořečnatý ion (jako						
chlorid hořečnatý)	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
vápenatý ion (jako						
chlorid vápenatý)	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
voda		doplnit do 100 % hmotn.				

Produkt má pH upraveno na hodnotu 7.

BPN' varianty uvedené v tabulce 2, mimo jiné, v příkladech 19 až 22 jsou substituovány Gln206Pro + Gly211Ala + Ala216Glu s v podstatě podobnými výsledky.

Jakékoliv kombinace BPN' variant uvedených v tabulce 2, mimo jiné, v příkladech 23 až 24 jsou substituovány Gln206Pro + Gly211Ala + Ala216Glu a Ile205Leu + Ala216Asp s v podstatě

podobnými výsledky.

V jiném provedení podle předloženého vynálezu jsou uvedeny prostředky pro čištění látek, které obsahují jednu nebo více enzymových variant podle předloženého vynálezu. Pojem "prostředek pro čištění látek" tak, jak se zde používá, znamená všechny formy detergentních prostředků pro čištění látek včetně, ale bez omezení jenom na ně, granulovaných a kapalných forem a forem ve tvaru kostek.

Granulované prostředky pro čištění látek podle předloženého vynálezu obsahují efektivní množství jedné nebo více enzymových variant podle předloženého vynálezu, s výhodou od 0,001 do 10 % hmotn., výhodněji od 0,005 % do 5 %, výhodněji od 0,01 % do 1 % hmotn. aktivního enzymu z hmotnosti prostředku. Vedle jedné nebo více enzymových variant granulované prostředky pro čištění látek typicky obsahují alespoň jedno povrchově aktivní činidlo, jednu nebo více stavebních složek a v některých případech bělicí činidlo.

Granulované prostředky pro čištění látek podle předloženého vynálezu jsou ilustrovány následujícími příklady.

## Příklady 25 až 28

## Granulované prostředky pro čištění látek

složka	příklad číslo:			
	25	26	27	28
Ala216Asp	0,10	0,20	0,03	0,05
Ala216Gly	-	-	0,02	0,05
lineární alkylbenzensul- fonát s 13 at. C	22,00	22,00	22,00	22,00
fosforečnan (jako trifos- forečnan sodný)	23,00	23,00	23,00	23,00
uhličitan sodný	23,00	23,00	23,00	23,00
křemičitan sodný	14,00	14,00	14,00	14,00
zeolit	8,20	8,20	8,20	8,20
chelatační čindilo (diethy- lentríaminpentaoctová kyselina)	0,40	0,40	0,40	0,40
síran sodný	5,50	5,50	5,50	5,50
voda	doplnit do 100 hmotn.			

BPN' varianty uvedené v tabulce 2, mimo jiné, v příkladech 25 až 26 jsou substituovány Ala216Asp s v podstatě podobnými výsledky.

Jakékoliv kombinace BPN' variant uvedených v tabulce 2, mimo jiné, v příkladech 27 až 28 jsou substituovány Ala216Asp a Ala216Gly s v podstatě podobnými výsledky.

## Příklady 29 až 32

## Granulované prostředky pro čištění látek

složka	příklad číslo:			
	29	30	31	32
Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr 217Leu	0,10	0,20	0,03	0,05
Ile205Val + Pro210Ala + Lys213Glu	-	-	0,02	0,05
alkylbenzensulfonát s 12 at. C	12,00	12,00	12,00	12,00
zeolit A (1 až 10 $\mu\text{m}$ )	26,00	26,00	26,00	26,00
2-butyloktanová kyselina	4,00	4,00	4,00	4,00
sodná sůl sekundárního alkyl- sulfátu s 12 až 14 at. C	5,00	5,00	5,00	5,00
citrát sodný	5,00	5,00	5,00	5,00
optické zjasňovačlo	0,10	0,10	0,10	0,10
síran sodný	17,00	17,00	17,00	17,00
voda	doplnit do 100 hmotn.			

