



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 332 915**

51 Int. Cl.:  
**C11D 3/386** (2006.01)  
**C12N 9/54** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05015947 .4**  
96 Fecha de presentación : **23.10.1998**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1624050**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.02.2006**

54 Título: **Variantes de proteasa con múltiples sustituciones.**

30 Prioridad: **23.10.1997 US 956323**  
**23.10.1997 US 956324**  
**23.10.1997 US 956564**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**15.02.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**15.02.2010**

73 Titular/es: **GENENCOR INTERNATIONAL, Inc.**  
**925 Page Mill Road**  
**Palo Alto, California 94304, US**  
**The Procter and Gamble Company**

72 Inventor/es: **Schellenberger, Volker;**  
**Kellis, James T, Jr.;**  
**Paech, Christian;**  
**Nadherny, Joanne;**  
**Naki, Donald P.;**  
**Poulose, Ayrookaran J.;**  
**Collier, Katherine D.;**  
**Caldwell, Robert M. y**  
**Baek, André C.**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 332 915 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Variantes de proteasa con múltiples sustituciones.

5 **Antecedentes de la invención**

Las serina proteasas son un subgrupo de carbonil hidrolasas. Comprenden una clase diversa de enzimas que tienen una amplia variedad de especificidades y funciones biológicas. Stroud, R., *Sci. Amer.*, 131: 74-88. A pesar de su diversidad funcional, la maquinaria catalítica de las serina proteasas se ha enfocado a al menos dos familias genéticamente distintas de enzimas: 1) las subtilisinas y 2) las serina proteasas bacterianas homólogas y relacionadas con quimiotripsina de mamífero (p. ej., tripsina y tripsina de *S. gresius*). Estas dos familias de serina proteasas presentan mecanismos de catálisis notablemente similares. Kraut, J. (1977), *Annu. Rev. Biochem.*, 46:331-358. Además, aunque la estructura primaria no está relacionada, la estructura terciaria de estas dos familias de enzimas lleva en ambas una tríada catalítica conservada de aminoácidos que consiste en serina, histidina y aspartato.

Las subtilisinas son serina proteasas (PM aprox. 27.500) que son segregadas en grandes cantidades de una amplia variedad de especies de *Bacillus* y otros microorganismos. La secuencia de proteína de la subtilisina se ha determinado de al menos 9 especies diferentes de *Bacillus*. Markland, F.S., y col. (1983), *Hoppe-Seyler's Z., Physiol. Chem.*, 364: 1537-1540. Se ha publicado la estructura cristalográfica tridimensional de las subtilisinas de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus lichenilorimis* y varias variantes naturales de *B. lentus*. Estos estudios indican que aunque la subtilisina no está genéticamente relacionada con las serina proteasas de mamíferos, tiene una estructura del sitio activo similar. Las estructuras cristalinas de rayos X de subtilisinas que contienen inhibidores peptídicos covalentemente unidos (Robertus, J.D., y col. (1972), *Biochemistry*, 11: 2439-2449) o complejos del producto (Robertus, J.D., y col. (1976), *J. Biol. Chem.*, 251: 1097-1103) también han proporcionado información relacionada con el sitio activo y la hendidura de unión del sustrato putativo de la subtilisina. Además, se ha llevado a cabo la mutagénesis específica de sitio extensiva (Wells y Estell (1988) *TIBS* 13: 291-297).

El documento WO95/10615 describe variantes de proteasas subtilisina que tiene mejores propiedades, incluyendo un mutante específico que tiene las sustituciones N76D/S103A1V104I.

El documento WO91/00345 propone la hipótesis de que el rendimiento de lavado de una proteasa subtilisina se puede mejorar moviendo su punto isoeléctrico hacia el pH de las aguas madre.

35 **Resumen de la invención**

La presente invención proporciona una variante de la proteasas subtilisina 309 o subtilisina PB92, que comprende el conjunto de sustituciones de aminoácidos

40 V4E/N76D/S103A/V104I

en las posiciones de restos que corresponden a las de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, en el que dicha variante de proteasa tiene un mejor rendimiento de lavado comparado con la subtilisina 309 o subtilisina PB92 en un sistema de concentración baja de detergente.

45 La invención también proporciona un procedimiento para mejorar el rendimiento de lavado de una proteasa subtilisina de *Bacillus lentus*, tal como la proteasa subtilisina 309 o subtilisina PB92, que comprende introducir un conjunto de sustituciones de los aminoácidos

50 V4E/N76D/S103A/V104I

en las posiciones de restos que corresponden a las de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, para generar una proteasa variante, en el que dicha proteasa variante tiene un mejor rendimiento de lavado comparado con dicha proteasa subtilisina de *Bacillus lentus* en un sistema de concentración baja de detergente.

55 La variante de proteasa puede comprender el conjunto de sustituciones:

V4E/N76D/S103A/V104I/Q206E;

60 V4E/N76D/S103A/V104I/S188E; o

V4E/N76D/S103A/V104I/A158E.

La invención también proporciona un ADN que codifica variantes de proteasa como se han descrito antes, así como un vector de expresión que contiene dicha secuencia de ADN, y una célula huésped transformada con dicho vector de expresión, así como procedimientos para generarlo.

La invención también proporciona una composición de limpieza o una composición para tratar un producto textil, que comprende la variante de proteasa de la invención.

### Breve descripción de las figuras

Figuras 1 A-C. Representan el ADN y la secuencia de aminoácidos de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* y un mapa de restricción parcial de este gen.

Figura 2. Representa los restos de aminoácidos conservados entre las subtilisinas de *Bacillus amyloliquefaciens* (BPN<sup>1</sup>) y *Bacillus lentus* (tipo salvaje).