BPN' varianty uvedené v tabulce 2, mimo jiné, v příkladech 29 až 30 jsou substituovány Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu s v podstatě podobnými výsledky.

Jakékoliv kombinace BPN' variant uvedených v tabulce 2, mimo jiné, v příkladech 31 až 32 jsou substituovány Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu a Ile205Val + Pro210Ala + Lys213Glu s v podstatě podobnými výsledky.

Kapalné prostředky pro čištění látek podle předloženého vynálezu obsahují efektivní množství jedné nebo více enzymových variant podle předloženého vynálezu, s výhodou od 0,005 do 5 % hmotn., výhodněji od 0,01 % do 1 % hmotn. aktivního enzymu z hmotnosti prostředku. Tyto kapalné prostředky pro čištění látek typicky dále obsahují aniontové povrchově aktivní činidlo, mastnou kyselinu, ve vodě rozpustnou detergentní stavební složku a vodu.

Kapalné prostředky pro čištění látek podle předloženého vynálezu jsou ilustrovány následujícími příklady.

Příklady 33 až 37

Kapalné prostředky pro čištění látek

složka	příklad číslo:				
	33	34	35	36	37
Pro210Ala + Gly215Thr	0,05	0,03	0,30	0,03	0,10
Pro210Ala + Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu	-	-	-	0,01	0,20
alkylsulfát sodný s 12 až 14 at. C	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
2-butyloktanová kyselina	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
citrát sodný	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
alkoholethoxylát s 10 at. C	13,00	13,00	13,00	13,00	13,00
monoethanolamin	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
voda/propylenglykol/ethanol (100:1:1)	doplnit do 100 % hmotn.				

BPN' varianty uvedené v tabulce 2, mimo jiné, v příkladech 33 až 35 jsou substituovány Pro210Ala + Gly215Thr s v podstatě podobnými výsledky.

Jakékoliv kombinace BPN' variant uvedených v tabulce 2, mimo jiné, v příkladech 36 až 37 jsou substituovány Pro210Ala + Gly215Thr a Pro210Ala + Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu s v podstatě podobnými výsledky.

Prostředky pro čištění látek ve tvaru kostky podle předloženého vynálezu vhodné pro ruční praní ušpiněných látek obsahují efektivní množství jedné nebo více enzymových variant podle předloženého vynálezu, s výhodou od 0,001 do 10 % hmotn., výhodněji od 0,01 % do 1 % hmotn. z hmotnosti prostředku.

Prostředky pro čištění látek ve tvaru kostky podle předloženého vynálezu jsou ilustrovány následujícími příklady.

Příklady 38 až 41

Prostředky pro čištění látek ve formě kostky

složka	příklad číslo:			
	38	39	40	41
Lys213Glu + Ala216Glu	0,3	-	0,1	0,02
Tyr214Phe + Tyr217As	-	-	0,4	0,03
alkylsulfát sodný s 12 až 16 at. C	20,00	20,00	20,0	20,00
N-methylglukamid s 12 až 14 at. C	5,00	5,00	5,0	5,00
alkylbenzensulfonát sodný s 11 až 13 at. C	10,00	10,00	10,0	10,00
uhličitan sodný	25,0	25,0	25,0	25,00
difosforečnan sodný	7,0	7,0	7,0	7,00
trifosforečnan sodný	7,0	7,0	7,0	7,00
zeolit A (0,1 až 10 $\mu\text{m}$ )	5,0	5,0	5,0	5,00
karboxymethylcelulosa	0,2	0,2	0,2	0,20
polyakrylát (mol.hmotn.1400)	0,2	0,2	0,2	0,20
kokosový monoethanolamid	5,0	5,0	5,0	5,00
zjasňovací činidlo, parfém	0,2	0,2	0,2	0,20
síran vápenatý	1,0	1,0	1,0	1,00
síran hořečnatý	1,0	1,0	1,0	1,00
voda	4,0	4,0	4,0	4,00
plnidlo*	doplnit do 100 % hmotn.			

\* Může být vybráno z vhodných materiálů, jako je  $\text{CaCO}_3$ , talek, hlinka, křemičitany a podobné.

BPN' varianty uvedené v tabulce 2, mimo jiné, v příkladech 38 až 39 jsou substituovány Lys213Glu + Ala216Glu s v podstatě podobnými výsledky.

Jakékoliv kombinace BPN' variant uvedených v tabulce 2, mimo jiné, v příkladech 40 až 41 jsou substituovány Lys213Glu + Ala216Glu a Tyr214Phe + Tyr217Asn s v podstatě podobnými výsledky.

Vedle shora uvedených čistících prostředků pro tvrdé povrchy, prostředků pro mytí nádobí a prostředků pro čištění látek se může do rozmanitých jiných čistících prostředků, kde je žádána hydrolýza nerozpustného substrátu, zahrnout jedna nebo více enzymových variant podle předloženého vynálezu. Tyto další čistící prostředky zahrnují, ale nejsou omezeny jenom na ně, orální čistící prostředky, prostředky pro čištění zubních protéz a prostředky pro čištění kontaktních čoček.

V jiném provedení podle předloženého vynálezu se do prostředků užitečných pro odstraňování proteinových znečištěnin ze zubů nebo zubních protéz zahrne jedna nebo více enzymových variant podle předloženého vynálezu. Pojem "orální čistící prostředky" tak, jak je zde používán, znamená prostředky pro čištění zubů, zubní pasty, zubní gely, zubní prášky, ústní vody, ústní spreje, ústní gely, žvýkací gumy, pastilky, sáčky, tablety, biogely, profylaktické pasty, zubní léčivé roztoky a podobné. Orální čistící prostředky podle předloženého vynálezu obsahují od 0,0001 do 20 % hmotn. jedné nebo více enzymových variant podle předloženého vynálezu, výhodněji od 0,001 do 10 % hmotn., ještě výhodněji od 0,01 % do 5 % hmotn. z hmotnosti prostředku, a farmaceuticky přijatelný nosič. Pojem "farmaceuticky přijatelný" tak, jak se zde používá, znamená, že léčivá látka, léčivý přípravek nebo inertní složky, které tento pojem popisuje, jsou vhodné pro použití v kontaktu s tkáněmi člověka a nižších živočichů bez nepatřičné toxicity, neslučitelnosti, nestability, dráždění, alergické odpovědi a podobných, při odůvodněném poměru prospěch/riziko.

Farmaceuticky přijatelné orální čistící nosné složky orálních čistících složek budou v orálních čistících prostředcích typicky obvykle obsaženy v množství od 50 do 99,99 % hmotn.,

s výhodou 65 až 99,99, výhodněji 65 až 99 % hmotn. z celkové hmotnosti prostředku.

Farmaceuticky přijatelné nosné složky a případné složky, které mohou být zahrnuty v orálních čistících prostředcích podle předloženého vynálezu, jsou dobře známy odborníkům z oblasti techniky. Rozmanité typy prostředků, nosných složek a případných složek užitečných pro orální čistící prostředky jsou popsány v USA patentu 5 096 700 Seibela, vydaném 17. března 1992, v USA patentu 5 028 414 Sampatkumara, vydaném 2. července 1991, a v USA patentu 5 028 415 Benedicta, Bushe a Sunberga, vydaném 2. července 1991. Všechny jsou zde uvedeny jako citace.

Provedení orálních čistících prostředků podle předloženého vynálezu je ilustrováno následujícími příklady.

## Příklady 42 až 45

## Prostředek pro čištění zubů

složka	příklad číslo:			
	42	43	44	45
Ile205Leu + Pro210Ala + Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu	2,000	3,500	1,500	2,000
sorbitol (70% vodný roztok)	35,000	35,000	35,000	35,000
PEG-6* (polyethylen glykol	1,000	1,000	1,000	1,000
křemičitanové dentální** abrasivo	20,000	20,000	20,000	20,000
fluorid sodný	0,243	0,243	0,243	0,243
oxid titaničitý	0,500	0,500	0,500	0,500
sodná sůl sacharinu	0,286	0,286	0,286	0,286
alkylsulfát sodný (27,9% vodný roztok)	4,000	4,000	4,000	4,000
ochucovací činidlo	1,040	1,040	1,040	1,040
karboxyvinylový*** po- lymer	0,300	0,300	0,300	0,300
karegenan****	0,800	0,800	0,800	0,800
voda	doplnit do 100 % hmotn.			