Figuras 3A y 3B. Representan la secuencia de aminoácidos de 4 subtilisinas. La línea superior representa la secuencia de aminoácidos de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* (denominada a veces también subtilisina BPN<sup>1</sup>). La segunda línea representa la secuencia de aminoácidos de la subtilisina de *Bacillus subtilis*. La tercera línea representa la secuencia de aminoácidos de subtilisina de *B. licheniformis*. La cuarta línea representa la secuencia de aminoácidos de subtilisina de *Bacillus lentus* (también denominada subtilisina 309 en el documento PCT WO89/06276). El símbolo indica la ausencia de restos de aminoácidos específicos comparado con la subtilisina BPN<sup>1</sup>.

### Descripción detallada de la invención

Las proteasas son carbonil hidrolasas que en general actúan para escindir enlaces peptídicos de proteínas o péptidos. Tal como se usa en el presente documento, “proteasa” significa una proteasa natural o una proteasa recombinante.

En el presente documento se describen enzimas proteasas que son variantes de proteasas subtilisinas no naturales, que tienen una actividad proteolítica, estabilidad, especificidad de sustrato, perfil de pH y/o características de rendimiento diferentes comparadas con el precursor de la proteasa subtilisina de la cual deriva la secuencia de aminoácidos de la variante. Específicamente, dichas variantes tienen una secuencia de aminoácidos que no se encuentra en la naturaleza, que se obtiene por sustitución de una pluralidad de restos de aminoácidos de una proteasa precursora con diferentes aminoácidos. La proteasa precursora puede ser una proteasa natural o una proteasa recombinante.

A lo largo de esta memoria descriptiva se hace referencia a diferentes aminoácidos mediante los códigos de una y tres letras habituales. Dichos códigos están identificados en Dale, M.W. (1989), Molecular Genetics of Bacteria, John Wiley & Sons, Ltd., Apéndice B.

Las variantes de proteasa útiles en el presente documento se obtienen de la subtilisina de *Bacillus lentus*. Más preferiblemente, las variantes de proteasa se obtienen de la subtilisina PB92 y/o subtilisina 309.

Las subtilisinas son proteasas bacterianas o fúngicas que en general actúan para escindir enlaces peptídicos de proteínas o péptidos. Tal como se usa en el presente documento, “subtilisina” significa una subtilisina natural o una subtilisina recombinante. Se sabe que una serie de subtilisinas naturales son producidas y a menudo secretadas por diferentes especies microbianas. Las secuencias de aminoácidos de los miembros de esta serie no son completamente homólogas. Sin embargo, las subtilisinas de esta serie presentan el mismo tipo o similar de actividad proteolítica. Esta clase de serina proteasas comparten una secuencia común de aminoácidos que definen una tríada catalítica que las distingue de la clase de serina proteasas relacionadas con quimiotripsina. Tanto las subtilisinas como las serina proteasas relacionadas con quimiotripsina tienen una tríada catalítica que comprende aspartato, histidina y serina. En las proteasas relacionadas con subtilisina, el orden relativo de estos aminoácidos, leyendo desde el extremo amino al carboxi, es aspartato-histidina-serina. Sin embargo, en las proteasas relacionadas con quimiotripsina, el orden relativo, es histidina-aspartato-serina. Por lo tanto, subtilisina, en el presente documento, se refiere a una serina proteasa que tiene la tríada catalítica de las proteasas relacionadas con subtilisina. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a las subtilisinas identificadas en la figura 3 en el presente documento. En general, y para los propósitos de la presente invención, la numeración de aminoácidos en las proteasas corresponde a los números asignados a la secuencia de subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* madura, presentada en la figura 1.

“Subtilisina recombinante” o “proteasa recombinante” se refiere a una subtilisina o proteasa en la que la secuencia de ADN que codifica la subtilisina o proteasa se modifica para producir una variante (o mutante) de la secuencia de ADN que codifica la sustitución, delección o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos natural. Los procedimientos adecuados para producir dicha modificación y que se pueden combinar con los descritos en el presente documento, incluyen los descritos en la patente de EE.UU. RE 34.606, patente de EE.UU. 5.204.015 y patente de EE.UU. 5.185.258, patente de EE.UU. 5.700.676, patente de EE.UU. 5.801.038, y patente de EE.UU. 5.763.257.

Una “variante de proteasa” tiene una secuencia de aminoácidos que deriva de la secuencia de aminoácidos de una “proteasa precursora”. Las proteasas precursoras incluyen proteasas naturales y proteasas recombinantes. La secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa se “obtiene” de la secuencia de aminoácidos de la proteasa precursora por sustitución, delección o inserción de uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos precursora. Dicha modificación es de la “secuencia de ADN precursora” que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteasa precursora más que de la manipulación de la propia enzima proteasa precursora. Los procedimientos adecuados para dicha manipulación de la secuencia de ADN precursora incluyen procedimientos descritos en el presente documento, así como procedimientos conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, los documentos EP 0328299, WO89/06279 y las patentes y solicitudes de EE.UU. a las que ya se ha hecho referencia en el presente documento).

## ES 2 332 915 T3

Los números de posición de los aminoácidos se refieren a los asignados a la secuencia de subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* madura presentada en la figura 1. Sin embargo, la invención no se dirige a la mutación de esta subtilisina particular, si no a proteasas precursoras que contienen restos de aminoácidos en posiciones que son “equivalentes” a los restos particulares identificados en la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. La proteasa precursora es subtilisina de *Bacillus lentus* y las sustituciones se hacen en las posiciones equivalentes de los restos de aminoácidos en *B. lentus* que corresponden a los listados antes.

Una posición de un resto (aminoácido) de una proteasa precursora es equivalente a un resto de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, si es homóloga (es decir, se corresponde en posición en la estructura primaria o terciaria) o análoga a un resto o parte específica de ese resto en la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* (es decir, tiene la misma o similar capacidad para combinar, reaccionar o interactuar químicamente).