\* PEG-6 znamená polyethylenglykol s mol. hmotn. 600.

\*\* Vysrážený oxid křemičitý identifikovaný jako Zeodent 119 od J.M.Hubera.

\*\*\* Carbopol od B.F.Goodrich Chemical Company.

\*\*\*\* Karagenan Iota od Hercules Chemical company.

BPN' varianty uvedené v tabulce 2, mimo jiné, v příkladech 42 až 45 jsou substituovány Ile205Leu + Pro210Ala + Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu s v podstatě podobnými výsledky.

Příklady 46 až 49  
Prostředek ústní vody

složka	příklad číslo:			
	46	47	48	49
Ala216Gly	3,00	7,50	1,00	5,00
ADA 40 alkohol	8,00	8,00	8,00	8,00
ochucovací činidlo	0,08	0,08	0,08	0,08
emulgační čindilo	0,08	0,08	0,08	0,08
fluorid sodný	0,05	0,05	0,05	0,05
glycerin	10,00	10,00	10,00	10,00
sladidlo	0,02	0,02	0,02	0,02
kyselina benzoová	0,05	0,05	0,05	0,05
hydroxid sodný	0,20	0,20	0,20	0,20
barvivo	0,04	0,04	0,04	0,04
voda	doplnit do 100 % hmotn.			

BPN' varianty uvedené v tabulce 2, mimo jiné, v příkladech 46 až 49 jsou substituovány Ala216Gly s v podstatě podobnými výsledky.

## Příklady 50 až 53

## Prostředek ve formě pastilky

složka	příklad číslo:			
	50	51	52	53
Tyr214Phe + Tyr217Asn	0,01	0,03	0,10	0,02
sorbitol	17,50	17,50	17,50	17,50
manitol	17,50	17,50	17,50	17,50
škrob	13,60	13,60	13,60	13,60
sladidlo	1,20	1,20	1,20	1,20
ochucovací činidlo	11,70	11,70	11,70	11,70
barvivo	0,10	0,10	0,10	0,10
voda	doplnit do 100 % hmotn.			

BPN' varianty uvedené v tabulce 2, mimo jiné, v příkladech 50 až 53 jsou substituovány Tyr214Phe + Tyr217Asn s v podstatě podobnými výsledky.

## Příklady 54 až 57

## Prostředek ve formě žvýkačky

složka	příklad číslo:			
	54	55	56	57
Ile205Val + Pro210Ala				
+ Lys213Glu	0,03	0,02	0,10	0,05
krystaly sorbitolu	38,44	38,40	38,40	38,40
základ přírodní gumy*				
Paloja-T	20,00	20,00	20,00	20,00
sorbitol (70% vodný roztok)	22,00	22,00	22,00	22,00
manitol	10,00	10,00	10,00	10,00
glycerin	7,56	7,56	7,56	7,56
ochucovací činidlo	1,00	1,00	1,00	1,00

\* dodáván L.A.Dreyfus Company

BPN' varianty uvedené v tabulce 2, mimo jiné, v příkladech 54 až 57 jsou substituovány Ile205Val + Pro210Ala + Lys213Glu s v podstatě podobnými výsledky.

V jiném provedení podle předloženého vynálezu jsou uvedeny prostředky pro čištění zubních protéz mimo ústní dutinu, které obsahují jednu nebo více enzymových variant podle předloženého vynálezu. Tyto prostředky pro čištění zubních protéz obsahují efektivní množství jedné nebo více enzymových variant podle předloženého vynálezu, s výhodou od 0,0001 do 50 % hmotn. jedné nebo více enzymových variant podle předloženého vynálezu, výhodněji od 0,001 % do 35 %, ještě výhodněji od 0,01 % do 20 % hmotn. z hmotnosti prostředku, a nosič pro čištění zubní protézy. V oblasti techniky jsou známy různé formy prostředků pro čištění zubních protéz, jako jsou efervescentní tablety a podobné (viz například USA patent 5 055 305 Younga, který je zde zahrnut jako citace). Obvykle obsahují jednu nebo více enzymových variant podle předloženého vynálezu pro odstraňování proteinových skvrn ze zubních protéz.

Provedení prostředku pro čištění zubních protéz podle předloženého vynálezu je ilustrováno následujícími příklady.

## Příklady 58 až 61

## Dvouvrstvá efervescentní tableta pro čištění zubních protéz

složka	příklad číslo:			
	58	59	60	61
kyselá vrstva:				
Ala216Glu	1,0	1,5	0,01	0,05
kyselina vinná	24,0	24,0	24,00	24,00
uhličitan sodný	4,0	4,0	4,00	4,00
kyselina sulfamová	10,0	10,0	10,00	10,00
PEG 20,000	4,0	4,0	4,00	4,00
hydrogenuhlíčan sodný	24,5	24,5	24,50	24,50
persíran draselný	15,0	15,0	15,00	15,00
hydrogendifosforečnan				
sodný	7,0	7,0	7,00	7,00
pyrogenní oxid křemičitý	2,0	2,0	2,00	2,00
TAED*	7,0	7,0	7,00	7,00
ricinoleylsulfosukcinát	0,5	0,5	0,50	0,50
ochucovací činidlo	1,0	1,0	1,00	1,00
alkalická vrstva:				
monohydrát perboritanu				
sodného	32,0	32,0	32,00	32,00
hydrogenuhlíčan sodný	19,0	19,0	19,00	19,00
EDTA	3,0	3,0	3,00	3,00
trifosforečnan sodný	12,0	12,0	12,00	12,00
PEG 20,000	2,0	2,0	2,00	2,00
persíran draselný	26,0	26,0	26,00	26,00
uhličitan sodný	2,0	2,0	2,00	2,00
pyrogenní oxid křemičitý	2,0	2,0	2,00	2,00
barvivo/ochucovací činidlo	2,0	2,0	2,00	2,00

\* Tetraacetylethylendiamin

BPN' varianty uvedené v tabulce 2, mimo jiné, v příkladech 58 až 61 jsou substituovány Ala216Glu s v podstatě podobnými

výsledky.

V jiném provedení podle předloženého vynálezu čisticí prostředky pro kontaktní čočky obsahují jednu nebo více enzymových variant podle předloženého vynálezu. Tyto prostředky pro čištění kontaktních čoček obsahují efektivní množství jedné nebo více enzymových variant podle předloženého vynálezu, s výhodou od 0,01 do 50 % hmotn. jedné nebo více enzymových variant podle předloženého vynálezu, výhodněji od 0,01 % do 20 %, ještě výhodněji 1 až 5 % hmotn. z hmotnosti prostředku, a nosič pro čištění kontaktních čoček. V oblasti techniky jsou známy různé formy prostředků pro čištění kontaktních čoček, jako jsou tablety, kapaliny a podobné (viz například USA patent 4 863 627 Daviese, Meakena a Reese, vydaný 5. září 1989, USA patent číslo Re 32 672 Hutha, Lama a Kiraie, znovu vydaný 24. května 1988, USA patent 4 690 493 Schäfera, vydaný 2. září 1986, USA patent 4 690 793 Ogunbiyiho a Smithe, vydaný 1. září 1987, USA patent 4 614 549 Ogunbiyiho, Reidhammera a Smithe, vydaný 30. září 1986, a USA patent 4 285 738 Ogata, vydaný 25. srpna 1981, všechny jsou zde zahrnuty jako citace). Obvykle obsahují jednu nebo více enzymových variant podle předloženého vynálezu pro odstraňování proteinových skvrn z kontaktních čoček.