Con el fin de establecer homología con la estructura primaria, la secuencia de aminoácidos de una proteasa precursora se compara directamente con la secuencia primaria de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* y en particular con un conjunto de restos que se sabe que son invariantes en las subtilisinas de las que se conoce la secuencia. Por ejemplo, la figura 2 del presente documento presenta los restos conservados entre la subtilisina de *B. amyloliquefaciens* y *B. lentus*. Después de alinear los restos conservados, permitiendo las inserciones y deleciones necesarias con el fin de mantener el alineamiento (es decir, evitando la eliminación de restos conservados mediante la deleción e inserción arbitrarias), se definen los restos equivalentes a aminoácidos particulares en la secuencia primaria de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. El alineamiento de restos conservados debe conservar preferiblemente 100% de dichos restos. Sin embargo, el alineamiento de más de 75%, o de tan poco como 50%, de los restos conservados también es adecuado para definir restos equivalentes. La conservación de la tríada catalítica Asp32/His64/Ser221 debería mantenerse. Siezen y col. (1991) *Protein Eng.*, 4(7): 719-737, presentan el alineamiento de un gran número de serina proteasas. Siezen y col. se refieren a la agrupación como subtilasas o serina proteasas de tipo subtilisina.

Por ejemplo, en la figura 3, la secuencia de aminoácidos de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* (carlsbergensis) y *Bacillus lentus* se alinean para proporcionar la cantidad máxima de homología entre secuencias de aminoácidos. Una comparación de estas secuencias muestra que hay una serie de restos conservados contenidos en cada secuencia. Estos restos conservados (como entre BPN' y *B. lentus*) se identifican en la figura 2.

Por lo tanto, estos restos conservados se pueden usar para definir los correspondientes restos de aminoácidos equivalentes de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* en otras subtilisinas tales como la subtilisina 309 de *Bacillus lentus* (Publicación PCT n° WO89/06279 publicada el 13 de julio, 1989), la enzima precursora de proteasa preferida del presente documento, o la subtilisina denominada PB92 (documento EP 0328299), que es altamente homóloga con la subtilisina de *Bacillus lentus* preferida. Las secuencias de aminoácidos de algunas de estas subtilisinas están alineadas en las figuras 3A y 3B con la secuencia de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* para producir la homología máxima de los restos conservados. Como puede verse, hay una serie de deleciones en la secuencia de *Bacillus lentus* comparada con la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. Así pues, por ejemplo, el aminoácido equivalente para Val165 en la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* en las otras subtilisinas es la isoleucina para *B. lentus* y *B. licheniformis*.

Los “restos equivalentes” también pueden definirse determinando la homología a nivel de la estructura terciaria para una proteasa precursora cuya estructura terciaria se haya determinado por cristalografía de rayos X. Los restos equivalentes se definen como aquellos para los que las coordenadas atómicas de dos o más de los átomos de la cadena principal de un resto de aminoácido particular de la proteasa precursora y de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* (N en N, CA en CA, C en C y O en O) están dentro de 0,13 nm y preferiblemente 0,1 nm después del alineamiento. El alineamiento se obtiene después de que se haya orientado y colocado el mejor modelo para dar la superposición máxima de las coordenadas atómicas de átomos de la proteína no hidrógenos de la proteasa en cuestión con la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. El mejor modelo es el modelo cristalográfico que da el menor factor R para los datos de difracción experimentales con la mayor resolución disponible.

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

Los restos equivalentes que son análogos funcionales a un resto específico de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* se definen como aquellos aminoácidos de la proteasa precursora que pueden adoptar una conformación tal que altera, modifica o contribuye a la estructura de la proteína, unión del sustrato o catálisis, de una manera definida y atribuida a un resto específico de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. Además, están aquellos restos de la proteasa precursora (para los que se ha obtenido una estructura terciaria por cristalografía de rayos X) que ocupan una posición análoga en la medida en que, aunque los átomos de la cadena principal de un resto dado pueden no satisfacer los criterios de equivalencia basados en ocupar una posición homóloga, las coordenadas atómicas de al menos dos de los átomos de la cadena lateral del resto están dentro de 0,13 nm de los correspondientes átomos de la cadena lateral de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. Las coordenadas de la estructura tridimensional de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* se exponen en la publicación EPO n° 0251446 (equivalente a la patente de EE.UU. 5.182.204, y se pueden usar como se ha resumido antes para determinar restos equivalentes a nivel de la estructura terciaria.

## ES 2 332 915 T3

Algunos de los restos identificados por sustitución son restos conservados, mientras que otros no. En el caso de restos que no son conservados, la sustitución de uno o más aminoácidos está limitada a sustituciones que producen una variante que tiene una secuencia de aminoácidos que no corresponde a la encontrada en la naturaleza. En el caso de restos conservados, dichas sustituciones no deben dar como resultado una secuencia natural. Las variantes de proteasa de la presente invención incluyen las formas maduras de variantes de proteasa, así como las pro y preproformas de dichas variantes de proteasa. Las preproformas son las construcciones preferidas, puesto que estas facilitan la expresión, secreción y maduración de las variantes de proteasa.

“Prosecuencia” se refiere a una secuencia de aminoácidos unida a la parte N-terminal de la forma madura de una proteasa, que cuando se elimina da como resultado la aparición de la forma “madura” de la proteasa. En la naturaleza se encuentran muchas enzimas proteolíticas como productos proenzimáticos de traducción, y en ausencia de procesamiento postraduccional, se expresan de esta forma. Una prosecuencia preferida para producir variantes de proteasa es la prosecuencia putativa de subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, aunque se pueden usar otras prosequencias de proteasas.