Provedení prostředku pro čištění kontaktních čoček podle předloženého vynálezu je ilustrováno následujícími příklady.

## Příklady 62 až 65

## Enzymatický čisticí roztok pro kontaktní čočky

složka	příklad číslo:			
	62	63	64	65
Ile205Leu + Ala216Asp	0,01	0,5	0,1	2,0
glukosa	50,00	50,0	50,0	50,0
neiontové povrchově aktivní činidlo (kopolymer polyoxyethylen/poly- oxypropylen	2,00	2,0	2,0	2,0
aniontové povrchově aktivní činidlo	1,00	1,0	1,0	1,0
chlorid sodný	1,00	1,0	1,0	1,0
borax	0,30	0,3	0,3	0,3
voda	do 100 % hmotn.			

BPN' varianty uvedené v tabulce 2, mimo jiné, v příkladech 62 až 65 jsou substituovány Ile205Leu + Ala216Asp s v podstatě podobnými výsledky.

I když je tento vynález popsán příslušnými provedeními, odborníkům v oblasti techniky bude zřejmé, že lze udělat různé změny a modifikace tohoto vynálezu, aniž by se tím odchýlili od ducha a rozsahu tohoto vynálezu. Připojené nároky jsou myšleny tak, že pokrývají všechny takové modifikace, které jsou v rozsahu tohoto vynálezu.

## P A T E N T O V É   N Á R O K Y

1. Subtilisinové BPN' varianty se sníženou adsorpcí a zvýšenou hydrolyzou obsahující přírodní aminokyselinovou sekvenci, která je substituována v jedné nebo více polohách z poloh 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219 a 220, při čemž

substituující aminokyselinou pro polohu 199 je Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 200 je His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 201 je Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 202 je Pro, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 203 je Met, Cys, His, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 204 je Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 205 je Leu, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 206 je Pro, Asn nebo Ser,

substituující aminokyselinou pro polohu 207 je Asp nebo Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 208 je Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 209 je Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 210 je Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 211 je Ala, Pro, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 212 je Gln, Ser, Asp nebo Glu,

791-96  
 ÚRAD  
 OMSKOVHO  
 ASTINISV

15. III. 96

01500

7 4 5 6 7

1.2.

substituující aminokyselinou pro polohu 213 je Trp, Phe, Tyr, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 214 je Phe, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Pro, Gly, Gln, Asn, Asp nebo Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 215 je Thr, Pro, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 216 je His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 218 je Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 219 je Pro, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu a

substituující aminokyselinou pro polohu 220 je Pro, Gly, Gln, Asn, Asp nebo Glu,

při čemž tato BPN' varianta má sníženou adsorpci na nerozpustný substrát a zvýšenou hydrolýzu nerozpustného substrátu při srovnání s přírodním subtilisinovým BPN'.

2. Subtilisinové BPN' varianty se sníženou adsorpcí a zvýšenou hydrolýzou podle nároku 1, v nichž

substituující aminokyselinou pro polohu 206 je Asn nebo Ser,

substituující aminokyselinou pro polohu 211 je Pro, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 214 je Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Pro, Gly, Gln, Asn, Asp nebo Glu a

substituující aminokyselinou pro polohu 215 je Pro, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu.

3. Subtilisinové BPN' varianty se sníženou adsorpcí a zvýšenou hydrolýzou podle nároku 2, které jsou v poloze 216 substituovány Ala.

4. Subtilisinové BPN' varianty se sníženou adsorpcí a zvýšenou hydrolýzou podle nároku 2, v nichž substituující ami-

nokyselinou pro kteroukoliv z poloh 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 219 a 220 je Asp nebo Glu a substituující aminokyselinou pro polohu 204 nebo 208 je Glu, při čemž k substituci s výhodou dochází v jedné nebo více polohách z poloh 199, 200, 201, 202, 205, 207, 208, 209, 210, 211, 212 nebo 215, výhodněji v jedné nebo více polohách z poloh 200, 201, 202, 205 nebo 207.