Una “secuencia señal” o “prosecuencia” se refiere a cualquier secuencia de aminoácidos unida a la parte N-terminal de una proteasa o a la parte N-terminal de una proproteasa que puede participar en la secreción de las formas madura o pro de la proteasa. Esta definición de secuencia señal es una definición funcional, que significa que incluye todas aquellas secuencias de aminoácidos codificadas por la parte N-terminal del gen de la proteasa que participa en la realización de la secreción de proteasa en condiciones nativas. La presente invención usa dichas secuencias para efectuar la secreción de las variantes de proteasa como se definen en el presente documento. Una secuencia señal posible comprende los primeros siete restos de aminoácidos de la secuencia señal de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* fusionados con el resto de la secuencia señal de la subtilisina de *Bacillus lentus* (ATCC 21536).

Una forma “prepro” de una variante de proteasa consiste en la forma madura de la proteasa que tiene una prosequencia operativamente unida al extremo amino de la proteasa y una secuencia “pre” o “señal” operativamente unida al extremo amino de la prosequencia.

“Vector de expresión” se refiere a una construcción de ADN que contiene una secuencia de ADN que está operativamente unida a una secuencia de control adecuada capaz de llevar a cabo la expresión de dicho ADN en un huésped adecuado. Dichas secuencias de control incluyen un promotor para realizar la transcripción, una secuencia operadora opcional para controlar dicha transcripción, una secuencia que codifica sitios adecuados de unión del ARNm al ribosoma y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y traducción. El vector puede ser un plásmido, una partícula de fago, o simplemente un potencial inserto genómico. Una vez transformados en un huésped adecuado, el vector puede replicarse y funcionar independientemente del genoma del huésped, o puede, en algunos casos, integrarse en el genoma él mismo. En la presente memoria descriptiva, “plásmido” y “vector” se usan a veces de forma intercambiable, puesto que el plásmido es la forma de vector usada de forma más habitual hasta el momento. Sin embargo, se pretende que la invención incluya dichas otras formas de vectores de expresión que tienen funciones equivalentes que son o se harán conocidos en la materia.

Las “células huésped” usadas en la presente invención en general son huéspedes procariotas o eucariotas que preferiblemente se han manipulado por los procedimientos descritos en la patente de EE.UU. RE 34.606 para hacerlos incapaces de secretar endoproteasa enzimáticamente activa. Una célula huésped preferida para expresar proteasa es la cepa de *Bacillus* BG2036 que es deficiente en proteasa neutral y proteasa alcalina (subtilisina) enzimáticamente activas. La construcción de la cepa BG2036 se describe con detalle en la patente de EE.UU. 5.264.366. Otros células huésped para expresar proteasa incluyen *Bacillus subtilis* I168 (también descrita en la patente de EE.UU. 34.606 y la patente de EE.UU. 5.264.366, así como cualquier cepa adecuada de *Bacillus* tal como *B. licheniformis*, *B. lentus*, etc.

Las células huésped se transforman o transfectan con vectores construidos usando técnicas de ADN recombinante. Dichas células huésped transformadas son capaces de replicar vectores que codifican las variantes de proteasa o de expresar la variante de proteasa deseada. En el caso de vectores que codifican la forma pre o prepro de la variante de proteasa, dichas variantes, cuando se expresan, normalmente son secretadas desde la célula huésped al medio de la célula huésped.

“Operativamente unido” cuando se describe la relación entre dos regiones de ADN, simplemente significa que están funcionalmente relacionadas entre sí. Por ejemplo, una prosequencia está operativamente unida a un péptido si funciona como una secuencia señal, participando en la secreción de la forma madura de la proteína implicando, lo más probablemente, la escisión de la secuencia señal. Un promotor está operativamente unido a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia; un sitio de unión al ribosoma está operativamente unido a una secuencia codificante si está colocado de modo que permite la traducción.

Los genes que codifican la proteasa precursora natural se pueden obtener de acuerdo con los procedimientos generales conocidos para los expertos en la materia. Los procedimientos generales comprenden sintetizar sondas marcadas que tienen regiones que codifican secuencias putativas de la proteasa de interés, preparar bibliotecas genómicas de organismos que expresan la proteasa, y seleccionar en las bibliotecas el gen de interés por hibridación de las sondas. Los clones que hibridan positivamente, después se cartografían y se secuencian.

## ES 2 332 915 T3

Después, la proteasa clonada se usa para transformar una célula huésped con el fin de expresar la proteasa. Después, el gen de la proteasa se liga a un plásmido de número de copias alto. Este plásmido se replica en los huéspedes en el sentido de que contiene los elementos conocidos necesarios para la replicación del plásmido: un promotor operativamente unido al gen en cuestión (que se puede suministrar como el promotor homólogo del propio gen si es reconocido, es decir, transcrito por el huésped), una región de terminación de la transcripción y de poliadenilación (necesaria para la estabilidad del ARNm transcrito por el huésped a partir del gen de la proteasa en algunas células huésped eucariotas) que es exógena o es suministrada por la región de terminación endógena del gen de la proteasa, y convenientemente, un gen de selección tal como un gen de resistencia a antibiótico que permite el mantenimiento del cultivo continuo de células huésped infectadas por el plásmido por crecimiento en medio que contiene antibiótico. Los plásmidos de alto número de copias también contienen un origen de replicación para el huésped, que así permite generar un gran número de plásmidos en el citoplasma sin limitación cromosómica. Sin embargo, está dentro del alcance del presente documento integrar múltiples copias del gen proteasa en el genoma huésped. Esto es facilitado por organismos procariotas y eucariotas que son particularmente susceptibles a la recombinación homóloga.

El gen puede ser un gen *B. lentus* natural. Alternativamente, se puede producir un gen sintético que codifica una proteasa precursora natural o mutante. En dicho procedimiento, se determina el ADN y/o secuencia de aminoácidos de la proteasa precursora. Después se sintetizan múltiples fragmentos de ADN monocatenarios sintéticos que se superponen, que tras hibridación y ligado producen un ADN sintético que codifica la proteasa precursora. En el ejemplo 3 de la patente de EE.UU. 5.204.015 se presenta un ejemplo de construcción de gen sintético.