5. Subtilisinové BPN' varianty se sníženou adsorpcí a zvýšenou hydrolyzou podle nároku 1, s jednou substitucí aminokyseliny, kterou je

Glu za Lys v poloze 213,  
Glu za Ala v poloze 216,  
Asp za Ala v poloze 216,  
Glu za Ser v poloze 204 nebo  
Glu za Val v poloze 203.

6. Subtilisinové BPN' varianty se sníženou adsorpcí a zvýšenou hydrolyzou obsahující přírodní aminokyselinovou sekvenci, která je substituována ve dvou nebo více polohách z poloh 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219 a 220, při čemž

substituující aminokyselinou pro polohu 199 je Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,  
substituující aminokyselinou pro polohu 200 je His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,  
substituující aminokyselinou pro polohu 201 je Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,  
substituující aminokyselinou pro polohu 202 je Pro, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,  
substituující aminokyselinou pro polohu 203 je Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,  
substituující aminokyselinou pro polohu 204 je Asp nebo Glu,  
substituující aminokyselinou pro polohu 205 je Leu,

Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp  
nebo Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 206 je Pro,  
Asn, Ser, Asp nebo Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 207 je Asp  
nebo Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 208 je Pro,  
Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 209 je Ile,  
Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp  
nebo Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 210 je Ala,  
Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 211 je Ala,  
Pro, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 212 je Gln,  
Ser, Asp nebo Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 213 je Trp,  
Phe, Tyr, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro,  
Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 214 je Phe,  
Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln,  
Asn, Ser, Asp nebo Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 215 je Thr,  
Pro, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 216 je His,  
Thr, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 217 je Leu,  
Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Thr, Pro, Gly, Gln, Asn,  
Ser, Asp nebo Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 218 je Gln,  
Ser, Asp nebo Glu,

substituující aminokyselinou pro polohu 219 je Pro,  
Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu a

substituující aminokyselinou pro polohu 220 je Pro,  
Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,

při čemž tato BPN' varianta má sníženou adsorpci na neroz-

pustný substrát a zvýšenou hydrolýzu nerozpustného substrátu při srovnání s přírodním subtilisinovým BPN'.

7. Subtilisinové BPN' varianty se sníženou adsorpcí a zvýšenou hydrolýzou podle nároku 6 se dvěma substitucemi aminokyselin.
  
8. Subtilisinové BPN' varianty se sníženou adsorpcí a zvýšenou hydrolýzou podle nároku 7 se dvěma substitucemi aminokyselin, kterými jsou substituce  
 Ala za Pro v poloze 210 a Thr za Gly v poloze 215,  
 Phe za Tyr v poloze 214 a Asn za Tyr v poloze 217,  
 Glu za Gln v poloze 206 a Glu za Ala v poloze 216,  
 Glu za Ala v poloze 216 a Leu za Tyr v poloze 217,  
 Glu za Gln v poloze 206 a Leu za Tyr v poloze 217,  
 Glu za Gln v poloze 206 a Glu za Lys v poloze 213,  
 Glu za Lys v poloze 213 a Leu za Tyr v poloze 217,  
 Leu za Ile v poloze 205 a Glu za Ala v poloze 216 nebo  
 Leu za Ile v poloze 205 a Asp za Ala v poloze 216.
  
9. Subtilisinové BPN' varianty se sníženou adsorpcí a zvýšenou hydrolýzou podle nároku 7, v nichž  
 substituující aminokyselinou pro polohu 206 je Asn nebo Ser,  
 substituující aminokyselinou pro polohu 210 je Gly, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,  
 substituující aminokyselinou pro polohu 211 je Pro, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,  
 substituující aminokyselinou pro polohu 214 je Leu, Ile, Val, Met, Cys, Ala, His, Pro, Gly, Gln, Asn, Asp nebo Glu a  
 substituující aminokyselinou pro polohu 215 je Pro, Gln, Asn, Ser, Asp nebo Glu,  
 při čemž k substituci s výhodou dochází ve dvou nebo více polohách z poloh 199, 200, 201, 202, 205, 207, 208, 209, 210, 211, 212 nebo 215, výhodněji ve dvou nebo více polohách z poloh 200, 201, 202, 205 nebo 207.