Una vez que se ha clonado el gen de la proteasa precursora natural o sintético, se lleva a cabo una serie de modificaciones para potenciar el uso del gen más allá de la síntesis de la proteasa precursora natural. Dichas modificaciones incluyen la producción de proteasas recombinantes como se describe en la patente de EE.UU. RE 34.606 y la publicación EPO n° 0251446, y la producción de variantes de proteasa descritas en el presente documento.

Se puede usar el siguiente procedimiento de mutagénesis de casete para facilitar la construcción de las variantes de proteasa de la presente invención, aunque se pueden usar otros procedimientos. Primero, se obtiene y secuencia totalmente o en parte el gen natural que codifica la proteasa. Después, se examina en la secuencia un punto en el que se desea hacer una mutación (delección, inserción o sustitución) de uno o más aminoácidos en la enzima codificada. Se evalúa en las secuencias que flanquean este punto la presencia de sitios de restricción para sustituir un segmento corto del gel por un grupo de oligonucleótidos, que cuando se expresen codificarán diferentes mutantes. Dichos sitios de restricción preferiblemente son sitios únicos dentro del gen de la proteasa, para así facilitar la sustitución del segmento génico. Sin embargo, se puede usar cualquier sitio de restricción conveniente que no sea redundante por superposición en el gen de la proteasa, con la condición de que los fragmentos de genes generados por digestión de restricción se puedan volver a unir en una secuencia adecuada. Si no hay sitios de restricción adecuados en sitios dentro de una distancia conveniente del punto seleccionado (de 10 a 15 nucleótidos), dichos sitios se generan por sustitución de nucleótidos en el gen, de modo que no se cambien ni el marco de lectura ni los aminoácidos codificados en la construcción final. La mutación del gen con el fin de cambiar su secuencia para conformar la secuencia deseada se lleva a cabo por extensión del cebador M13 de acuerdo con los procedimientos conocidos en general. La tarea de localizar regiones flanqueadoras adecuadas y evaluar los cambios necesarios para llegar a dos secuencias de sitios de restricción convenientes, se hace de forma rutinaria por redundancia del código genético, un mapa de restricción del gen y el gran número de diferentes enzimas de restricción. Obsérvese que si hay un sitio de restricción flanqueador conveniente, el procedimiento anterior solo es necesario usarlo en relación con la región flanqueadora que no contiene un sitio.

Una vez se ha clonado el ADN natural o ADN sintético, los sitios de restricción que flanquean las posiciones que se van a mutar, se hacen digerir con las enzimas de restricción cognadas y se ligan al gen una pluralidad de casetes de oligonucleótidos complementarios del extremo terminal. La mutagénesis se simplifica por este procedimiento, porque se pueden sintetizar todos los oligonucleótidos para tener los mismos sitios de restricción, y no son necesarios conectores sintéticos para crear sitios de restricción.

Tal como se usa en el presente documento, la actividad proteolítica se define como la tasa de hidrólisis de enlaces peptídicos por miligramo de enzima activa. Existen muchos procedimientos conocidos para medir la actividad proteolítica (K. M. Kalisz, "Microbial Proteinases," *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. A. Fiechter ed., 1988). Además de, o como una alternativa a la actividad proteolítica modificada, las enzimas variantes de la presente invención pueden tener otras propiedades modificadas tales como  $K_m$ ,  $k_{cat}$ , la relación  $k_{cat}/K_m$  y/o especificidad de sustrato modificada y/o perfil de actividad de pH modificado. Estas enzimas se pueden diseñar para el sustrato particular que se prevé que vaya a estar presente, por ejemplo, en la preparación de péptidos o para procedimientos hidrolíticos tales como usos para lavado.

Hay una variedad de condiciones de lavado incluyendo diferentes formulaciones de detergente, volumen de agua de lavado, temperatura del agua de lavado y duración del tiempo de lavado a las que se pueden exponer una variante de proteasa. Por ejemplo, las formulaciones de detergentes en diferentes zonas tienen diferentes concentraciones de sus componentes importantes presentes en el agua de lavado. Por ejemplo, un detergente europeo normalmente tiene aproximadamente 4500-5000 ppm de componentes del detergente en el agua de lavado, mientras que un detergente japonés normalmente tiene 667 ppm de componentes del detergente presentes en el agua de lavado. En América del Norte, en particular en Estados Unidos, un detergente normalmente tiene aproximadamente 975 ppm de componentes del detergente presentes en el agua de lavado.

## ES 2 332 915 T3

Un sistema de concentración baja de detergente incluye detergentes en los que menos de aproximadamente 800 ppm de componentes del detergente están presentes en el agua de lavado. Los detergentes japoneses se consideran normalmente sistemas de concentración baja de detergente, ya que tienen aproximadamente 667 ppm de componentes del detergente presentes en el agua de lavado.

5 Una concentración media de detergente incluye detergentes en los que están presentes en el agua de lavado entre aproximadamente 800 ppm y aproximadamente 2000 ppm de componentes del detergente. Los detergentes de América del Norte se consideran en general sistemas de concentración media de detergente, ya que tienen aproximadamente 975 ppm de componentes del detergente presentes en el agua de lavado. Brasil normalmente tiene aproximadamente  
10 1500 ppm de componentes del detergente presentes en el agua de lavado.

Un sistema de concentración alta de detergente incluye detergentes en los que están presentes más de aproximadamente 2000 ppm de componentes del detergente en el agua de lavado. En general se considera que los detergentes europeos son sistemas de concentración alta de detergente, puesto que tienen aproximadamente 4500-5000 ppm de  
15 componentes del detergente en el agua de lavado.

Los detergentes de América Latina en general son detergentes con mejoradores fosfato con alta formación de espuma y el intervalo de los detergentes usados en América Latina está tanto en las concentraciones media como alta de detergente, puesto que están en el intervalo de 1500 ppm a 6000 ppm de componentes del detergente en el agua de lavado. Como se ha mencionado antes, Brasil normalmente tiene 1500 ppm de componentes del detergente presentes  
20 en el agua de lavado. Sin embargo, otras zonas con detergentes con mejoradores fosfato de alta formación de espumas, no limitadas a otros países de América Latina, pueden tener sistemas de concentración alta de detergente de hasta aproximadamente 6000 ppm de componentes del detergente presentes en el agua de lavado.

A la luz de lo anterior, es evidente que las concentraciones de las composiciones de detergente en las disolución de lavado típicas por todo el mundo, varían desde menos de aproximadamente 800 ppm de composición de detergente (“zonas de concentración baja de detergente”), por ejemplo aproximadamente 667 ppm en Japón, a entre aproximadamente 800 ppm y aproximadamente 2000 ppm (“zonas de concentración media de detergentes”), por ejemplo aproximadamente 975 ppm en EE.UU. y aproximadamente 1500 ppm en Brasil, a más de aproximadamente 2000 ppm  
30 (“zonas de concentración alta de detergente”), por ejemplo de aproximadamente 4500 ppm a aproximadamente 5000 ppm en Europa y aproximadamente 6000 ppm en zonas de mejorante fosfato con alta formación de espumas.

Las concentraciones de las disoluciones de lavado típicas se determinan empíricamente. Por ejemplo, en EE.UU. una lavadora típica tiene un volumen de aproximadamente 64,4 litros de disolución de lavado. Por consiguiente,  
35 con el fin de obtener una concentración de aproximadamente 975 ppm de detergente en la disolución de lavado, deben añadirse aproximadamente 62,79 g de composición de detergente a los 64,4 litros de disolución de lavado. Esta cantidad es la cantidad típica medida en el agua de lavado del consumidor que usa el vaso de medir proporcionado con el detergente.

40 Como ejemplo adicional, diferentes zonas usan diferentes temperaturas de lavado. La temperatura del agua de lavado en Japón normalmente es menor que la usada en Europa.

Las variantes de proteasa de la invención pueden ser útiles en la formulación de diferentes composiciones de detergente o formulaciones para el cuidado personal tales como champús o lociones. Una serie de compuestos conocidos son tensioactivos adecuados útiles en las composiciones que comprenden los mutantes de proteasas de la invención. Estos incluyen detergentes no iónicos, aniónicos, catiónicos, o de ión híbrido, como se describe en los documentos US 4.404.128 de Barry J. Anderson y US 4.261.868 de Jiri Flora, y col. Una formulación de detergente adecuada es la descrita en el ejemplo 7 de la patente de EE.UU. 5.204.015. En la materia se conocen las diferentes formulaciones que se pueden usar como composiciones de limpieza. Además de las composiciones de limpieza típicas, se entiende  
50 fácilmente que las variantes de proteasa de la presente invención se pueden usar para cualquier propósito para el que se usan las proteasas nativas o salvajes. Por lo tanto, estas variantes se pueden usar, por ejemplo, en aplicaciones de jabones en pastilla o líquidos, formulaciones para vajillas, disoluciones o productos de limpieza de lentes de contacto, hidrólisis de péptidos, tratamiento de residuos, aplicaciones textiles, como enzimas de fusión-escisión en la producción de proteínas, etc. Las variantes de la presente invención pueden comprender un rendimiento potenciado en una  
55 composición de detergente (comparado con la precursora). Tal como se usa en el presente documento, rendimiento potenciado en un detergente, se define como aumento de la limpieza de algunas manchas sensibles a enzimas tales como hierba o sangre, determinado por la evaluación habitual después de un ciclo de lavado estándar.

Las proteasas de la invención se pueden formular en detergentes líquidos y en polvo conocidos que tienen pH entre  
60 6,5 t 12,0, en niveles de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5% (preferiblemente de 0,1% a 0,5%) en peso. Estas composiciones de limpieza de detergentes también pueden incluir otras enzimas tales como proteasas, amilasas, celulasas, lipasas o endoglicosidasas conocidas, así como mejoradores y estabilizantes.

La adición de proteasas de la invención a composiciones de limpieza convencionales no crea ninguna limitación de  
65 uso especial. En otras palabras, cualquier temperatura y pH adecuados para el detergente también son adecuados para las presentes composiciones, siempre que el pH esté dentro del intervalo anterior, y la temperatura esté por debajo de la temperatura de desnaturalización descrita de las proteasas. Además, las proteasas de la invención se pueden usar en una composición de limpieza sin detergentes, sola o en combinación con mejoradores y estabilizantes.

## ES 2 332 915 T3

La presente invención también se refiere a composiciones de limpieza que contienen variantes de proteasa de la invención. Las composiciones de limpieza pueden contener además aditivos que se usan normalmente en composiciones de limpieza. Estos se pueden seleccionar, pero sin limitación, de blanqueadores, tensioactivos, mejoradores, enzimas y catalizadores de blanqueo. Será fácilmente evidente para un experto en la materia qué aditivos son adecuados para incluir en las composiciones. La lista proporcionada en el presente documento no es de ninguna forma exhaustiva y solo debe tomarse como ejemplos de aditivos adecuados. También será fácilmente evidente para un experto en la técnica el uso solo de aquellos aditivos que sean compatibles con las enzimas y los otros componentes en la composición, por ejemplo, el tensioactivo.

Cuando está presente, la cantidad de aditivo presente en la composición de limpieza es de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 99,9%, preferiblemente de aproximadamente 1% a aproximadamente 95%, más preferiblemente de aproximadamente 1% a aproximadamente 80%.

Un aspecto de la invención es una composición para el tratamiento de un producto textil que incluye proteasas variantes de la presente invención. La composición se puede usar para tratar, por ejemplo, seda o lana, como se describe en publicaciones tales como RD 216.034; EP 134.267; US 4.533.359; y EP 344.259.

Lo siguiente se presenta a modo de ejemplo y no debe considerarse una limitación del alcance de las reivindicaciones.

### Ejemplos

Las variantes de proteasas se produjeron y purificaron usando procedimientos conocidos en la técnica. Todas las mutaciones se hicieron en subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*.

Se ensayó en las variantes de proteasa producidas el rendimiento en dos tipos de detergente y condiciones de lavado usando un ensayo de microlavado descrito en "An improved method of assaying for a preferred enzyme and/or preferred detergent compositions", EE.UU. serie n° 60/068.798.

La tabla 1 lista las proteasas variantes ensayadas y los resultados del ensayo en dos detergentes diferentes. Para la columna A el detergente era Ariel Ultra filtrado 0,67 g/l (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, EE.UU.), en una disolución que contiene 3 granos por 3,785 litros de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  de mezcla de dureza, y se usaron 0,3 ppm de enzima en cada lavado a 20°C. Para la columna B, el detergente era Ariel Futur filtrado 3,38 g/l (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, EE.UU.), en una disolución que contiene 15 granos por 3,785 litros de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  de mezcla de dureza, y se usaron 0,3 ppm de enzima en cada lavado a 40°C.

TABLA 1

					A	B
	N76D	S103A	V104I		1	1
	V4E	N76D	S103A	V104I	1,22	0,33
	V4E	N76D	S103A	V104I	Q206E	0,05
	V4E	N76D	S103A	V104I	S188E	0,04
	V4E	N76D	S103A	V104I	A158E	0,04

### Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad en este respecto.

### Documentos de patente citados en la descripción

- WO 9510615 A [0002]
- WO 9100345 A [0002]
- WO 8906276 A [0007]

## ES 2 332 915 T3

- US RE34606 E [0013] [0027] [0027] [0033]
- US 5204015 A [0013] [0032] [0045]
- 5 • US 5185258 A [0013]
- US 5700676 A [0013]
- US 5801038 A [0013]
- 10 • US 5763257 A [0013]
- EP 0328299 A [0014] [0019]
- 15 • WO 8906279 A [0014] [0019]
- EP 0251446 A [0021] [0033]
- US 5182204 A [0021]
- 20 • US 5264366 A [0027] [0027]
- US 4404128 A, Barry J. Anderson [0045]
- 25 • US 4261868 A, Jiri Flora [0045]
- EP 134267 A [0050]
- US 4533359 A [0050]
- 30 • EP 344259 A [0050]
- US 60068798 B [0053]
- 35 **Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción**
- **Stroud**, *R. Sci. Amer.*, vol. 131, 74-88 [0001]
- 40 • **Kraut**, *J. Annu. Rev. Biochem.*, 1977, vol. 46, 331-358 [0001]
- **Markland**, F.S. *et al.* Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.*, 1983, vol. 364, 1537-1540 [0002]
- **Robertus**, J.D. *et al.* *Biochemistry*, 1972, vol. 11, 2439-2449 [0002]
- 45 • **Robertus**, J.D. *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1976, vol. 251, 1097-1103 [0002]
- **Wells; Estell.** *TIBS*, 1988, vol. 13, 291-297 [0002]
- **Dale**, M.W. *Molecular Genetics of Bacteria. John Wiley & Sons, Ltd*, 1989 [0010]
- 50 • **Siezen** *et al.* *Protein Eng*, 1991, vol. 4 (7), 719-737 [0017]
- Microbial Proteinases. K. M. **Kalisz.** *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology.* 1988 [0036].
- 55
- 60
- 65

# ES 2 332 915 T3

## REIVINDICACIONES

1. Variante de subtilisina 309 o subtilisina PB92, que comprende el conjunto de sustituciones de aminoácidos

V4E/N76D/S103A/V104I

en las posiciones de restos que corresponden a las de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, en la que dicha proteasa variante tiene un mejor rendimiento de lavado comparado con la subtilisina 309 o subtilisina PB92 en un sistema de concentración baja de detergente.

2. Variante de proteasa de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende el conjunto de sustituciones:

V4E/N76D/S103A/V104I/Q206E;

V4E/N76D/S103A/V104I/S188E; o

V4E/N76D/S103A/V104I/A158E.

3. ADN que codifica una variante de proteasa de la reivindicación 1 o reivindicación 2.

4. Vector de expresión que comprende el ADN de la reivindicación 3.

5. Célula huésped transformada con el vector de expresión de la reivindicación 4.

6. Composición de limpieza o composición para tratar un producto textil, que comprende la variante de proteasa de la reivindicación 1 o reivindicación 2.

7. Procedimiento para mejorar el rendimiento de lavado de una proteasa subtilisina de *Bacillus lentus*, que comprende introducir un conjunto de sustituciones de los aminoácidos

V4E/N76D/S103A/V104I

en las posiciones de restos que corresponden a las de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, para generar una proteasa variante, en la que dicha proteasa variante tiene un mejor rendimiento de lavado comparado con dicha proteasa subtilisina de *Bacillus lentus* en un sistema de concentración baja de detergente.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, que comprende introducir un conjunto de sustituciones:

V4E/N76D/S103A/V104I/Q206E;

V4E/N76D/S103A/V104I/S188E; o

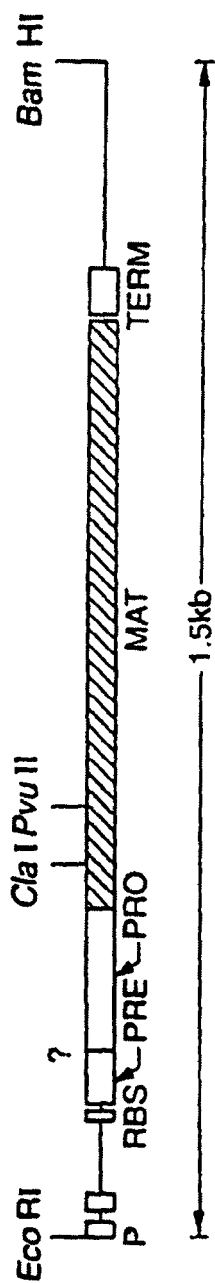
V4E/N76D/S103A/V104I/A158E.

9. Procedimiento según la reivindicación 7 o reivindicación 8, en el que dicha proteasa subtilisina de *Bacillus lentus* es la subtilisina 309 o subtilisina PB92.

10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, que comprende generar un ADN que codifica dicha variante de proteasa.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, que comprende generar un vector de expresión que comprende dicho ADN.

12. Procedimiento según la reivindicación 11, que comprende generar una célula huésped transformada con dicho vector de expresión.



**FIG. 1A**



50  
 Ala Gly Gly Ala Ser Met Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Asn Phe Gln Asp Asn Asp 60 Asp  
 549 GCA GGC GGA GCC AGC ATG GTT CCT TCT GAA ACA AAT CCT TTC CAA GAC MAC MAC TCT CAC GGA ACT CAC GTT His Val Ala  
 70  
 Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser 90  
 a24 GGC ACA GTT GCG GCT CTT AAT AAC TCA ATC GGT GTA TTA TTA GGC GTT GCG CCA AGC GCA TCA CTT TAC TAC GCT GTA Lys  
 110  
 Asp Ala 100  
 Val Leu Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu Trp Ala Ile Ala Asn Asn Met  
 699 GTT CTC GGT GCT GAC GGT TCC GGC CAA TAC AGC TGG ATC ATT MAC GGA ATC GAG TGG GCG ATC GCA AAC AAT ATG  
 120  
 Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro Ser Gly Ser Ala Ala Leu Lys Ala Val Asp Lys Ala Val Ala  
 774 GAC GTT ATT AAC ATG AGC CTC GGC GCA CCT TCT GGT TCT GCT TTA AAA GCG GCA GTT GAT AAA GCC GTT GCA  
 130  
 150  
 Ser Gly Val Val Val Val Ala Ala Gly Asn Glu Gly Thr Ser Gly Ser Ser Thr Val Val Gly Tyr Pro Gly  
 849 TCC GGC GTC GTA GTC GTT GCG GCA GCC GGT AAC AAC Gly Thr Ser Gly Ser Ser Ser Thr Val Gly Tyr Pro Gly  
 170  
 Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala Val Gly Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly Pro  
 924 AAA TAC CCT TCT GTC ATT GCA GTA GGC GCT GTT CAC AGC AGC MAC CAA AGA GCA TCT TTC TCA ACC GTA GGA CCT  
 190  
 200  
 Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly  
 999 GAG CTT GAT GTC ATG GCA CCT GGC GTA TCT ATC CAA AGC ACG CTT CCT GGA AAC AAA TAC GGG GCG TAC AAC GGT  
 210  
 220  
 Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala Gly Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Trp Thr Asn Thr  
 1074 ACG TCA ATG GCA TCT CCG CAC GTT GCC GGA GCG GCT TIG ATT CTT TCT AAG CAC CCG MAC TGG ACA AAC ACT  
 230  
 240

FIG.-1B - 2



RESTOS CONSERVADOS EN SUBTILISINAS DE  
*BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS*

1	10	20
A Q S V P . G . . . . .	A P A . H . . G	
21	30	40
. T G S . V K V A V . D . G . . . . .	H P	
41	50	60
D L . . . G G A S . V P . . . . .	Q D	
61	70	80
. N . H G T H V A G T . A A L N N S I G		
81	90	100
V L G V A P S A . L Y A V K V L G A . G		
101	110	120
S G . . S . L . . G . E W A . N . . . . .		
121	130	140
V . N . S L G . P S . S . . . . .	A . .	
141	150	160
. . . . . G V . V V A A . G N . G . . . . .		
161	170	180
. . . . . Y P . . Y . . . . .	A V G A .	
181	190	200
D . . N . . A S F S . . G . . L D . . A		
201	210	220
P G V . . Q S T . P G . . Y . . . . .	N G T	
221	230	240
S M A . P H V A G A A A L . . . . .	K . . . .	
241	250	260
W . . . Q . R . . L . N T . . . . .	L G . . .	
261	270	
. . Y G . G L . N . . A A . . . . .		

**FIG..2**

COMPARACIÓN DE SECUENCIAS DE SUBTILISINAS DE:

- B. amyloqueliciens*
- B. subtilis*
- B. licheniformis*
- B. lentus*

```

01      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100      110      120      130      140      150
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 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 W G I S R V Q 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

41      50      60      70      80      90      100      110      120      130      140      150
D L K V A G G A S S H V P P S E T N P F Q D D N S 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 S F V P S E T N P Y Q D D G S S H G T H V A G T V A A L N N S I G
D L N V V G G A S S F V P A G E E * T D D G N G H G T H V A G T V A A L N N S I G
D L N I R G G A S S F V P G E E * P S T Q D D G N G H G T H V A G T V A A L N N S I G

81      90      100      110      120      130      140      150
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 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 S G S Y S G I V S G I E W A T N N G M D
V L G V A P S A E L Y A V K V L G A S S G S G 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 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 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 S T A M K Q A V D N S A T S R G V V V A A A A G N S G S G
V A N L S L G S P S A T L E Q A V N S A T S R G V L V V A A A S G N S G A G S

```

FIG. 3A

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

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

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

FIG.\_3B

FIG.\_3