10. Subtilisinové BPN' varianty se sníženou adsorpcí a zvýšenou hydrolýzou podle nároku 9, v nichž substituující aminokyselinou pro kteroukoliv polohu z poloh 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219 a 220 je Asp nebo Glu.
11. Subtilisinové BPN' varianty se sníženou adsorpcí a zvýšenou hydrolýzou podle nároku 10 se substitucí Glu za Lys v poloze 213 a Glu za Ala v poloze 216.
12. Subtilisinové BPN' varianty se sníženou adsorpcí a zvýšenou hydrolýzou podle nároku 6 se třemi substitucemi aminokyselin.
13. Subtilisinové BPN' varianty se sníženou adsorpcí a zvýšenou hydrolýzou podle nároku 12 se třemi substitucemi aminokyselin, kterými jsou substituce  
Pro za Gln v poloze 206, Ala za Gly v poloze 211 a Glu za Ala v poloze 216,  
Val za Ile v poloze 205, Ala za Pro v poloze 210 a Glu za Lys v poloze 213,  
Glu za Gln v poloze 206, Glu za Ala v poloze 216 a Leu za Tyr v poloze 217,  
Glu za Gln v poloze 206, Glu za Lys v poloze 213 a Leu za Tyr v poloze 217 nebo  
Glu za Lys v poloze 213, Glu za Ala v poloze 216 a Leu za Tyr v poloze 217.
14. Subtilisinové BPN' varianty se sníženou adsorpcí a zvýšenou hydrolýzou podle nároku 6 se čtyřmi nebo pěti substitucemi aminokyselin.
15. Subtilisinové BPN' varianty se sníženou adsorpcí a zvýšenou hydrolýzou podle nároku 14 se čtyřmi substitucemi aminokyselin, kterými jsou substituce  
Ala za Pro v poloze 210, Glu za Lys v poloze 213, Glu za Ala v poloze 216 a Leu za Tyr v poloze 217,

Glu za Gln v poloze 206, Glu za Lys v poloze 213, Glu za Ala v poloze 216 a Leu za Tyr v poloze 217 nebo  
Glu za Ser v poloze 204, Glu za Gln v poloze 206, Glu za Ala v poloze 216 a Leu za Tyr v poloze 217.

16. Subtilisinové BPN' varianty se sníženou adsorpcí a zvýšenou hydrolýzou podle nároku 14 s pěti substitucemi aminokyselin, kterými jsou substituce  
Leu za Ile v poloze 205, Ala za Pro v poloze 210, Glu za Lys v poloze 213, Glu za Ala v poloze 216 a Leu za Tyr v poloze 217 nebo  
Glu za Ser v poloze 204, Glu za Gln v poloze 206, Glu za Lys v poloze 213, Glu za Ala v poloze 216 a Leu za Tyr v poloze 217.
17. Čistící prostředek vybraný ze skupiny sestávající z čistícího prostředku pro tvrdé plochy, prostředku pro mytí nádobí, orálního čistícího prostředku, prostředku pro čištění zubních protéz a prostředku pro čištění kontaktních čoček, v y z n a č u j í c í s e t í m, že tento čistící prostředek obsahuje subtilisinovou BPN' variantu se sníženou adsorpcí a zvýšenou hydrolýzou podle nároku 1, 7, 12 nebo 14 a nosič čistícího prostředku.
18. Prostředek pro čištění tvrdých ploch, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje subtilisinovou BPN' variantu se sníženou adsorpcí a zvýšenou hydrolýzou podle nároku 1, 7, 12 nebo 14 a nosič čistícího prostředku pro tvrdé plochy.
19. Gen mutantu BPN' kodující subtilisinové BPN' varianty se sníženou adsorpcí a zvýšenou hydrolýzou podle nároku 1, 7, 12 nebo 14.

Zastupuje: