(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 34 187 T2** 2005.12.15

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 723 590 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 34 187.8**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/11562**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 931 345.6**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/010615**
(86) PCT-Anmeldetag: **13.10.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **20.04.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **31.07.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **15.12.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.12.2005**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 15/57**
C12N 9/54, C12N 1/21

(30) Unionspriorität:
137240 **14.10.1993** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Genencor International, Inc., Palo Alto, Calif., US

(74) Vertreter:
LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(72) Erfinder:
GRAYCAR, P., Thomas, Pacifica, US; BOTT, R., Richard, Burlingame, US; WILSON, J., Lori, Millbrae, US

(54) Bezeichnung: **SUBTILISIN VARIANTEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft neue Carbonyl-Hydrolase-Varianten mit einer Aminosäuresequenz, worin eine Vielzahl von Aminosäureresten einer Vorläufer-Carbonyl-Hydrolase, spezifisch jene an Positionen, die Rest +76 in Kombination mit einem oder mehreren Rest(en), ausgewählt aus der aus +99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265 und/oder +274 in Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin bestehenden Gruppe, entsprechen oder ihm äquivalent sind, durch eine andere Aminosäure ersetzt wurden. Solche mutierten/variierten Carbonyl-Hydrolasen werden im Allgemeinen durch In-vitro-Modifikation einer Vorläufer-DNA-Sequenz, die für eine natürlich vorkommende oder rekombinante Carbonyl-Hydrolase kodiert, erhalten, sodass sie für die Substitution einer Vielzahl dieser Aminosäurereste in einer Vorläufer-Aminosäuresequenz alleine oder in Kombination mit weiterer Substitution, Insertion oder Deletion in der Vorläufer-Aminosäuresequenz kodiert.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Serinproteasen sind eine Untergruppe von Carbonyl-Hydrolasen. Sie umfassen eine vielfältige Gruppe von Enzymen, die zahlreiche Spezifitäten und biologische Funktionen aufweisen. R. Stroud, Sci. Amer. 131, 74–88. Trotz ihrer funktionellen Diversität wurde der katalytische Mechanismus von Serinproteasen anhand von zumindest zwei genetisch unterschiedlichen Enzymfamilien erkannt: den Subtilisinen und den Säugetier-Chymotrypsin-verwandten und -homologen bakteriellen Serinproteasen (z. B. Trypsin und S.-gresius-Trypsin). Diese zwei Familien von Serinproteasen weisen bemerkenswert ähnliche Katalyse-Mechanismen auf. J. Kraut, Ann. Rev. Biochem. 46, 331–358 (1977). Weiters, obwohl die Primärstruktur nicht verwandt ist, bilden die Tertiärstrukturen dieser zwei Enzymfamilien eine konservierte katalytische Triade von Aminosäuren, die aus Serin, Histidin und Aspartat besteht.

[0003] Subtilisin ist eine Serin-Endoprotease (MG 27.500), die in großen Mengen von zahlreichen Bacillus-Spezies und anderen Mikroorganismen sekretiert wird. Die Proteinsequenz von Subtilisin wurde von zumindest vier verschiedenen Spezies von Bacillus bestimmt. F. S. Markland et al., Honne-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 1537–1540 (1983). Die dreidimensionale kristallographische Struktur von Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin wurde auch bei 2,5-Å-Auflösung dargestellt. C. S. Wright et al., Nature 221, 235–242 (1969); J. Drenth et al., Eur. J. Biochem. 26, 177–181 (1972). Diese Studien weisen darauf hin, dass, obwohl Subtilisin genetisch mit den Säugetier-Serinproteasen nicht verwandt ist, es eine ähnlich Struktur der aktiven Stellen aufweist. Die Röntgenkristallstrukturen von Subtilisin, die kovalent gebundene Peptidinhibitoren (J. D. Robertus et al., Biochemistry 11, 2439–2449 (1972)) oder Produktkomplexe (J. D. Robertus et al., J. Biol. Chem. 251, 1097–1103 (1976)) enthalten, lieferten auch Informationen in Bezug auf die aktive Stelle und mutmaßliche Substrat-Bindungsspalte von Subtilisin. Weiters wurden zahlreiche Studien zu kinetischen und chemischen Modifikationen bei Subtilisin veröffentlicht (M. Philipp et al., Mol. Cell. Biochem. 51, 5–32 (1983); B. Svendsen, Carlsberg Res. Comm. 41, 237–291 (1976); F. S. Markland, s. o.) sowie zumindest ein Bericht, worin die Seitenkette von Methionin bei Rest 222 von Subtilisin durch Wasserstoffperoxid in Methioninsulfoxid überführt wurde (D. C. Stauffer et al., J. Biol. Chem. 244, 5333–5338 (1965)) und die Seitenkette von Serin bei Rest 221 durch chemische Modifikation in Cystein überführt wurde (Polgar et al., Biochimica et Biophysica Acta 667, 351–354 (1981)).

[0004] Das US-Patent 4.760.025 (RE 34.606) offenbart die Modifikation von Subtilisin-Aminosäureresten, die den Positionen in Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin Tyrosin –1, Aspartat +32, Asparagin +155, Tyrosin +104, Methionin +222, Glycin +166, Histidin +64, Glycin +169, Phenylalanin +189, Serin +33, Serin +221, Tyrosin +217, Glutamat +156 und Alanin +152 entsprechen. Das US-Patent 5.182.204 offenbart die Modifikation des Aminosäure-Rests +224 in Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin und äquivalenter Positionen in anderen Subtilisinen, die mittels Substitution, Insertion oder Deletion modifiziert und mit Modifikationen an den Resten, die im US-Patent 4.760.025 (RE 34.606) identifiziert sind, kombiniert werden können, um nützliche Subtilisin-Mutanten oder -Varianten zu bilden. Das US-Patent 5.155.033 offenbart ähnliche mutierte Subtilisine mit einer Modifikation an einer der Position +225 von B.-amyloliquefaciens-Subtilisin äquivalenten Position. Die US-Patente 5.185.258 und 5.204.015 offenbaren mutierte Subtilisine mit einer Modifikation an den Positionen +123 und/oder +274. Die US-Patentanmeldung SN 07/898.382 offenbart die Modifikation von zahlreichen Aminosäureresten innerhalb von Subtilisin, umfassend insbesondere +99, +101, +103, +107, +126, +128, +135, +197 und +204. Alle diese Patente/Anmeldungen werden gemeinsam besessen. Das US-Patent 4.914.031 offenbart bestimmte Subtilisinanaloga, umfassend ein Subtilisin, das an Position +76 modifiziert ist. Die bestimmten, hierin identifizierten Reste und/oder die in den Ansprüchen hierin genannten spezifischen Kombinationen

sind jedoch in diesen Verweisen nicht identifiziert.

[0005] Die vorliegende Erfindung stellt Subtilisinvarianten nach Anspruch 1 bereit. Bevorzugte Subtilisinvarianten werden in Anspruch 2 genannt.

[0006] Die Erfindung stellt weiters DNA-Sequenzen bereit, die für solche Varianten kodieren, sowie Expressionsvektoren, die solche variierten DNA-Sequenzen enthalten.

[0007] Die Erfindung stellt weiters Wirtszellen, die mit solchen Vektoren transformiert sind, sowie Wirtszellen, die in der Lage sind, solche DNA zu exprimieren, bereit, um Varianten intrazellulär oder extrazellulär herzustellen.

[0008] Die zuvor erläuterten Verweise sind nur für ihre Offenbarung vor dem Einreichdatum des vorliegenden Falls bereitgestellt, und nichts hierin ist als ein Eingeständnis zu verstehen, dass die Erfinder nicht berechtigt seien, solch eine Offenbarung aufgrund der Priorität vorher eingereichter Anmeldungen vorwegzunehmen.

Zusammenfassung der Erfindung

[0009] Die Erfindung umfasst nicht in der Natur vorkommende Subtilisinvarianten mit im Vergleich zum Vorläufersubtilisin, von dem die Aminosäuresequenz der Variante abgeleitet ist, verbesserten Waschleistungs-Eigenschaften. Das Vorläufersubtilisin kann natürlich vorkommendes oder rekombinantes Subtilisin sein. Insbesondere weisen solche Varianten eine Aminosäuresequenz auf, die in der Natur nicht auftritt und durch Ersetzung zahlreicher Aminosäurereste eines Vorläufersubtilisins mit verschiedenen Aminosäuren abgeleitet ist.

[0010] Die Erfindung umfasst auch variierte DNA-Sequenzen, die für solche Subtilisinvarianten kodieren. Diese variierten DNA-Sequenzen sind von einer Vorläufer-DNA-Sequenz abgeleitet, die für ein natürlich vorkommendes oder rekombinantes Vorläuferenzym kodiert. Obwohl die Aminosäurereste, die für Modifikation identifiziert sind, hierin gemäß der für B. amyloliquefaciens anwendbaren Nummerierung identifiziert sind (was als herkömmliches Verfahren zur Identifikation von Reste-Positionen in allen Subtilisinen eingesetzt wird), ist die bevorzugte Vorläufer-DNA-Sequenz, die in der vorliegenden Erfindung nützlich ist, die DNA-Sequenz von Bacillus lentus, wie in Fig. 6 (Seq.-ID Nr. 11) gezeigt.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

[0011] Die Fig. 1A–C zeigen die DNA- und Aminosäuresequenz für Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin und eine partielle Restriktionskarte dieses Gens (Seq.-ID Nr. 6).

[0012] Fig. 2 zeigt die konservierten Aminosäurereste unter Subtilisinen von Bacillus amyloliquefaciens (BPN) und Bacillus lentus (Wildtyp).

[0013] Die Fig. 3A und Fig. 3B zeigen die Aminosäuresequenz von vier Subtilisinen. Die obere Linie stellt die Aminosäuresequenz von Subtilisin aus Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin (auch manchmal als Subtilisin BPN' bezeichnet) (Seq.-ID Nr. 7) dar. Die zweite Linie zeigt die Aminosäuresequenz von Subtilisin aus Bacillus subtilis (Seq.-ID Nr. 8). Die dritte Linie zeigt die Aminosäuresequenz von Subtilisin aus B. licheniformis (Seq.-ID Nr. 9). Die vierte Linie zeigt die Aminosäuresequenz von Subtilisin aus Bacillus lentus (in der PCT WO 89/06276 auch als Subtilisin 309 bezeichnet) (Seq.-ID Nr. 10). Das Symbol * weist im Vergleich zu Subtilisin BPN' auf die Abwesenheit spezifischer Aminosäurereste hin.

[0014] Fig. 4 zeigt die Konstruktion von Plasmid GGA274.

[0015] Fig. 5 zeigt die Konstruktion von GGT274, das ein Zwischenprodukt für bestimmte Expressionsplasmide ist, die in dieser Anmeldung verwendet werden.

[0016] Die Fig. 6A und Fig. 6B zeigen die DNA- und Aminosäuresequenz von Subtilisin aus Bacillus lentus (Seq.-ID Nr. 11). Das reife Subtilisinprotein wird von den Codons, beginnend am Codon GCG (334–336), das Ala entspricht, kodiert.

[0017] Die Fig. 7A und Fig. 7B zeigen die DNA- und Aminosäuresequenz einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung (N76D/S103A/V104I) (Seq.-ID Nr. 12). Die DNA in dieser Fig. wurde durch die Verfahren modifiziert, die beschrieben wurden, um für Aspartat an Position 76, Alanin an Position 103 und Isoleucin an

Position 104 zu kodieren. Das reife Subtilisinvariantenprotein wird durch die Codons, beginnend am Codon GCG (334–336), das Ala entspricht, kodiert.

[0018] Fig. 8 zeigt die Konstruktion von Vektor pBCDAICAT.

[0019] Fig. 9 zeigt die Konstruktion von Vektor pUCCATFNA.

[0020] Fig. 10 zeigt die Stabilität eines bevorzugten mutierten Enzyms im Vergleich zum Wildtyp-Enzym in einer flüssigen Detergensformulierung.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0021] Carbonyl-Hydrolasen sind Enzyme, die Verbindungen hydrolysieren, welche



enthalten, worin X Sauerstoff oder Stickstoff ist. Sie umfassen natürlich vorkommende Carbonyl-Hydrolasen und rekombinante Carbonyl-Hydrolasen. Natürlich vorkommende Carbonyl-Hydrolasen umfassen prinzipiell Hydrolasen, z. B. Peptidhydrolasen wie Subtilisine oder Metalloproteasen. Peptidhydrolasen umfassen α-Aminoacylpeptid-Hydrolase, Peptidylaminosäure-Hydrolase, Acylamino-Hydrolase, Serincarboxypeptidase, Metallocarboxypeptidase, Thiolproteinase, Carboxylproteinase und Metalloproteinase. Serin-, Metallo-, Thiol- und Säure-Proteasen sowie Endo- und Exo-Proteasen sind umfasst.

[0022] "Rekombinante Carbonyl-Hydrolase" bezieht sich auf eine Carbonyl-Hydrolase, in der die DNA-Sequenz, die für die natürlich vorkommende Carbonyl-Hydrolase kodiert, modifiziert ist, sodass sie eine mutierte DNA-Sequenz produziert, die für die Substitution, Insertion oder Deletion einer oder mehr der Aminosäuren in der Carbonyl-Hydrolase-Aminosäuresequenz kodiert. Geeignete Modifikationsverfahren sind hierin und im US-Patent 4.760.025 (RE 34.606), im US-Patent 5.204.015 und im US-Patent 5.185.258 offenbart.

[0023] Subtilisine sind Bakterien- oder Pilz-Carbonyl-Hydrolasen, die im Allgemeinen so wirken, dass sie Peptidbindungen von Proteinen oder Peptiden spalten. Wie hierin verwendet bedeutet "Subtilisin" ein natürlich vorkommendes Subtilisin oder ein rekombinantes Subtilisin. Eine Reihe von natürlich vorkommenden Subtilisinen ist dafür bekannt, von verschiedenen mikrobiellen Spezies produziert und oft sekretiert zu werden. Aminosäuresequenzen der Mitglieder dieser Reihe sind nicht zur Gänze homolog. Dennoch zeigen die Subtilisine in dieser Reihe denselben oder ähnlichen Typ von proteolytischer Aktivität. Diese Gruppe von Serinproteasen weist eine gemeinsame Aminosäuresequenz auf, die eine katalytische Triade definiert, welche sie von der Chymotrypsin-verwandten Gruppe von Serinproteasen unterscheidet. Die Subtilisin- und die Chymotrypsin-verwandten Serinproteasen weisen beide eine katalytische Triade auf, umfassend Aspartat, Histidin und Serin. In den Subtilisin-verwandten Proteasen ist die relative Reihenfolge dieser Aminosäuren, in Leserichtung vom Amino- zum Carboxyl-Terminus, Aspartat-Histidin-Serin. In den Chymotrypsin-verwandten Proteasen ist die relative Reihenfolge jedoch Histidin-Aspartat-Serin. Somit bezieht sich Subtilisin hierin auf eine Serinprotease mit der katalytischen Triade von Subtilisin-verwandten Proteasen. Beispiele umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, die Subtilisine, die hierin in Fig. 3 identifiziert sind.

[0024] "Rekombinantes Subtilisin" bezieht sich auf ein Subtilisin, in dem die DNA-Sequenz, die für das Subtilisin kodiert, modifiziert ist, sodass eine variierte (oder mutierte) DNA-Sequenz produziert wird, die für die Substitution, Deletion oder Insertion von einer oder mehreren Aminosäuren in der natürlich vorkommenden Subtilisin-Aminosäuresequenz kodiert. Geeignete Verfahren zur Produktion solcher Modifikationen, die auch mit jenen hierin offenbarten kombiniert werden können, umfassen jene, die in den US-Patenten 4.760.025 (RE 24.606), 5.204.015 und 5.185.258 offenbart sind.

[0025] "Nichtmenschliche Carbonyl-Hydrolasen" und die dafür kodierende DNA können aus zahlreichen prokaryotischen und eukaryotischen Organismen erhalten werden. Geeignete Beispiele für prokaryotische Organismen umfassen gram-negative Organismen wie beispielsweise E. coli oder Pseudomonas und gram-positive Bakterien wie beispielsweise Micrococcus oder Bacillus. Beispiele für eukaryotische Organismen, aus denen Carbonyl-Hydrolase und ihre Gene erhalten werden können, umfassen Hefe wie beispielsweise Saccharomyces cerevisiae, Pilze wie beispielsweise Aspergillus-Spezies und nichtmenschliche Säugetierquellen wie beispielsweise Rinderspezies, von der das Gen erhalten werden kann, das für das Carbonyl-Hydrolase-Chymosin kodiert. Wie bei den Subtilisinen kann eine Reihe von Carbonyl-Hydrolasen aus verschiedenen verwandten Spezies erhalten werden, die Aminosäuresequenzen aufweisen, welche innerhalb der Mitglieder dieser Reihe

nicht gänzlich homolog sind, jedoch dennoch dieselben oder ähnliche Art biologischer Aktivität aufweisen. Somit hat nichtmenschliche Carbonyl-Hydrolase, wie sie hierin verwendet wird, eine funktionelle Definition, die sich auf Carbonyl-Hydrolasen bezieht, die direkt oder indirekt mit prokaryotischen und eukaryotischen Quellen assoziiert sind.

[0026] Eine "Carbonyl-Hydrolasen-Variante" weist eine Aminosäuresequenz auf, die von der Aminosäuresequenz einer "Vorläufer-Carbonyl-Hydrolase" abgeleitet ist. Die Vorläufer-Carbonyl-Hydrolasen (wie beispielsweise Subtilisin) umfassen natürlich vorkommende Carbonyl-Hydrolasen (Subtilisin) und rekombinante Carbonyl-Hydrolasen (Subtilisin). Die Aminosäuresequenz der Carbonyl-Hydrolasen-Variante ist von der Vorläufer-Hydrolase-Aminosäuresequenz durch Substitution, Deletion oder Insertion einer oder mehrerer Aminosäuren der Vorläufer-Aminosäuresequenz "abgeleitet". Solch eine Modifikation ist eine Modifikation der "Vorläufer-DNA-Sequenz", die für die Aminosäuresequenz der Vorläufer-Carbonyl-Hydrolase (Subtilisin) kodiert, und nicht eine Manipulation des Vorläufer-Carbonyl-Hydrolase-(Subtilisin-)Enzyms an sich. Geeignete Verfahren für solch eine Manipulation der Vorläufer-DNA-Sequenz umfassen hierin offenbarte Verfahren sowie Verfahren, die Fachleuten bekannt sind (siehe beispielsweise die EP 0.328.299, WO 89/06279 und die bereits erwähnten US-Patente und -Anmeldungen).

[0027] Subtilisinvarianten der Erfindung werden in den Ansprüchen 1 und 2 beschrieben. Die Aminosäuren-Positionsnummern beziehen sich auf jene, die der in **Fig.** 1 dargestellten Sequenz von reifem Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin zugewiesen sind. Die Erfindung ist jedoch nicht auf die Mutation dieses bestimmten Subtilisins eingeschränkt, sondern umfasst Vorläufer-Carbonyl-Hydrolasen, die Aminosäurereste an Positionen enthalten, die zu den bestimmten identifizierten Resten in Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin "äquivalent" sind. In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Vorläufer-Subtilisin Bacillus-lentus-Subtilisin, und die Substitutionen, Deletionen oder Insertionen werden in B. lentus am äquivalenten Aminosäurerest vorgenommen.

[0028] Ein Rest (Aminosäure) einer Vorläufer-Carbonyl-Hydrolase ist äquivalent mit einem Rest von Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin, wenn er entweder homolog (d. h. hinsichtlich der Position in jeder Primär- oder Tertiärstruktur entsprechend) oder analog zu einem spezifischen Rest oder Abschnitt dieses Rests in Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin ist (d. h. dieselbe oder ähnliche funktionelle Fähigkeit aufweist, chemisch zu kombinieren, zu reagieren oder wechselzuwirken).

[0029] Um Homologie zur Primärstruktur festzustellen, wird die Aminosäuresequenz einer Vorläufer-Carbonyl-Hydrolase direkt mit der Primärsequenz von Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin und insbesondere mit einer Reihe an Resten, die dafür bekannt sind, in Subtilisinen mit bekannten Sequenzen invariant zu sein, verglichen. **Fig. 2** hierin zeigt die konservierten Reste zwischen B.-amyloliquefaciens-Subtilisin und B.-lentus-Subtilisin. Nach dem Abgleichen der konservierten Reste, was notwendige Insertionen und Deletionen ermöglicht, um die Abgleichung aufrechtzuerhalten (d. h. die Eliminierung konservierter Reste durch willkürliche Deletion und Insertion vermeidet), werden die Reste, die zu bestimmten Aminosäuren in der Primärsequenz von Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin äquivalent sind, definiert. Die Abgleichung konservierter Reste sollte vorzugsweise 100% solcher Reste konservieren. Es ist jedoch auch eine Abgleichung von mehr als 75% oder von nur 50% der konservierten Reste adäquat, um äquivalente Reste zu definieren. Die Konservierung der katalytischen Triade Asp32/His64/Ser221 sollte aufrechterhalten bleiben.

[0030] In **Fig. 3** beispielsweise sind die Aminosäuresequenzen von Subtilisin aus Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis (carlsbergensis) und Bacillus lentus abgeglichen, um das maximale Ausmaß an Homologie zwischen Aminosäuresequenzen bereitzustellen. Ein Vergleich dieser Sequenzen zeigt, dass zahlreiche konservierte Reste in jeder Sequenz enthalten sind. Diese konservierten Reste (wie beispielsweise zwischen BPN' und B. lentus) sind in **Fig. 2** identifiziert.

[0031] Diese konservierten Reste können somit verwendet werden, um die entsprechenden äquivalenten Aminosäurereste von Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin in anderen Carbonyl-Hydrolasen, wie beispielsweise in Subtilisin aus Bacillus lentus (PCT-Veröffentlichung Nr. WO 89/06279, veröffentlicht am 13. Juli 1989), das bevorzugte Subtilisinvorläuferenzym hierin, oder in dem als PB92 bezeichneten Subtilisin (EP 0.328.299), das stark homolog mit dem bevorzugten Bacillus-lentus-Subtilisin ist, zu definieren. Die Aminosäuresequenzen von bestimmten dieser Subtilisine werden in den **Fig. 3A** und **Fig. 3B** mit der Sequenz von Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin abgeglichen, um die maximale Homologie konservierter Reste herzustellen. Es ist ersichtlich, dass im Vergleich zu Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin zahlreiche Deletionen in der Sequenz von Bacillus lentus vorhanden sind. Somit ist beispielsweise die äquivalente Aminosäure für Val165 in Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin in den anderen Subtilisinen Isoleucin für B. lentus und B. licheniformis.

[0032] Somit ist beispielsweise die Aminosäure an Position +76 sowohl in B.-amyloliquefaciens- und B.-lentus-Subtilisinen Asparagin (N). In der Subtilisinvariante der Erfindung ist jedoch die Aminosäure, die äquivalent zu +76 in Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin ist, durch Aspartat (D) ersetzt. Ein Vergleich bestimmter Aminosäurereste, die hierin für Substitutionen bzw. die am meisten bevorzugte Substitution für jede dieser Positionen identifiziert sind, ist in Tabelle I zur Veranschaulichung bereitgestellt.

Tabelle I

	+76	+99	+101	+103	+104	+107	+123
B. amyloliquefaciens (Wildtyp)	N	D	S	Q	Y	I	N
B. lentus (Wildtyp)	N	S	S	S	V	I	N
Am meisten bevorzugte Substitution	D	D	R	A	I/Y	V	S

[0033] Äquivalente Reste können auch durch Bestimmen von Homologie auf dem Niveau der Tertiärstruktur für eine Vorläufer-Carbonyl-Hydrolase definiert werden, deren Tertiärstruktur durch Röntgenkristallographie bestimmt wurde. Äquivalente Reste werden als solche definiert, für die die Atomkoordinaten von zwei oder mehreren der Hauptkettenatome eines bestimmten Aminosäurerests der Vorläufer-Carbonyl-Hydrolase und von Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin (N an N, CA an CA, C an C und O an O) innerhalb von 0,13 nm, und vorzugsweise innerhalb von 0,1 nm, nach der Abgleichung liegen. Abgleichung wird erreicht, nachdem das beste Modell ausgerichtet und positioniert wurde, um die maximale Überlappung der Atomkoordinaten von Nicht-Wasserstoff-Proteinatomen der betreffenden Carbonyl-Hydrolase mit dem Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin zu erlangen. Das beste Modell ist das kristallographische Modell, das den geringsten R-Faktor für experimentelle Beugungsdaten bei der höchsten zu erreichenden Auflösung ergibt.

$$\text{R-Faktor} = \frac{\Sigma_h |Fo(h)| - |Fc(h)|}{\Sigma_h |Fo(h)|}$$

[0034] Äquivalente Reste, die funktionell analog zu einem spezifischen Rest von Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin sind, sind als solche Aminosäuren der Vorläufer-Carbonyl-Hydrolasen definiert, die eine Konformation so annehmen können, dass sie die Proteinstruktur, Substratbindung oder Katalyse entweder verändern, modifizieren oder einen Beitrag dazu leisten, und dies auf eine Weise, die für einen spezifischen Rest des Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisins definiert und ihm zugesprochen wird. Weiters sind diese Reste der Vorläufer-Carbonyl-Hydrolase (für die durch Röntgenkristallographie eine Tertiärstruktur erhalten wurde), die eine analoge Position in solch einem Ausmaß einnehmen, dass, obwohl die Hauptkettenatome des betreffenden Restes die Kriterien der Äquivalenz auf Grundlage der Einnahme einer homologen Position nicht erfüllen, die Atomkoordinaten von zumindest zwei der Seitenkettenatome des Rests innerhalb von 0,13 nm der entsprechenden Seitenkettenatome von Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin liegen. Die Koordinaten der dreidimensionalen Struktur von Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin sind in der EPA-Veröffentlichung Nr. 0.251.446 (die der US-Patent-Anmeldung SN 08/212.291 entspricht) beschrieben und können, wie zuvor erläutert, verwendet werden, um äquivalente Reste auf der Ebene der Tertiärstruktur zu bestimmen.

[0035] Manche der Reste, die für Substitution identifiziert wurden, sind konservierte Reste, während dies andere nicht sind. Im Fall von Resten, die keine konservierten Reste sind, ist die Ersetzung einer oder mehrerer Aminosäuren auf Substitutionen eingeschränkt, die eine Variante mit einer Aminosäuresequenz produzieren, die keiner natürlich vorkommenden Aminosäuresequenz entspricht. Im Fall von konservierten Resten sollten solche Ersetzungen nicht zu einer natürlich vorkommenden Sequenz führen. Die Carbonyl-Hydrolase-Varianten der vorliegenden Erfindung umfassen die reifen Formen von Carbonyl-Hydrolase-Varianten sowie die Pro- und Präpro-Formen solcher Hydrolasevarianten. Die Präpro-Formen sind die bevorzugte Konstruktion, da sie die Expression, Sekretion und Reifung der Carbonyl-Hydrolase-Varianten erleichtern.

[0036] "Prosequenz" bezieht sich auf eine Sequenz von Aminosäuren, die an den N-terminalen Abschnitt der reifen Form einer Carbonyl-Hydrolase gebunden ist und die, wenn sie entfernt wird, zum Auftreten der "reifen" Form der Carbonyl-Hydrolase führt. Zahlreiche proteolytische Enzyme werden in der Natur als Translations-Proenzymprodukte gefunden und werden, bei nicht vorhandener post-translationaler Verarbeitung, in dieser Form exprimiert. Eine bevorzugte Prosequenz zur Herstellung von Carbonyl-Hydrolase-Varianten, spezifisch Subtilisinvarianten, ist die mutmaßliche Prosequenz von Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin, obwohl

andere Subtilisin-Prosequenzen auch verwendet werden können. In den Beispielen 1 und 2 wurde die mutmaßliche Prosequenz vom Subtilisin von Bacillus lentus (ATCC 21.536) verwendet.

[0037] Eine "Signalsequenz" oder "Präsequenz" bezieht sich auf jede beliebige Sequenz von Aminosäuren, die an den N-terminalen Abschnitt einer Carbonyl-Hydrolase oder den N-terminalen Abschnitt einer Prohydrolase gebunden ist und an der Sekretion der reifen Form oder Pro-Formen der Hydrolase beteiligt sein kann. Diese Definition von Signalsequenz ist eine funktionelle Definition, die all jene Aminosäuresequenzen einschließen soll, die durch den N-terminalen Abschnitt des Subtilisin-Gens oder anderer sekretierbarer Carbonyl-Hydrolasen, die an der Bewirkung der Sekretion von Subtilisin oder anderen Carbonyl-Hydrolasen unter nativen Bedingungen beteiligt sind, kodiert werden. Die vorliegende Erfindung verwendet solche Sequenzen, um die Sekretion der Carbonyl-Hydrolase-Varianten wie hierin definiert zu bewirken. Eine bevorzugte Signalsequenz, die in den Beispielen verwendet wird, umfasst die ersten sieben Aminosäurereste der Signalsequenz aus Bacillus-subtilis-Subtilisin, kondensiert an den Rest der Signalsequenz des Subtilisins aus Bacillus lentus (ATCC 21.536).

[0038] Eine "Präproform" einer Carbonyl-Hydrolase-Variante besteht aus der reifen Form der Hydrolase mit einer Prosequenz, die operabel an den Amino-Terminus der Hydrolase gebunden ist, und eine "Prä"- oder "Signal"-Sequenz, die operabel an den Aminoterminus der Prosequenz gebunden ist.

[0039] "Expressionsvektor" bezieht sich auf ein DNA-Konstrukt, das eine DNA-Sequenz enthält, die operabel an eine geeignete Kontrollsequenz gebunden ist, die in der Lage ist, die Expression der DNA in einem geeigneten Wirt zu bewirken. Solche Kontrollsequenzen umfassen einen Promotor, um Transkription zu bewirken, eine optionale Operatorsequenz, um solche Transkription zu kontrollieren, eine Sequenz, die für geeignete mRNA-Ribosom-Bindungsstellen kodiert, und Sequenzen, die den Abschluss von Transkription oder Translation kontrollieren. Der Vektor kann ein Plasmid, ein Phagenteilchen oder einfach ein potentielles Genominsert sein. Nachdem er in einen geeigneten Wirt transformiert wurde, kann sich der Vektor replizieren und unabhängig vom Wirtsgenom funktionieren, oder er kann sich in manchen Fällen in das Genom selbst integrieren. In der vorliegenden Beschreibung werden manchmal "Plasmid" und "Vektor" synonym verwendet, da gegenwärtig Plasmid die am häufigsten verwendete Form von Vektoren ist. Dennoch soll die Erfindung solche anderen Formen von Expressionsvektoren ebenfalls einbinden, die äquivalente Funktionen ausüben und die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind oder im Begriffe sind, bekannt zu werden.

[0040] Die in der vorliegenden Erfindung verwendeten "Wirtszellen" sind im Allgemeinen prokaryotische oder eukaryotische Wirte, die vorzugsweise durch die im US-Patent 4.760.025 (RE 34.606) offenbarten Verfahren so manipuliert wurden, dass sie die Fähigkeit verloren, enzymatisch aktive Endoprotease zu sekretieren. Eine bevorzugte Wirtszelle zur Expression von Subtilisin ist der Bacillus-Stamm BG2036, dem enzymatisch aktive neutrale Protease und alkalische Protease (Subtilisin) fehlen. Die Konstruktion von Stamm BG2036 wird im US-Patent 5.264.366 detailliert beschrieben. Andere Wirtszellen zur Expression von Subtilisin umfassen Bacillus subtilis I168 (auch im US-Patent 4.760.025 (RE 34.606) und US-Patent 5.264.366 beschrieben) sowie jeden beliebigen geeigneten Bacillus-Stamm wie beispielsweise B. licheniformis, B. lentus usw.

[0041] Wirtszellen werden mit Vektoren transformiert oder transfiziert, die unter Verwendung von DNA-Rekombinationsverfahren konstruiert werden. Solche transformierten Wirtszellen sind in der Lage, entweder Vektoren zu replizieren, die für die Carbonyl-Hydrolase-Varianten kodieren, oder die erwünschte Carbonyl-Hydrolase-Variante zu exprimieren. Im Fall von Vektoren, die für die Prä- oder Präproform der Carbonyl-Hydrolase-Variante kodieren, werden solche Varianten, wenn sie exprimiert werden, typischerweise aus der Wirtszelle in das Wirtszellmedium sekretiert.

[0042] "Operabel verbunden" bedeutet in der Beschreibung der Beziehung zwischen zwei DNA-Regionen einfach, dass sie miteinander funktionell verbunden sind. Beispielsweise ist eine Präsequenz operabel an ein Peptid gebunden, wenn sie als eine Signalsequenz funktioniert, wobei sie an der Sekretion der reifen Form des Proteins beteiligt ist, die u. a. sehr wahrscheinlich die Spaltung der Signalsequenz umfasst. Ein Promotor ist an eine Codiersequenz dann operabel gebunden, wenn er die Transkription der Sequenz steuert; eine Ribosom-Bindungsstelle ist operabel an eine Codiersequenz gebunden, wenn sie so positioniert ist, dass sie Translation ermöglicht.

[0043] Die Gene, die für die natürlich vorkommende Vorläufer-Carbonyl-Hydrolase kodieren, können unter Einsatz der allgemeinen Verfahren, die Fachleuten bekannt sind, erhalten werden. Diese Verfahren umfassen im Allgemeinen das Synthetisieren markierter Sonden, die Sequenzen aufweisen, die mutmaßlich für Regionen der Hydrolase von Interesse kodieren, das Herstellen genomischer Bibliotheken aus Organismen, die die

Hydrolase exprimieren, und das Screenen der Bibliotheken auf das Gen von Interesse durch Hybridisieren der Sonden. Positiv hybridisierende Klone werden anschließend kartiert und sequenziert. Das B.-lentus-Gen, das in den Beispielen verwendet wurde, wurde wie in Beispiel 1 des US-Patents 5.185.258 beschrieben kloniert. Das in Beispiel 5 verwendete BPN'-Gen wurde wie in Beispiel 1 in der RE 34.606 kloniert.

[0044] Die klonierte Carbonyl-Hydrolase wird dann verwendet, um eine Wirtszelle zu transformieren, sodass sie die Hydrolase exprimiert. Das Hydrolasegen wird anschließend in ein Plasmid mit hoher Kopienzahl ligiert. Dieses Plasmid repliziert sich im Wirt, was bedeutet, dass es die bekannten Elemente enthält, die für Plasmidreplikation notwendig sind: einen Promotor, der operabel an das betreffende Gen gebunden ist (der in Form des Gen-eigenen homologen Promotors bereitgestellt werden kann, sofern er durch den Wirt erkannt, d. h. transkribiert, wird), eine Transkriptionsterminations- und Polyadenylierungsregion (die für Stabilität der mRNA erforderlich ist, die durch den Wirt aus dem Hydrolasegen in bestimmten eukaryotischen Wirtszellen transkribiert wird), die exogen ist oder durch die endogene Terminationsregion des Hydrolasegens bereitgestellt wird, und wünschenswerterweise ein Selektionsgen wie beispielsweise ein Antibiotikum-Resistenzgen, das kontinuierliche Aufrechterhaltung in Kultur von Plasmid-infizierten Wirtszellen durch Wachstum in Antibiotika-hältigem Medium ermöglicht. Plasmide mit hoher Kopienzahl enthalten auch einen Replikationsstartpunkt des Wirts, wodurch ermöglicht wird, dass große Anzahlen von Plasmiden im Zytoplasma ohne chromosomale Einschränkungen gebildet werden. Es liegt jedoch innerhalb des vorliegenden Schutzumfangs, vielfache Kopien des Hydrolasegens in Wirtsgenom zu integrieren. Dies wird durch prokaryotische und eukaryotische Organismen erleichtert, die besonders empfänglich für homologe Rekombination sind.

[0045] Die in den vorliegenden Beispielen verwendeten Gene sind ein natürliches B.-lentus-Gen und ein natürliches B.-amyloliquefaciens-Gen. Alternativ dazu kann ein synthetisches Gen, das für eine natürlich vorkommende oder mutierte Vorläufer-Carbonyl-Hydrolase (Subtilisin) kodiert, hergestellt werden. In solch einer Ausführungsform wird die DNA- und/oder Aminosäuresequenz der Vorläufer-Hydrolase (Subtilisin) bestimmt. Vielfache, sich überlappende, synthetische einzelsträngige DNA-Fragmente werden hiernach synthetisiert, die bei Hybridisierung und Ligation eine synthetische DNA produzieren, die für die Vorläufer-Hydrolase kodiert. Ein Beispiel für synthetische Genkonstruktion wird in Beispiel 3 des US-Patents 5.204.015 gegeben.

[0046] Nachdem das natürlich vorkommende oder synthetische Vorläufer-Carbonyl-Hydrolasegen kloniert wurde, werden zahlreiche Modifikationen vorgenommen, um die Verwendung des Gens über die Synthese der natürlich vorkommenden Vorläufer-Carbonyl-Hydrolase hinaus zu fördern. Solche Modifikationen umfassen die Bildung rekombinanter Carbonyl-Hydrolasen, wie im US-Patent 4.760.025 (RE 34.606) und der EPA-Veröffentlichung Nr. 0.251.446 offenbart wird, und die Bildung von Carbonyl-Hydrolase-Varianten, die hierin beschrieben werden.

[0047] Das folgende Kassetten-Mutageneseverfahren kann verwendet werden, um die Konstruktion und Identifikation der Carbonyl-Hydrolase-Varianten der vorliegenden Erfindung zu erleichtern, wobei auch andere Verfahren, einschließlich ortsgerichteter Mutagenese, verwendet werden können. Zuerst wird das natürlich vorkommende Gen, das für die Hydrolase kodiert, gewonnen und gänzlich oder teilweise sequenziert. Anschließend wird die Sequenz auf einen Punkt gescannt, an dem eine Mutation (Deletion, Insertion oder Substitution) einer oder mehrerer Aminosäuren im kodierten Enzym erwünscht ist. Die Sequenzen, die diesen Punkt flankieren, werden auf Gegenwart von Restriktionsstellen untersucht, die ein kurzes Segment des Gens mit einem Oligonucleotid-Pool ersetzen, der, wenn er exprimiert wird, für verschiedene Mutanten kodiert. Solche Restriktionsstellen sind vorzugsweise nur einmal vorkommende Stellen innerhalb des Hydrolasegens, die die Ersetzung des Gensegments erleichtern. Es kann jedoch jede beliebige Restriktionsstelle, die nicht übermäßig redundant im Hydrolasegen vorhanden ist, verwendet werden, mit der Maßgabe, dass die Genfragmente, die durch Restriktionsverdau gebildet werden, wieder in korrekter Sequenz zusammengefügt werden können. Sind keine Restriktionsstellen an Stellen innerhalb einer geeigneten Distanz vom ausgewählten Punkt (von 10 bis 15 Nucleotiden) vorhanden, so müssen solche Stellen durch Substitution von Nucleotiden im Gen auf solch eine Weise gebildet werden, dass weder der Leseraster noch die kodierten Aminosäuren im Endkonstrukt verändert werden. Mutation des Gens, um seine Sequenz zu ändern, um die erwünschte Sequenz -auszubilden, erfolgt durch M13-Primer-Extension gemäß allgemein bekannten Verfahren. Die Aufgabe des Lokalisierens geeigneter Flankierungsregionen und des Bewertens der erforderlichen Änderungen, um zwei geeignete Restriktionsstellen-Sequenzen zu erhalten, ist durch die Redundanz des genetischen Codes, eine Restriktionsenzym-Karte des Gens und die große Anzahl verschiedener Restriktionsenzyme alltägliche Routine. Es gilt anzumerken, dass, sofern eine geeignete Flankierungsrestriktionsstelle erhältlich ist, das zuvor beschriebene Verfahren nur in Verbindung mit der Flankierungsregion verwendet werden muss, die keine entsprechende Stelle aufweist.

[0048] Nachdem die natürlich vorkommende DNA oder synthetische DNA kloniert wurde, werden die Restriktionsstellen, die die zu mutierenden Positionen flankieren, mit den zugehörigen Restriktionsenzymen verdaut, und zahlreiche End-Terminikomplementäre Oligonucleotidkassetten werden in das Gen ligiert. Die Mutagenese wird durch dieses Verfahren vereinfacht, da alle Oligonucleotide so synthetisiert werden können, dass sie dieselben Restriktionsstellen aufweisen und keine Linker notwendig sind, um die Restriktionsstellen zu schaffen.

[0049] Wie hierin verwendet ist proteolytische Aktivität als die Hydrolyserate von Peptidbindungen pro Milligramm Aktivenzym definiert. Es bestehen zahlreiche bekannte Verfahren zur Messung von proteolytischer Aktivität (K. M. Kalisz, "Microbial Proteinases", Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, A. Fiechter (Hrsg.) (1988)). Zusätzlich zur verbesserten Waschleistung können die verschiedenen Enzyme der vorliegenden Erfindung andere modifizierte Eigenschaften wie beispielsweise K_m, k_{cat}, k_{cat}/K_m-Verhältnis und/oder modifizierte Substratspezifität, modifizierte proteolytische Aktivität und/oder modifiziertes pH-Aktivitätsprofil aufweisen. Diese Enzyme können für das bestimmte Substrat, von dem angenommen wird, dass es vorhanden ist, zugeschnitten werden.

[0050] Die variierte Carbonyl-Hydrolase kann im Vergleich zu der Vorläufer-Carbonyl-Hydrolase veränderte proteolytische Aktivität aufweisen, da das Steigern dieser Aktivität (zahlenmäßig größer) eine Verwendung des Enzyms ermöglicht, bei der es auf ein Zielsubstrat wirksameren Einfluss hat. Auch sind variierte Enzyme von Interesse, die im Vergleich mit dem Vorläufer veränderte Wärmestabilität und/oder veränderte Substratspezifität aufweisen. Die zu mutierende Carbonyl-Hydrolase ist ein Subtilisin. Diese zwei Bezeichnungen werden in dieser Beschreibung synonym verwendet.

[0051] Ausführungsformen der Erfindung werden in den Beispielen beschrieben. Diese umfassen die folgenden spezifischen Kombinationen substituierter Reste: N76D/V104I; N76D/S99D/V104I; N76D/S103A/V104I; N76D/V104I/I107V; N76D/V104Y/I107V und N76D/S101R/S103A/V104I. In den Beispielen werden auch alle mutierten Kombinationen, die spezifisch in der vorliegenden Erfindung beansprucht werden, beschrieben. Diese Substitutionen werden vorzugsweise in Bacillus-lentus-(rekombinanter oder nativer Typ)Subtilisin ausgeführt, wobei die Substitutionen auch in jedem beliebigen anderen Bacillus-Subtilisin ausgeführt werden können.

[0052] Die Carbonyl-Hydrolase-Varianten der Erfindung sind beim Formulieren verschiedener Waschmittelzusammensetzungen nützlich. Zahlreiche bekannte Verbindungen sind geeignete Tenside, die in Zusammensetzungen nützlich sind, die die Carbonyl-Hydrolase-Mutanten der Erfindung umfassen. Diese umfassen nichtionische, anionische, kationische, anionische oder zwitterionische Detergenzien, wie sie in der US 4.404.128, erteilt an Barry J. Anderson, und der US 4.261.868, erteilt an Jiri Flora et al., offenbart sind. Eine geeignete Waschmittelformulierung wird in Beispiel 7 des US-Patents 5.204.015 beschrieben. Auf dem Gebiet der Erfindung ist man mit den verschiedenen Formulierungen vertraut, die als Reinigungszusammensetzungen verwendet werden können. Zusätzlich zu typischen Reinigungszusammensetzungen gilt es zu verstehen, dass die Subtilisinvarianten der vorliegenden Erfindung für jeden beliebigen Zweck verwendet werden können, für den native oder Wildtyp-Subtilisine verwendet werden. Somit können diese Varianten beispielsweise in Anwendungen mit Fest- oder Flüssigseife, Geschirrspülformulierungen, Reinigungslösungen oder -produkte für Kontaktlinsen, zur Peptidhydrolyse, Abfallverwertung, bei Textilanwendungen, als Fusions-Spaltungs-Enzyme in der Proteinherstellung usw. verwendet werden. Die Varianten der vorliegenden Erfindung zeigen verbesserte Leistung einer Waschmittelzusammensetzung (im Vergleich zum Vorläufer). Wie hierin verwendet ist verbesserte Leistung eines Waschmittels als eine erhöhte Reinigungskraft gegen bestimmte Enzym-empfindliche Flecken wie beispielsweise Gras oder Blut definiert, die mittels herkömmlicher Bewertung nach einem Standard-Waschgang bestimmt wird.

[0053] Subtilisine der Erfindung können zu bekannten pulverförmigen und flüssigen Detergenzien mit einem pH zwischen 6,5 und 12,0 mit Konzentrationen von etwa 0,01 Gew.-% bis etwa 5 Gew.-% (vorzugsweise 0,1 Gew.-% bis 0,5 Gew.-%) formuliert werden. Diese Waschmittel-Reinigungszusammensetzungen können auch andere Enzyme wie beispielsweise bekannte Proteasen, Amylasen, Cellulasen, Lipasen oder Endoglycosidasen sowie Aufbaumittel und Stabilisatoren umfassen.

[0054] Der Zusatz von Subtilisinen der Erfindung zu herkömmlichen Reinigungszusammensetzungen schafft keinerlei spezifische Einschränkung des Verwendungsbereichs. In anderen Worten ist jede Temperatur und jeder pH, der für das Detergens geeignet ist, auch für die vorliegenden Zusammensetzungen geeignet, solange der pH innerhalb des zuvor genannten Bereichs liegt und die Temperatur unter der beschriebenen Subtilisin-denaturierenden Temperatur liegt. Darüber hinaus können Subtilisine der Erfindung in einer Reinigungszu-

sammensetzung ohne Detergens verwendet werden, wiederum entweder alleine oder in Kombination mit Aufbaumitteln und Stabilisatoren.

[0055] Im Folgenden werden Beispiele der Erfindung dargestellt, die nicht als Einschränkung des Schutzumfangs der Ansprüche zu verstehen sind.

Beispiel 1

Konstruktion zur Expression des GG36-Gens in B. subtilis

[0056] Das Klonieren und die Konstruktion zur Expression des Subtilisingens aus B. lentus erfolgte im Wesentlichen auf dieselbe Weise wie im US-Patent 5.185.258 beschrieben. Das Plasmid GGA274 (hierin in **Fig. 4** beschrieben) wurde auf die folgende Weise, gezeigt in **Fig. 5**, weiter modifiziert. Die PstI-Stelle, die während der Konstruktion des GGA274-Plasmids eingeführt wurde, wurde durch die Oligonucleotid-gerichtete Mutagenese, die nachstehend beschrieben wird, entfernt, wobei ein Oligonucleotid die folgende Sequenz aufwies: 5' GAAGCTGCAACTCGTTAAA 3' (Seq.-ID Nr. 1). Der unterstrichene "A"-Rest eliminierte die Erkennungssequenz von Restriktionsenzym PstI und änderte den entsprechenden Aminosäurerest von Alanin zu Threonin an Position 274. Threonin an Position 274 ist der Wildtyp-Rest, der ursprünglich in den klonierten B.-lentus-Subtilisin-Gensequenzen gefunden wurde. Das für Subtilisin kodierende DNA-Segment wurde durch EcoRI- und BamHI-Verdau aus dem Plasmid GGA274 oder seinen Derivaten (GGT274, gezeigt in **Fig. 5**) exzidiert. Das DNA-Fragment wurde zurück in Bakteriophagen-M13-basierte Vektoren, wie MP19, zur Mutagenese subkloniert. Nach der Mutagenese wurden EcoRI- und HindIII-Verdau und anschließendes Klonieren durchgeführt, um das mutierte Subtilisin-Gen zur Expression und zur Gewinnung mutierter Subtilisinproteine zurück in ein Expressionsplasmid wie beispielsweise GGA274 zu verschieben.

Beispiel 2

Oligonucleotid-gerichtete Mutagenese

[0057] Oligonucleotid-gerichtete Mutagenese wurde wie in M. Zoller et al., Methods Enzymol. 100, 468–500 (1983), beschrieben durchgeführt. Als ein Beispiel wurde ein synthetisches Oligonucleotid der Sequenz 5' GCTGCTCTAGACAATTCG 3' (Seq.-ID Nr. 2) verwendet, um den Aminosäurerest an Position 76 von Asparagin (N) zu Asparaginsäure (D), anders ausgedrückt N76D, zu ändern. Die unterstrichenen "G"- und "C"-Reste zeigen Änderungen der Wildtyp-Gensequenz auf. Das CA behält das Leucin an Position +75 und ändert die Aminosäuresequenz, um eine XbaI-Erkennungsstelle des XbaI-Restriktionsenzyms (TCTAGA) einzuführen, während durch die Änderung an GAC Asparagin an +76 gegen Aspartat ausgetauscht wird.

[0058] Zur Mutagenese an den Positionen 99, 101, 103 und 104 können je nach Kombination von erwünschten Mutationen verschiedene Oligonucleotide verwendet werden. Beispielsweise wurde ein Oligonucleotid der Sequenz 5' GTATTAGGGGCGGACGGTCGAGGCGCCATCAGCTCGATT 3' (Seq.-ID Nr. 3) verwendet, um gleichzeitig die folgenden Änderungen durchzuführen: S99D; S101R; S103A und V104I in einem einzelnen Subtilisinmolekül. Demähnlich wurden Oligonucleotide der Sequenz 5' TCAGGTTCGGTCTCGAGCGTTGCCCAAGGATTG 3' (Seq.-ID Nr. 4) und 5' CACGTTGCTAGCTTGAGTTTAG 3' (Seq.-ID Nr. 5) verwendet, um I107V bzw. N123S zu bilden. Hierbei weisen wiederum die unterstrichenen Reste Änderungen an der Wildtyp-Sequenz auf, die erwünschte Änderungen entweder an den Aminosäuresequenzen oder an den Restriktionsenzym-Erkennungssequenzen produzierten.

Beispiel 3

Proteolytische Aktivität von Subtilisinvarianten

[0059] Gemäß den Verfahren aus Beispiel 2 wurden die in Tabelle III aufgelisteten Varianten gebildet. Die proteolytische Aktivität jeder dieser Subtilisinvarianten ist in Tabelle II gezeigt. Die kinetischen Parameter k_{cat}, K_M und k_{cat}/K_M wurden für Hydrolyse des synthetischen Peptidsubstrats Succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-Nitroanilid unter Verwendung des in P. Bonneau et al., J. Am. Chem. Soc. 113(3), 1030 (1991), beschriebenen Verfahrens gemessen. Kurz zusammengefasst wurde eine kleine Aliquote von Subtilisinvarianten-Ausgangslösung einer 1-cm-Küvette, die Substrat, aufgelöst in 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,6, zugesetzt und bei 25°C gehalten. Der Reaktionsfortschritt wurde spektralphotometrisch durch Beobachtung der Absorption des Reaktionsprodukts Para-Nitroanilin bei 410 nm verfolgt. Kinetische Parameter wurden unter Verwendung eines nichtlinearen Regressionsalgorithmus erhalten, um die Reaktionsgeschwindigkeit und die Produktkonzentration für

jede Reaktion an die Michaelis-Menten-Gleichung anzupassen.

Tabelle II
Kinetische Parameter k_{cat}, K_M und k_{cat}/K_M
Gemessen für Bacillus-lentus-Subtilisin und -Varianten

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

[0060] Die in Tabelle II aufgelisteten Ergebnisse weisen darauf hin, dass alle getesteten Subtilisinvarianten proteolytische Aktivität beibehalten. Weiters zeigte eine detaillierte Analyse der Daten, dass die proteolytische Aktivität im Bacillus-lentus-Subtilisin durch die verschiedenen Kombinationen von Substitutionen an Aminosäureresten, die den Positionen 76, 99, 101, 103, 104, 107 und 123 in Bacillus amyloliquefaciens entsprachen, signifikant verändert wurde.

Beispiel 4

Wärmestabilität von Subtilisinvarianten

[0061] Ein Vergleich der Wärmestabilität, die für Bacillus-lentus-Subtilisin und die -Varianten der vorliegenden Erfindung, die durch den Vorgang aus Beispiel 2 gewonnen wurden, beobachtet wurde, ist in Tabelle III gezeigt. Gereinigtes Enzym, 15 µg/ml in 0,1 M Glycin mit 0,01% Tween-80, pH 10,0, mit oder ohne 50 mM $CaCl_2$, wurde in kleine Röhrchen aliquot aufgeteilt und bei 10°C 5 Minuten lang, bei 10°C bis 60°C über 1 Minute lang und bei 60°C 20 Minuten lang inkubiert. Die Röhrchen wurden dann 10 Minuten lang auf Eis platziert. Aliquoten aus den Röhrchen wurden durch Zusatz zu 1-cm-Küvetten, die 1,2 mM synthetisches Peptidsubstrat Succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-Nitroanilid, aufgelöst in 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,6, bei 25°C auf Enzymaktivität getestet. Die anfängliche lineare Reaktionsgeschwindigkeit wurde spektralphotometrisch durch Beobachten der Absorption des Reaktionsprodukts p-Nitroanilin bei 410 nm als eine Funktion der Zeit verfolgt. Die Daten sind als Aktivität in Prozent vor dem Erhitzen dargestellt. Die in Tabelle III aufgelisteten Resultate weisen darauf hin, dass eine große Mehrheit der Varianten Wärmestabilität aufweisen, die unter der Testbedingung mit zugesetzten 50 mM $CaCl_2$ mit jener von Bacillus-lentus-Subtilisin (24 von 26) vergleichbar sind. Unter der

Testbedingung ohne zugesetzte 50 mM $CaCl_2$ ist eine große Mehrheit der Varianten (19 von 26) signifikant stabiler als Bacillus-lentus-Subtilisin. Weiters sind unter der Testbedingung ohne Zusatz von 50 mM $CaCl_2$ die Varianten N76D/S99D, N76D/V104I, N76D/S99D/V104I, N76D/S103A/V104I, N76D/V104I/I107V, N76D/V104Y/I107V und N76D/S101R/S103A/V104I signifikant stabiler als die Einzelsubstitutionsvariante N76D.

Tabelle III
Wärmestabilität, gemessen für Bacillus-lentus-Subtilisin und -Varianten
Bei pH 10, 60°C +/– Zusatz von 50 mM $CaCl_2$

	% Verbleibende anfängliche Aktivität	
Enzym	- $CaCl_2$	+ $CaCl_2$
B.-lentus-Subtilisin	2	96
N76D	34	97
N76D/S99D	49	98
N76D/S103A	26	92
N76D/V104I	58	98
N76D/I107V	32	96
N76D/N123S	0	97
N76D/S99D/S101R	30	100
N76D/S99D/S103A	36	100
N76D/S99D/V104I	48	97
N76D/S101R/S103A	26	100
N76D/S101R/V104I	38	100
N76D/S103A/V104I	58	100
N76D/V104I/I107V	60	97
N76D/V104Y/I107V	48	74
N76D/V104I/N123S	0	98
N76D/I107V/N123S	16	100
N76D/S99D/S101R/S103A	38	100
N76D/S99D/S101R/V104I	33	100
N76D/S99D/S103A/V104I	38	98
N76D/S101R/S103A/V104I	40	99
N76D/S103A/V104I/N123S	1	98
N76D/V104I/I107V/N123S	3	99
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I	36	99
N76D/S99D/S103A/V104I/N123S	2	95
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S	0	100

Beispiel 5

Oligonucleotid-gerichtete Mutagenese mit einzelsträngiger DNA-Matrize, gebildet aus Phagemid

A. Konstruktion von B.-lentus-Varianten

[0062] Die Arbeitsvorschrift zur Mutagenese war im Wesentlichen dieselbe wie zuvor in Beispiel 2 beschrieben. Die einzelsträngige DNA-Matrize wurde durch Phagemidverfahren gebildet. Um den Phagemidvektor zur Bildung der einzelsträngigen DNA-Matrize zu konstruieren, konstruierten die Erfinder zuerst den Vektor pBCDAICAT. Der Ablaufplan der Vektorkonstruktion ist in Fig. 8 dargestellt. Zuerst wurde das ClaI- bis ClaI-Fragment, das für das CAT-Gen aus pC194-Plasmid kodiert (S. Horinouchi & B. Weisblum, J. Bacteriol. 150, 8–15 (1982)), in die AccI-Stelle der Polylinker-Region von pUC19 (New England BioLabs, Beverly, MA) kloniert, um Plasmid pUCCHL zu bilden, und das EcoRI-DraI-0,6-kB-Fragment vom 5'-Ende der für GG36DAI kodierenden DNA wurde in die EcoRI- und EcoRV-Stellen von pBSKS-Plasmid (Stratagene, Inc., San Diego, CA) kloniert, um pBC2SK5 zu bilden. Die einzelne EcoRI-Stelle des Plasmids pBC2SK5 wurde durch EcoRI-Verdau ent-

fernt, woraufhin Füllen in durch T4 katalysierte DNA-Polymerase folgte, sowie neuerliche Ligation, um das Plasmid pBC2SK-5R zu bilden, das keine EcoRI-Stelle aufweist. Das EcoRI-DraI-Fragment, das in pBCSK-5R kloniert wurde, wurde als ein PstI-HindIII-Fragment isoliert und in die PstI-HindIII-Stelle des pUCCHL (Teil des Polylinkers von pUC19) kloniert, um Plasmid pUCCHL5R zu bilden. Die Codiersequenz von GG36DAI-Gen wurde als ein EcoRI-BamHI-Fragment exzidiert und in die EcoRI-BamHI-Stellen von pUCCHL5R kloniert, um pUCCAT zu bilden. Das große EcoRI-HindIII-Fragment von pUCCAT wurde dann in die EcoRI- und HindIII-Stellen von BS2KS+ kloniert, um das Plasmid pBCDAICAT zu bilden.

[0063] Um einzelsträngige DNA zu bilden, wurde E. coli enthaltendes pBCDAICAT mit Phagen R408 (erhalten von Stratagene, San Diego, CA) gemäß der in M. Russel, S. Kidd & M. R. Kelley, GENE 45, 333–338 (1986), beschriebenen Arbeitsvorschrift infiziert. Nachdem die einzelsträngige DNA-Matrize erhältlich war, wurden herkömmliche Mutagenese-Verfahren wie zuvor in Beispiel 2 beschrieben durchgeführt. Die Konstruktion bestimmter Mutanten ist zu veranschaulichenden Zwecken nachstehend im Detail beschrieben.

[0064] Zur Konstruktion von B. lentus (GG36) N76D/S103A/V104I/L217H wurde ein EcoRI-BamHI-DNA-Fragment, das für GG36 N76D/S103A/V104I kodiert, zur Konstruktion von pUCCAT (siehe **Fig. 8**) verwendet, um das Plasmid pBCDAICAT zu bilden. Nachdem die einzelsträngige DNA-Matrize gemäß der zuvor beschriebenen Arbeitsvorschrift gebildet worden war, wurde Mutagenese-Primer mit der folgenden Sequenz

* *** ** x ClaI

5' TAT GCC AGC CAC AAC GGT ACT TCG ATG GCT 3' (Seq.-ID Nr. 13)

verwendet, um das L217H zu bilden. Wie zuvor bezeichnen die unterstrichenen Reste die Nucleotidänderungen, die vorgenommen wurden, und das x ClaI gibt an, dass die bestehende ClaI-Stelle nach der Mutagenese entfernt war. Die Arbeitsvorschrift zur Mutagenese wurde in Beispiel 2 beschrieben. Nach der Mutagenese wurde Plasmid-DNA zuerst auf die Entfernung der ClaI-Stelle gescreent, und jene Klone, denen ClaI-Stelle fehlte, wurden DNA-Sequenzanalyse unterzogen, um die DNA-Sequenz zu überprüfen, die die Änderung L zu H am 217ten Aminosäurerest bewirkte.

B. Konstruktion von BPN'-Varianten und deren Expression in B. subtilis

[0065] Die Konstruktion von B. amyloliquefaciens (BPN') N76D/Q103A/Y104I/Y217L erfolgte mit Ausnahme von zwei nacheinander folgenden Schritten auf ähnliche Weise. N76D wurde zuerst in BPN' Y217L eingeführt, um BPN' N76D/Y217L zu bilden, und eine zweite Mutagenese erfolgte, um BPN' N 76D/Y217L zu BPN' N76D/Q103A/Y104I/Y217L umzusetzen. Um die einzelsträngige DNA-Matrize für die erste Mutagenese zu bilden, wurde ein EcoRI-BamHI-Fragment, das für BPN'-Y217L-Subtilisin (abgeleitet vom Y217L-Plasmid, beschrieben in J. Wells et al., PNAS 84, 5167, 1087) kodierte, verwendet, um ein Plasmid pUCCATFNA (siehe **Fig. 9**) zu bilden. Das pUCCATFNA-Plasmid, das BPN' Y217L enthielt, wurde verwendet, um das pBCFNACAT-Plasmid (**Fig. 9**) zu konstruieren. Einzelsträngige DNA wurde wie zuvor gebildet. Um BPN' N76D/Y217L zu bilden, wurde ein Oligonucleotid-Primer mit der Sequenz

* *** ** x XbaI

5' C ACA GTT GCG GCT CTA GAT AAC TCA ATC GGT G 3' (Seq.-ID Nr. 14)

verwendet, um die Änderung N76D zu bilden. Einzelsträngige DNA wurde anschließend aus dem pBCFNACAT-Plasmid, das das BPN' N76D/Y217L (das pBCFNACAT-Plasmid nach N76D-Mutagenese) enthielt, hergestellt und mit einem anderen Oligonucleotid mit der Sequenz

* *** ** x PvuII

5' GCT GAC GGT TCC GGC GCT ATT AGT TGG ATC ATT 3' (Seq.-ID Nr. 15)

einer Mutagenese unterzogen, um BPN' N76D/Q103A/Y104I/Y217L zu erhalten. Alle Schritte, die in das Klonieren, die Herstellung einzelsträngiger DNA, die Mutagenese und das Screening auf Mutanten eingebunden waren, wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt.

[0066] Expression des BPN'-Gens und seiner Varianten wurde durch Integrieren von Plasmid-DNA (pBCFNACAT, die BPN'-Gen der verschiedenen Varianten enthielt) direkt in einen Protease-defizienten Stamm von Bacillus subtilis wie in RE 34.606 beschrieben erreicht.

[0067] Zahlreiche Varianten wurden wie in den Beschreibungen der Beispiele 2 und 5 hergestellt. Kinetische Daten und Daten zur Stabilität wurden für solche Varianten gewonnen. Die kinetischen Daten wurden unter Verwendung der in Beispiel 3 beschriebenen Verfahren gewonnen und sind in Tabelle IV dargestellt. Die Daten zur Stabilität wurden wie hierin beschrieben gewonnen. Die Resultate sind in Tabelle V gezeigt.

Testverfahren zur Wärmestabilität

[0068] Gereinigtes Enzym wurde in 0,1 M Glycin, pH 10,0, 0,01% Tween-80 durch Auftragen des Enzyms auf eine Säule, die aus Sephadex G-25, äquilibriert mit diesem Puffer, bestand, und Eluieren des Enzyms von der Säule unter Verwendung desselben Puffers Puffer-ausgetauscht.

[0069] Einem Röhrchen, das 0,1 M Glycin, 0,01% Tween-80, pH 10,0, enthielt und auf 60°C temperaturgeregelt war, wurde das Puffer-ausgetauschte Enzym zugesetzt, um eine Enzym-Endkonzentration von 15 µg/ml zu erhalten.

[0070] Aliquoten wurden aus der 60°C-Inkubation zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und unverzüglich durch Zusatz in eine 1-cm-Küvette, die 1,2 mM synthetisches Peptidsubstrat Succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-Nitroanilid, aufgelöst in 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,6, enthielt und bei 25°C temperaturgeregelt war, auf Enzymaktivität untersucht. Die anfängliche lineare Reaktionsgeschwindigkeit wurde spektralphotometrisch durch Beobachten der Absorption des Reaktionsprodukts Para-Nitroanilin bei 410 nm als Funktion der Zeit verfolgt.

[0071] Die Halbwertszeit, die der Zeitdauer für 50%ige Enzyminaktivierung entspricht, wurde aus dem Diagramm 1. Ordnung der Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der Zeit von Inkubation bei 60°C bestimmt.

[0072] Die Daten sind in Tabelle V als Prozentsatz der Halbwertszeit, die für Bacillus-lentus-Subtilisin (GG36) unter identischen Bedingungen bestimmt wurden, dargestellt.

Tabelle IV

Enzym	kcat (s^{-1})	KM (mM)	kcat/KM ($s^{-1}M^{-1}$)
B.-lentus-Subtilisin	170	0.78	2.20E+05
N76D/S103G/V104I*	380	1.4	2.70E+05
N76D/S103A/V104F	730	0.33	2.20E+06
N76D/S103A/V104N	790	2.8	2.80E+05
N76D/S103A/V104S	170	0.83	2.00E+05
N76D/S103A/V104T	370	1.9	2.00E+05
N76D/S103A/V104W	880	0.31	2.80E+06
N76D/S103A/V104Y	690	0.5	1.40E+06
K27R/N76D/V104Y/N123S	500	1.2	4.20E+05
N76D/S101G/S103A/V104I*	620	1.3	4.80E+05
N76D/S103A/V104I/S105A*	550	1.3	4.20E+05
N76D/S103A/V104I/S105D*	440	1.7	2.60E+05
N76D/S103A/V104T/I107A*	120	5.7	2.10E+04
N76D/S103A/V104T/I107L*	310	3.2	9.70E+04
N76D/S103A/V104I/L126A	90	2.2	4.10E+04
N76D/S103A/V104I/L126F	180	1.9	9.50E+04
N76D/S103A/V104I/L126I	100	2.4	4.20E+04
N76D/S103A/V104I/L126V	64	3.2	2.00E+04
N76D/S103A/V104I/S128G*	560	1.7	3.30E+05
N76D/S103A/V104I/S128L*	430	3.8	1.10E+05
N76D/S103A/V104I/L135A	140	0.76	1.80E+05
N76D/S103A/V104I/L135F	390	0.69	5.70E+05
N76D/S103A/V104I/L135I	110	0.73	1.50E+05
N76D/S103A/V104I/L135V	140	0.86	1.60E+05
N76D/S103A/V104I/S156E*	170	2.6	6.50E+04
N76D/S103A/V104I/S166D*	160	3.5	4.60E+04
N76D/S103A/V104I/D197E	510	1.4	3.60E+05
N76D/S103A/V104I/N204A*	530	1.1	4.80E+05
N76D/S103A/V104I/N204G*	580	1.4	4.10E+05
N76D/S103A/V104I/N204C*	370	1.3	2.90E+05
N76/S103A/V104I/P210I*	500	1.2	4.20E+05
N76D/S103A/V104I/L217H*	80	0.63	1.30E+05
N76D/S103A/V104I/M222A	70	3.1	2.30E+04
N76D/S103A/V104I/M222S	80	3.1	2.60E+04
N76D/S103A/V104I/T260P	660	1.5	4.40E+05
N76D/S103A/V104I/S265N	590	1.3	4.50E+05
K27R/N76D/V104Y/I107V/N123S	220	1.4	1.60E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E	430	1.1	3.90E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C	400	1.1	3.60E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L	440	1.2	3.70E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/S216V	440	1.2	3.70E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S	760	0.98	7.80E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/T260P	410	1.2	3.40E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/T274A	390	1	3.90E+05
N76D/S103A/V104I/L126F/S265N	170	2.1	8.10E+04
N76D/S103A/V104I/S156E/S166D*	40	6.3	6.40E+03
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/G197E	410	0.98	4.20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/N218S	540	0.66	8.20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E/N218S	770	0.79	9.80E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C/N218S	610	0.99	6.20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L/N218S	580	0.78	7.40E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T260P	660	1	6.60E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T274A	590	0.89	6.60E+05
K27R/N76D/V104Y/Q109S/N123S/N218S/T274A	520	1	5.20E+05
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/D197E/N218S	460	0.65	7.10E+05
B.-amyloliquefaciens-Subtilisin (BPN')	50	0.14	3.60E+05
BPN'-N76D/Y217L*	380	0.46	8.30E+05

*Diese Mutanten wurden gemäß Beispiel 5 gebildet, alle anderen wurden gemäß Beispiel 2 gebildet

Tabelle V

Enzym	Wärmestabilität (% der Halbwertszeit des nativen Enzyms)
B.-lentus-Subtilisin	100
N76D	590
N76D/S99D	840
N76D/S103A	390
N76D/V104I	660
N76D/I107V	710
N76D/N123S	70
N76D/S99D/S101R	610
N76D/S99D/S103A	590
N76D/S99D/V104I	910
N76D/S101R/S103A	930
N76D/S101R/V104I	500
N76D/S103A/V104I	460
N76D/S103G/V104I*	370
N76D/S103A/V104F	480
N76D/S103A/V104N	230
N76D/S103A/V104S	230
N76D/S103A/V104T	370
N76D/S103A/V104W	280
N76D/S103A/V104Y	400
N76D/V104I/I107V	940
N76D/V104Y/I107V	820
N76D/V104I/N123S	80
N76D/I107V/N123S	150
K27R/N76D/V104Y/N123S	100
N76D/S99D/S101R/S103A	570
N76D/S99D/S101R/V104I	1000
N76D/S99D/S103A/V104I	680
N76D/S101G/S103A/V104I*	390
N76D/S101R/S103A/V104I	470
N76D/S103A/V104I/S105A*	360
N76D/S103A/V104I/S105D*	370
N76D/S103A/V104T/I107A*	270
N76D/S103A/V104T/I107L*	230
N76D/S103A/V104I/N123S	110
N76D/V104I/I107V/N123S	220
N76D/S103A/V104I/L126A	270
N76D/S103A/V104I/L126F	950
N76D/S103A/V104I/L126I	410

N76D/S103A/V104I/L126V	320
N76D/S103A/V104I/S128G*	640
N76D/S103A/V104I/S128L*	760
N76D/S203A/V104I/L235A	230
N76D/S103A/V104I/L135F	200
N76D/S103A/V104I/L135I	510
N76D/S103A/V104I/L135V	500
N76D/S103A/V104I/S156E*	120
N76D/S103A/V104I/S166D*	590
N76D/S103A/V104I/D197E	460
N76D/S103A/V104I/N204A*	230
N76D/S103A/V104I/N204G*	240
N76D/S103A/V104I/N204C*	500
N76D/S103A/V104I/P210I*	1370
N76D/S103A/V104I/L217H*	60
N76D/S103A/V104I/M222A	520
N76D/S103A/V104I/M222S	490
N76D/S103A/V104I/T260P	490
N76D/S103A/V104I/S265N	360
K27R/N76D/V104Y/I107V/N123S	210
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E	120
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C	110
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L	380
K27R/N76D/V104Y/N123S/S216V	140
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S	270
K27R/N76D/V104Y/N123S/T260P	40
K27R/N76D/V104Y/N123S/T274A	60
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I	590
N76D/S99D/S103A/V104I/N123S	110
N76D/S203A/V104I/L126F/S265N	810
N76D/S103A/V104I/S156E/S166D*	220
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/G197E	90
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/N218S	250
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E/N218S	270
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C/N218S	460
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L/N218S	1400
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T260P	310
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T274A	180
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S	90
K27R/N76D/V104Y/Q109S/N123S/N218S/T274A	230
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/D197E/N228S	240
B.-amyloliquefaciens-Subtilisin (BPN')	100
BPN'-N76D/Y217L*	420

*Diese Mutanten wurden gemäß Beispiel 5 gebildet, alle anderen wurden gemäß Beispiel 2 gebildet.

Beispiel 6

Test zur Waschleistung

[0073] Die Waschleistung der in den vorangehenden Beispielen beschriebenen Varianten wurde durch Messen des Entfernens von Flecken aus EMPA-116-(Blut/Milch/Ruß auf Baumwolle)Stoffmustern (Testfabrics, Inc., Middlesex, NJ 07030) bewertet.

[0074] Sechs EMPA-116-Stoffmuster, geschnitten in 3 × 4,5 Zoll mit gezackten Kanten, wurden in jeden Topf eines Model 7243S Terg-O-Tometers (United States Testing Co., Inc., Hoboken, NJ), der 1.000 ml Wasser, 15 gpg Wasserhärte (Ca^{++} : Mg^{++} :: 3 : 1 :: Gew. : Gew.), 7 g Waschmittel und Enzym in geeigneter Menge enthielt, platziert. Die Waschmittelbasis war WFK1-Waschmittel von wfk – Testgewebe GmbH, Adlerstraße 42, Postfach 13 07 62, D-47759 Krefeld, Deutschland.

Komponente	% der Endformulierung
Zeolith A	25 %
Natriumsulfat	25 %
Natriumcarbonatanhydrid	10 %
Lineares Alkylbenzolsulfonat	8,8 %
Alkoholethoxylat (7-8 EO)	4,5 %
Kernseife	3 %
Natriumsilicat (SiO_2:Na_2O::3,3:1)	3 %

[0075] Diesem Basiswaschmittel wurden die folgenden Zusätze beigefügt:

Komponente	% der Endformulierung
Natriumperborat-Monohydrat	13 %
Copolymer (Sokalan CP5)	4 %
TAED (Mykon ATC Green)	3 %
Enzym	0,5 %
Aufheller (Tinopal AMS-GX)	0,2 %

[0076] Natriumperborat-Monohydrat wurde bei Degussa Corporation, Ridgefield-Park, NJ 07660, erworben. Sokalan CP5 wurde bei BASF Corporation, Parsippany, NJ 07054, erworben. Mykon ATC Green (TAED, Tetraacetylethylendiamin) wurde bei Warwick International, Limited, Mostyn, Holywell, Clwyd CH8 9HE, England, erworben. Tinopal AMS GX wurde bei Ciba-Geigy Corporation, Greensboro, NC 27419, erworben.

[0077] Sechs EMPA-116-Stoffmuster wurden in Waschmittel mit Enzym 30 Minuten lang bei 60°C gewaschen und wurden anschließend zweimal 5 Minuten lang jedes Mal mit 1.000 ml Wasser gespült. Die Enzyme wurden zu Endkonzentrationen von 0,05 bis 1 ppm für Standardkurven und von 0,25 ppm für Routineanalysen zugesetzt. Die Stoffmuster wurden getrocknet und gebügelt, und der Reflexionsgrad der Stoffmuster wurde unter Verwendung des L-Werts auf der L*a*b*-Skala eines Minolta-Chromameters, Modell CR-200 (Minolta Corporation, Ramsey, NJ 07446), gemessen. Die Leistung wird als ein Prozentsatz der Leistung von B.-lentus-(GG36)Protease angegeben und wurde durch Dividieren der Menge von B.-lentus-(GG36)Protease durch die Menge von variierter Protease, die erforderlich war, um dieselbe Fleckenentfernungsleistung zu erbringen, × 100 berechnet. Die Daten sind in Tabelle VI gezeigt.

Tabelle VI

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

Beispiel 7

Proteasestabilität in einer flüssigen Waschmittelformulierung

[0078] Ein Vergleich der Proteasestabilität gegenüber Inaktivierung in einer flüssigen Waschmittelformulierung wurde für Bacillus-lentus-Subtilisin und sein variiertes Enzym N76D/S103A/V104I gemäß dem hierin beschriebenen Verfahren angestellt.

[0079] Die für die Untersuchung verwendete Waschmittelformulierung war eine im Handel erworbene Flasche von Tide Ultra Flüssigwaschmittel, hergestellt in den USA von Procter & Gamble Company. Wärmebehandlung der Waschmittelformulierung war erforderlich, um Protease in situ zu inaktivieren. Dies erfolgte durch Inkubieren des Waschmittels bei 96°C 4,5 Stunden lang. Konzentrierte Präparate des B.-lentus-Subtilisins und der N76D/S103A/V104I-Variante im Bereich von 20 g/l Enzym wurden dem wärmebehandelten Tide Ultra bei Raumtemperatur zu einer Endkonzentration von 0,3 g/l Enzym in der Waschmittellösung zugesetzt. Das wärmebehandelte Waschmittel mit zugesetzter Protease wurde dann in einem Wasserbad, das auf 50°C temperaturgeregelt war, inkubiert. Aliquoten wurden aus den Inkubationsröhrchen bei Zeitintervallen von 0, 24, 46, 76 und 112 Stunden entfernt und durch Zusatz zu einer 1-cm-Küvette, die 1,2 mM synthetisches Peptidsubstrat Suc-Ala-Ala-Pro-phe-p-Nitroanilid, aufgelöst in 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,6, enthielt und auf 25°C temperaturgeregelt war, auf Enzymaktivität getestet. Die anfängliche lineare Reaktionsgeschwindigkeit wurde spektralphotometrisch durch Beobachten der Absorption des Reaktionsprodukts p-Nitroanilin bei 410 nm als eine Funktion der Zeit verfolgt. Wie in **Fig. 10** gezeigt, wurde bei der N76D/S103A/V104I-Variante beobachtet, dass sie signifikant höhere Stabilität gegenüber Inaktivierung zeigte als das native B.-lentus-Enzym. Die geschätzten Halbwertszeiten für Inaktivierung in der Tide-Ultra-Waschmittelformulierung für die zwei Enzyme unter spe-

zifischen Testbedingungen liegen bei 45 Stunden für B.-lentus-Subtilisin und bei 125 Stunden für die N76D/S103A/V104I-Variante.

[0080] In dieser Anmeldung wird auf verschiedene Aminosäuren mittels üblicher Ein- und Dreibuchstabencodes verwiesen. Solche Codes werden in J. W. Dale, Molecular Genetics of Bacteria, John Wiley & Sons, Ltd., Anhang B (1989), angegeben.

[0081] Obwohl hierin die bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung beschrieben wurden, wird Fachleuten, deren Fachgebiet die Erfindung betrifft, erkenntlich sein, dass nach einem umfassenden Verständnis der Erfindung verschiedene Änderungen und äquivalente Modifikationen vorgenommen werden können, ohne den Schutzumfang der Erfindung, wie er in den beiliegenden Ansprüchen definiert ist, zu übertreten.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

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

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: Subtilisinvarianten

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 15

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:
(A) ADRESSAT: Genencor International, Inc.
(B) STRASSE: 180 Kimball Way
(C) STADT: So. San Francisco
(D) BUNDESSTAAT: CA
(E) LAND: USA
(F) POSTLEITZAHL: 94080

(v) COMPUTERLESBARE FORM:
(A) ART DES MEDIUMS: Floppy Disk
(B) COMPUTER: IBM PC-kompatibel
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS / MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release Nr. 1.0, Version Nr. 1.25

(vi) AKTUELLE ANMELDUNGSDATEN:
(A) ANMELDUNGSNUMMER:
(B) EINREICHDATUM: 13. Oktober 1994
(C) KLASSIFIZIERUNG:

(viii) INFORMATIONEN ÜBER ANWALT/VERTRETER:
(A) NAME: Horn, Margaret A.
(B) REGISTRATIONSNUMMER: 33.401
(C) KENNZAHL/ZEICHEN: GC235-2

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSANGABEN:
(A) TELEFON: (415) 742-7536
(B) TELEFAX: (415) 742-7217

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 1:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 19 Basenpaare
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 1:

GAAGCTGCAA CTCGTTAAA 19

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 18 Basenpaare
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 2:

GCTGCTCTAG ACAATTCG 18

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 3:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 39 Basenpaare
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 3:

GTATTAGGGG CGGACGGTCG AGGCGCCATC AGCTCGATT 39

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 4:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 33 Basenpaare
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 4:

TCAGGTTCGG TCTCGAGCGT TGCCCAAGGA TTG 33

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 5:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 22 Basenpaare
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 5:

CACGTTGCTA GCTTGAGTTT AG 22

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 6:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 1.497 Basenpaare
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 6:

```
GGTCTACTAA AATATTATTC CATACTATAC AATTAATACA CAGAATAATC TGTCTATTGG    60
TTATTCTGCA AATGAAAAAA AGGAGAGGAT AAAGAGTGAG AGGCAAAAAA GTATGGATCA   120
GTTTGCTGTT TGCTTTAGCG TTAATCTTTA CGATGGCGTT CGGCAGCACA TCCTCTGCCC   180
AGGCGGCAGG GAAATCAAAC GGGGAAAAGA AATATATTGT CGGGTTTAAA CAGACAATGA   240
GCACGATGAG CGCCGCTAAG AAGAAAGATG TCATTTCTGA AAAAGGCGGG AAAGTGCAAA   300
AGCAATTCAA ATATGTAGAC GCAGCTTCAG TCACATTAAA CGAAAAAGCT GTAAAAGAAT   360

TGAAAAAAGA CCCGAGCGTC GCTTACGTTG AAGAAGATCA CGTAGCACAT GCGTACGCGC   420
AGTCCGTGCC TTACGGCGTA TCACAAATTA AAGCCCCTGC TCTGCACTCT CAAGGCTACA   480
CTGGATCAAA TGTTAAAGTA GCGGTTATCG ACAGCGGTAT CGATTCTTCT CATCCTGATT   540
TAAAGGTAGC AAGCGGAGCC AGCATGGTTC CTTCTGAAAC AAATCCTTTC CAAGACAACA   600
ACTCTCACGG AACTCACGTT GCCGGCACAG TTGCGGCTCT TAATAACTCA ATCGGTGTAT   660
TAGGCGTTGC GCCAAGCGCA TCACTTTACG CTGTAAAAGT TCTCGGTGCT GACGGTTCCG   720
GCCAATACAG CTGGATCATT AACGGAATCG AGTGGGCGAT CGCAAACAAT ATGGACGTTA   780
TTAACATGAG CCTCGGCGGA CCTTCTGGTT CTGCTGCTTT AAAAGCGGCA GTTGATAAAG   840
CCGTTGCATC CGGCGTCGTA GTCGTTGCGG CAGCCGGTAA CGAAGGCACT TCCGGCAGCT   900
CAAGCACAGT GGGCTACCCT GGTAAATACC CTTCTGTCAT TGCAGTAGGC GCTGTTGACA   960
GCAGCAACCA AAGAGCATCT TTCTCAAGCG TAGGACCTGA GCTTGATGTC ATGGCACCTG  1020
GCGTATCTAT CCAAAGCACG CTTCCTGGAA ACAAATACGG GGCGTACAAC GGTACGTCAA  1080
TGGCATCTCC GCACGTTGCC GGAGCGGCTG CTTTGATTCT TTCTAAGCAC CCGAACTGGA  1140
CAAACACTCA AGTCCGCAGC AGTTTAGAAA ACACCACTAC AAAACTTGGT GATTCTTTGT  1200
ACTATGGAAA AGGGCTGATC AACGTACAAG CGGCAGCTCA GTAAAACATA AAAAACCGGC  1260
CTTGGCCCCG CCGGTTTTTT ATTATTTTTC TTCCTCCGCA TGTTCAATCC GCTCCATAAT  1320
CGACGGATGG CTCCCTCTGA AAATTTTAAC GAGAAACGGC GGGTTGACCC GGCTCAGTCC  1380
CGTAACGGCC AACTCCTGAA ACGTCTCAAT CGCCGCTTCC CGGTTTCCGG TCAGCTCAAT  1440
GCCATAACGG TCGGCGGCGT TTTCCTGATA CCGGGAGACG GCATTCGTAA TCGGATC      1497
```

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 7:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 275 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 7:

```
Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Val Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu
1               5                  10                  15

His Ser Gln Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp
            20                  25                  30

Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asp Leu Lys Val Ala Gly Gly Ala
        35                  40                  45

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

Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly
65                  70                  75                  80

Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu
                85                  90                  95

Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu
            100                 105                 110

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

Pro Ser Gly Ser Ala Ala Leu Lys Ala Ala Val Asp Lys Ala Val Ala
    130                 135                 140

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

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

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

Gly Pro Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr
        195                 200                 205

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

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

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

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

Ala Ala Gln
        275
```

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 8:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 275 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 8:

```
Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Ile Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu
1               5                  10                  15

His Ser Gln Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp
            20                  25                  30

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

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

Gly Thr His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly
65                  70                  75                  80

Val Leu Gly Val Ser Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu
                85                  90                  95

Asp Ser Thr Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu
            100                 105                 110

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

Pro Thr Gly Ser Thr Ala Leu Lys Thr Val Val Asp Lys Ala Val Ser
    130                 135                 140

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

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

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

Gly Ser Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr
        195                 200                 205

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

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

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

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

Ala Ala Gln
        275
```

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 9:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 274 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 9:

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

Gln Ala Gln Gly Phe Lys Gly Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp
            20                  25                  30

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

Ser Phe Val Ala Gly Glu Ala Tyr Asn Thr Asp Gly Asn Gly His Gly
    50                  55                  60

Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asp Asn Thr Thr Gly Val
65                  70                  75                  80

Leu Gly Val Ala Pro Ser Val Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Asn
                85                  90                  95

Ser Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Ser Gly Ile Val Ser Gly Ile Glu Trp
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Gln
```

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 10:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 269 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 10:

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

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

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

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

His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu
65                  70                  75                  80

Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala
                85                  90                  95

Ser Gly Ser Gly Ser Val Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala
            100                 105                 110

Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser
        115                 120                 125

Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly
    130                 135                 140

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

Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln
                165                 170                 175

Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile
            180                 185                 190

Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr
        195                 200                 205

Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala
    210                 215                 220

Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile
225                 230                 235                 240

Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu
                245                 250                 255

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

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 11:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 1.140 Basenpaare
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 11:

```
ATGAAGAAAC CGTTGGGGAA AATTGTCGCA AGCACCGCAC TACTCATTTC TGTTGCTTTT    60
AGTTCATCGA TCGCATCGGC TGCTGAAGAA GCAAAAGAAA AATATTTAAT TGGCTTTAAT   120
GAGCAGGAAG CTGTCAGTGA GTTTGTAGAA CAAGTAGAGG CAAATGACGA GGTCGCCATT   180
CTCTCTGAGG AAGAGGAAGT CGAAATTGAA TTGCTTCATG AATTTGAAAC GATTCCTGTT   240
TTATCCGTTG AGTTAAGCCC AGAAGATGTG GACGCGCTTG AACTCGATCC AGCGATTTCT   300
TATATTGAAG AGGATGCAGA AGTAACGACA ATGGCGCAAT CAGTGCCATG GGGAATTAGC   360
CGTGTGCAAG CCCCAGCTGC CCATAACCGT GGATTGACAG GTTCTGGTGT AAAAGTTGCT   420
GTCCTCGATA CAGGTATTTC CACTCATCCA GACTTAAATA TTCGTGGTGG CGCTAGCTTT   480
GTACCAGGGG AACCATCCAC TCAAGATGGG AATGGGCATG GCACGCATGT GGCCGGGACG   540
ATTGCTGCTT TAAACAATTC GATTGGCGTT CTTGGCGTAG CGCCGAGCGC GGAACTATAC   600
GCTGTTAAAG TATTAGGGGC GAGCGGTTCA GGTTCGGTCA GCTCGATTGC CCAAGGATTG   660
GAATGGGCAG GGAACAATGG CATGCACGTT GCTAATTTGA GTTTAGGAAG CCCTTCGCCA   720
AGTGCCACAC TTGAGCAAGC TGTTAATAGC GCGACTTCTA GAGGCGTTCT TGTTGTAGCG   780
GCATCTGGGA ATTCAGGTGC AGGCTCAATC AGCTATCCGG CCCGTTATGC GAACGCAATG   840
GCAGTCGGAG CTACTGACCA AAACAACAAC CGCGCCAGCT TTTCACAGTA TGGCGCAGGG   900
CTTGACATTG TCGCACCAGG TGTAAACGTG CAGAGCACAT ACCCAGGTTC AACGTATGCC   960
AGCTTAAACG GTACATCGAT GGCTACTCCT CATGTTGCAG GTGCAGCAGC CCTTGTTAAA  1020
CAAAAGAACC CATCTTGGTC CAATGTACAA ATCCGCAATC ATCTAAAGAA TACGGCAACG  1080
AGCTTAGGAA GCACGAACTT GTATGGAAGC GGACTTGTCA ATGCAGAAGC GGCAACACGC  1140
```

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 12:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 1.140 Basenpaare
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 12:

```
ATGAAGAAAC CGTTGGGGAA AATTGTCGCA AGCACCGCAC TACTCATTTC TGTTGCTTTT    60
AGTTCATCGA TCGCATCGGC TGCTGAAGAA GCAAAAGAAA AATATTTAAT TGGCTTTAAT   120
GAGCAGGAAG CTGTCAGTGA GTTTGTAGAA CAAGTAGAGG CAAATGACGA GGTCGCCATT   180
CTCTCTGAGG AAGAGGAAGT CGAAATTGAA TTGCTTCATG AATTTGAAAC GATTCCTGTT   240
TTATCCGTTG AGTTAAGCCC AGAAGATGTG GACGCGCTTG AACTCGATCC AGCGATTTCT   300
TATATTGAAG AGGATGCAGA AGTAACGACA ATGGCGCAAT CAGTGCCATG GGGAATTAGC   360
CGTGTGCAAG CCCCAGCTGC CCATAACCGT GGATTGACAG GTTCTGGTGT AAAAGTTGCT   420
GTCCTCGATA CAGGTATTTC CACTCATCCA GACTTAAATA TTCGTGGTGG CGCTAGCTTT   480
GTACCAGGGG AACCATCCAC TCAAGATGGG AATGGGCATG GCACGCATGT GGCCGGGACG   540
ATTGCTGCTT TAGACAACTC GATTGGCGTT CTTGGCGTAG CGCCGAGCGC GGAACTATAC   600
GCTGTTAAAG TATTAGGGGC GAGCGGTTCA GGCGCCATCA GCTCGATTGC CCAAGGATTG   660
GAATGGGCAG GGAACAATGG CATGCACGTT GCTAATTTGA GTTTAGGAAG CCCTTCGCCA   720
AGTGCCACAC TTGAGCAAGC TGTTAATAGC GCGACTTCTA GAGGCGTTCT TGTTGTAGCG   780
GCATCTGGGA ATTCAGGTGC AGGCTCAATC AGCTATCCGG CCCGTTATGC GAACGCAATG   840
GCAGTCGGAG CTACTGACCA AAACAACAAC CGCGCCAGCT TTTCACAGTA TGGCGCAGGG   900
CTTGACATTG TCGCACCAGG TGTAAACGTG CAGAGCACAT ACCCAGGTTC AACGTATGCC   960
AGCTTAAACG GTACATCGAT GGCTACTCCT CATGTTGCAG GTGCAGCAGC CCTTGTTAAA  1020
CAAAAGAACC CATCTTGGTC CAATGTACAA ATCCGCAATC ATCTAAAGAA TACGGCAACG  1080
AGCTTAGGAA GCACGAACTT GTATGGAAGC GGACTTGTCA ATGCAGAAGC GGCAACACGC  1140
```

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 13:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 30 Basenpaare
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 13:

TATGCCAGCC ACAACGGTAC TTCGATGGCT 30

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 14:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 31 Basenpaare
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 14:

CACAGTTGCG GCTCTAGATA ACTCAATCGG T 31

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 15:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 33 Basenpaare
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 15:

GCTGACGGTT CCGGCGCTAT TAGTTGGATC ATT 33

Patentansprüche

1. Subtilisinvariante mit einer nicht in der Natur vorkommenden Aminosäuresequenz, die von einem Vorläufersubtilisin stammt, das Substitutionen umfasst, die N76D/S103A; N76D/V104I; N76D/I107V oder N76D/S99D/S101R von B.-amyloliquefaciens-Subtilisin entsprechen, worin die Subtilisinvariante im Vergleich zum Vorläufersubtilisin verbesserte Waschleistung aufweist.

2. Subtilisinvariante nach Anspruch 1, worin die Subtilisinvarianten Substitutionen umfassen, die N76D/S99D/S103A; N76D/S101R/S103A; N76D/S101R/V104I; N76D/S103A/V104I; N76D/S103G/V104I; N76D/S103A/V104F; N76D/S103A/V104N; N76D/S103A/V104T; N76D/V104I/I107V; N76D/S99D/S101R/S103A; N76D/S99D/S101R/V104I; N76D/S101G/S103R/V104I; N76D/S101R/S103A/V104I; N76D/S103A/V104I/S105A; N76D/S103A/V104T/I107A; N76D/S203A/V104T/I107L; N76D/S103A/V104I/L126F; N76D/S103A/V104I/S128G; N76D/S103A/V104I/L135I; N76D/S103A/V104I/L135V; N76D/S103A/V104I/D197E; N76D/S103A/V104I/N204A; N76D/S103A/V104I/N204G; N76D/S103A/V104I/P210I; N76D/S103A/V104I/T260P oder N76D/S103A/V104I/S265N von B.-amyloliquefaciens-Subtilisin entsprechen.

3. Subtilisinvariante nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, worin das Vorläufersubtilisin ein Bacillus-Subtilisin ist.

4. Subtilisinvariante nach Anspruch 3, worin das Vorläufersubtilisin Bacillus-lentus-Subtilisin ist.

5. DNA, die für eine Subtilisinvariante nach Anspruch 1 oder Anspruch 2 kodiert.

6. Expressionsvektor, der für die DNA nach Anspruch 5 kodiert.

7. Wirtszelle, die mit dem Expressionsvektor nach Anspruch 6 transformiert ist.

Es folgen 20 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

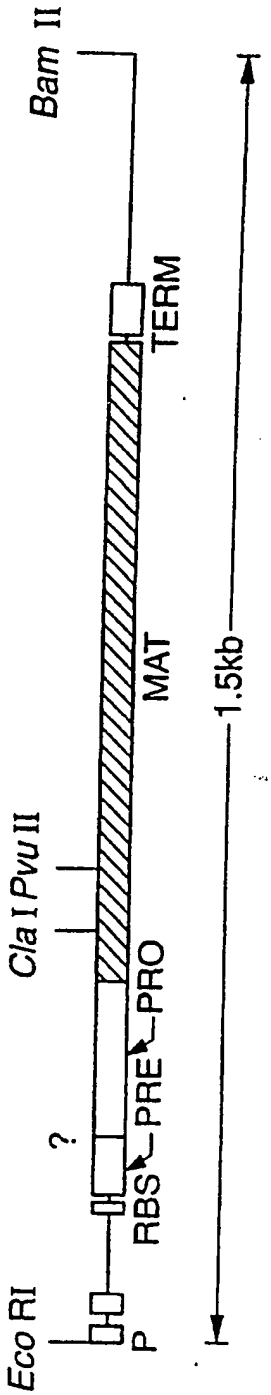


FIG._1A

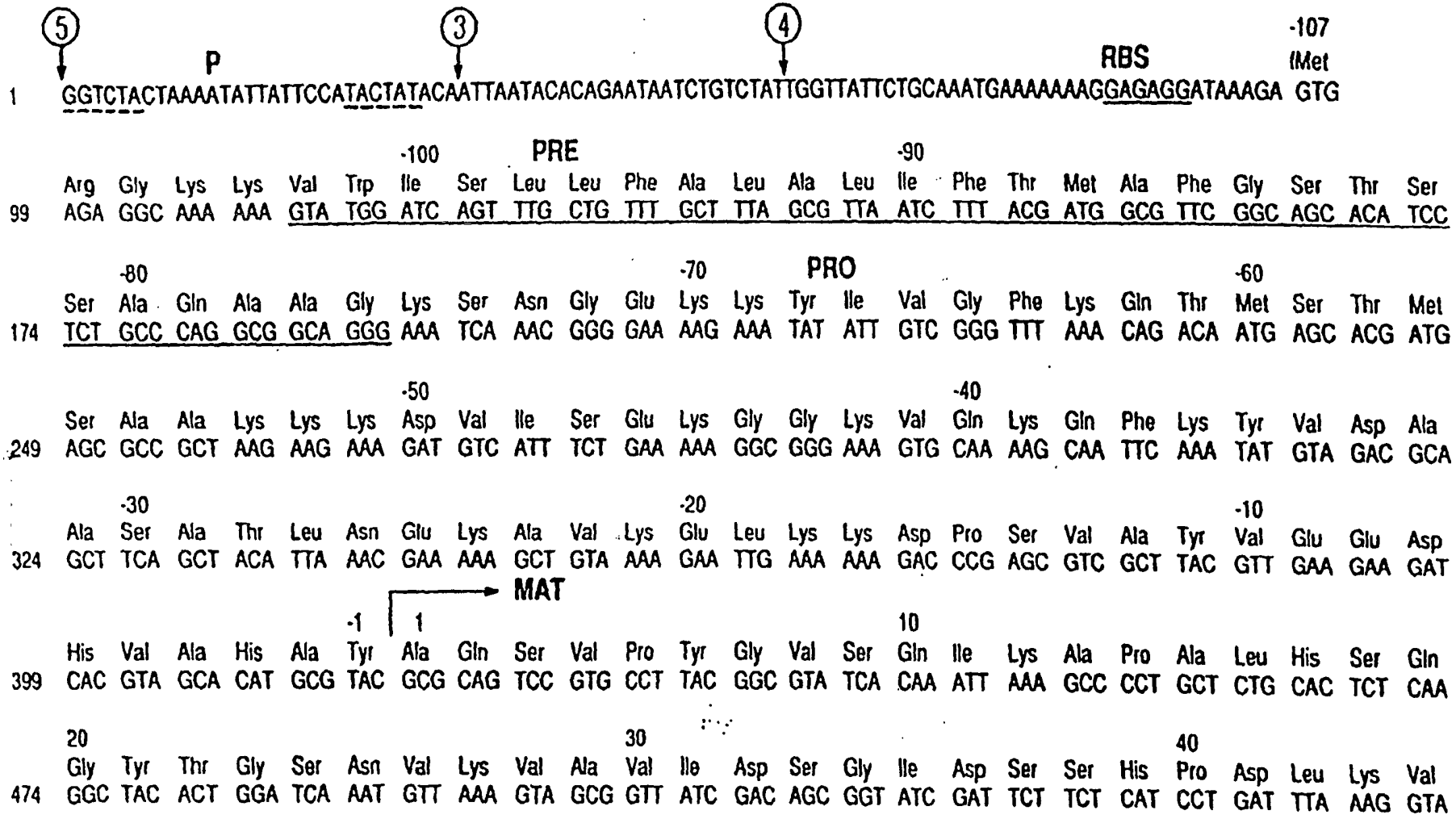


FIG._1B - 1

DE 694 34 187 T2 2005.12.15

						50						Pro	Asn			60	Asp							
	Ala	Gly	Gly	Ala	Ser	Met	Val	Pro	Ser	Glu	Thr	Asn	Pro	Phe	Gln	Asp	Asn	Asn	Ser	His	Gly	Thr	His	Val	Ala
549	GCA	GGC	GGA	GCC	AGC	ATG	GTT	CCT	TCT	GAA	ACA	AAT	CCT	TTC	CAA	GAC	AAC	AAC	TCT	CAC	GGA	ACT	CAC	GTT	GCC
		70									80								Ser	Ala	90				
	Gly	Thr	Val	Ala	Ala	Leu	Asn	Asn	Ser	Ile	Gly	Val	Leu	Gly	Val	Ala	Pro	Ser	Ala	Ser	Leu	Tyr	Ala	Val	Lys
624	GGC	ACA	GTT	GCG	GCT	CTT	AAT	AAC	TCA	ATC	GGT	GTA	TTA	GGC	GTT	GCG	CCA	AGC	GCA	TCA	CTT	TAC	GCT	GTA	AAA
				Asp	Ala	100										110									
	Val	Leu	Gly	Ala	Asp	Gly	Ser	Gly	Gln	Tyr	Ser	Trp	Ile	Ile	Asn	Gly	Ile	Glu	Trp	Ala	Ile	Ala	Asn	Asn	Met
699	GTT	CTC	GGT	GCT	GAC	GGT	TCC	GGC	CAA	TAC	AGC	TGG	ATC	ATT	AAC	GGA	ATC	GAG	TGG	GCG	ATC	GCA	AAC	AAT	ATG
	120										130										140				
	Asp	Val	Ile	Asn	Met	Ser	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Gly	Ser	Ala	Ala	Leu	Lys	Ala	Ala	Val	Asp	Lys	Ala	Val	Ala
774	GAC	GTT	ATT	AAC	ATG	AGC	CTC	GGC	GGA	CCT	TCT	GGT	TCT	GCT	GCT	TTA	AAA	GCG	GCA	GTT	GAT	AAA	GCC	GTT	GCA
						150								Ser	Thr	160									
	Ser	Gly	Val	Val	Val	Val	Ala	Ala	Ala	Gly	Asn	Glu	Gly	Thr	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Thr	Val	Gly	Tyr	Pro	Gly
849	TCC	GGC	GTC	GTA	GTC	GTT	GCG	GCA	GCC	GGT	AAC	GAA	GGC	ACT	TCC	GGC	AGC	TCA	AGC	ACA	GTG	GGC	TAC	CCT	GGT
	170										180										190				
	Lys	Tyr	Pro	Ser	Val	Ile	Ala	Val	Gly	Ala	Val	Asp	Ser	Ser	Asn	Gln	Arg	Ala	Ser	Phe	Ser	Ser	Val	Gly	Pro
924	AAA	TAC	CCT	TCT	GTC	ATT	GCA	GTA	GGC	GCT	GTT	GAC	AGC	AGC	AAC	CAA	AGA	GCA	TCT	TTC	TCA	AGC	GTA	GGA	CCT
						200										210									
	Glu	Leu	Asp	Val	Met	Ala	Pro	Gly	Val	Ser	Ile	Gln	Ser	Thr	Leu	Pro	Gly	Asn	Lys	Tyr	Gly	Ala	Tyr	Asn	Gly
999	GAG	CTT	GAT	GTC	ATG	GCA	CCT	GGC	GTA	TCT	ATC	CAA	AGC	ACG	CTT	CCT	GGA	AAC	AAA	TAC	GGG	GCG	TAC	AAC	GGT
	220										230										240				
	Thr	Ser	Met	Ala	Ser	Pro	His	Val	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Leu	Ile	Leu	Ser	Lys	His	Pro	Asn	Trp	Thr	Asn	Thr
1074	ACG	TCA	ATG	GCA	TCT	CCG	CAC	GTT	GCC	GGA	GCG	GCT	GCT	TTG	ATT	CTT	TCT	AAG	CAC	CCG	AAC	TGG	ACA	AAC	ACT

FIG._1B - 2

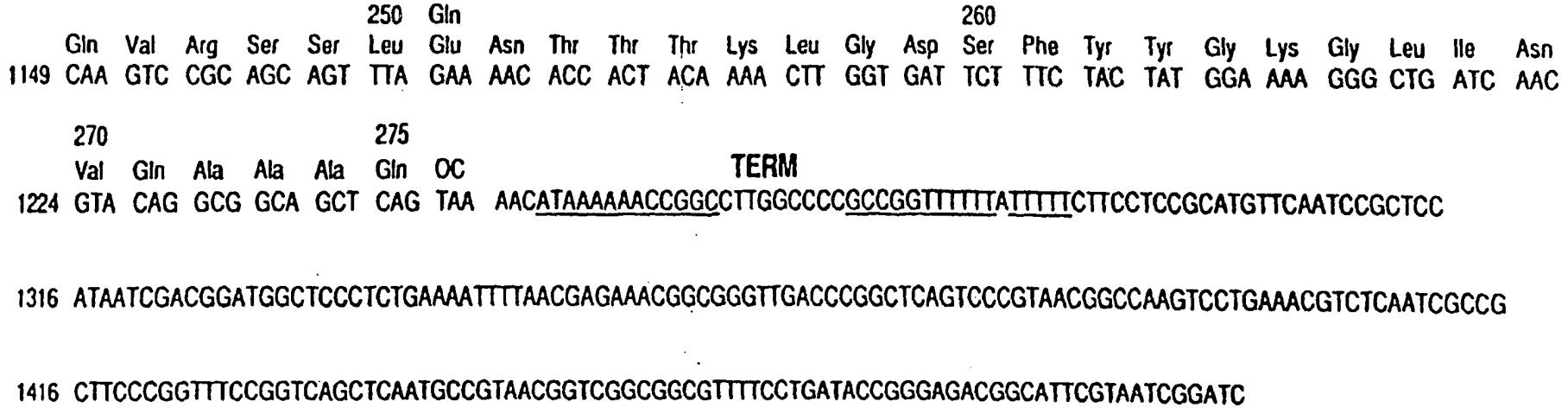
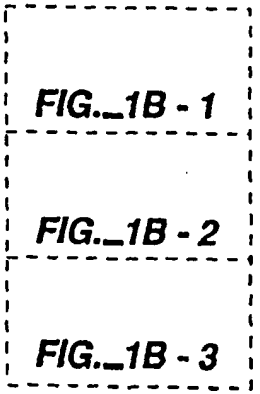


FIG._1B - 3

FIG._1B



KONSERVIERTE RESTE IN SUBTILISINEN AUS
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

VERGLEICH VON SUBTILISIN-SEQUENZEN AUS:

B. amyloliquefaciens

B. subtilis

B. licheniformis

B. lentus

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

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

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

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

FIG._3A

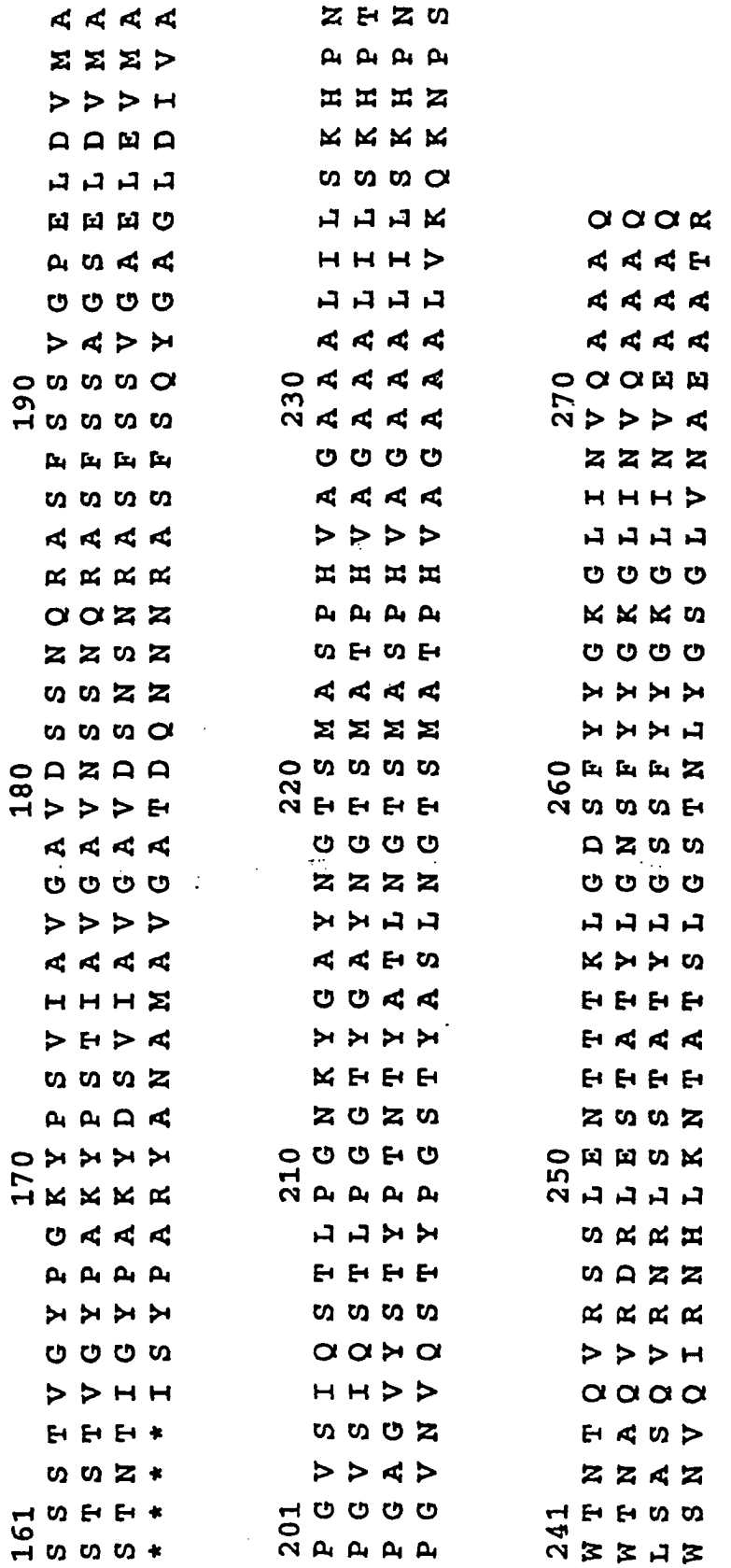


FIG._3B

FIG._3

FIG._3A FIG._3B

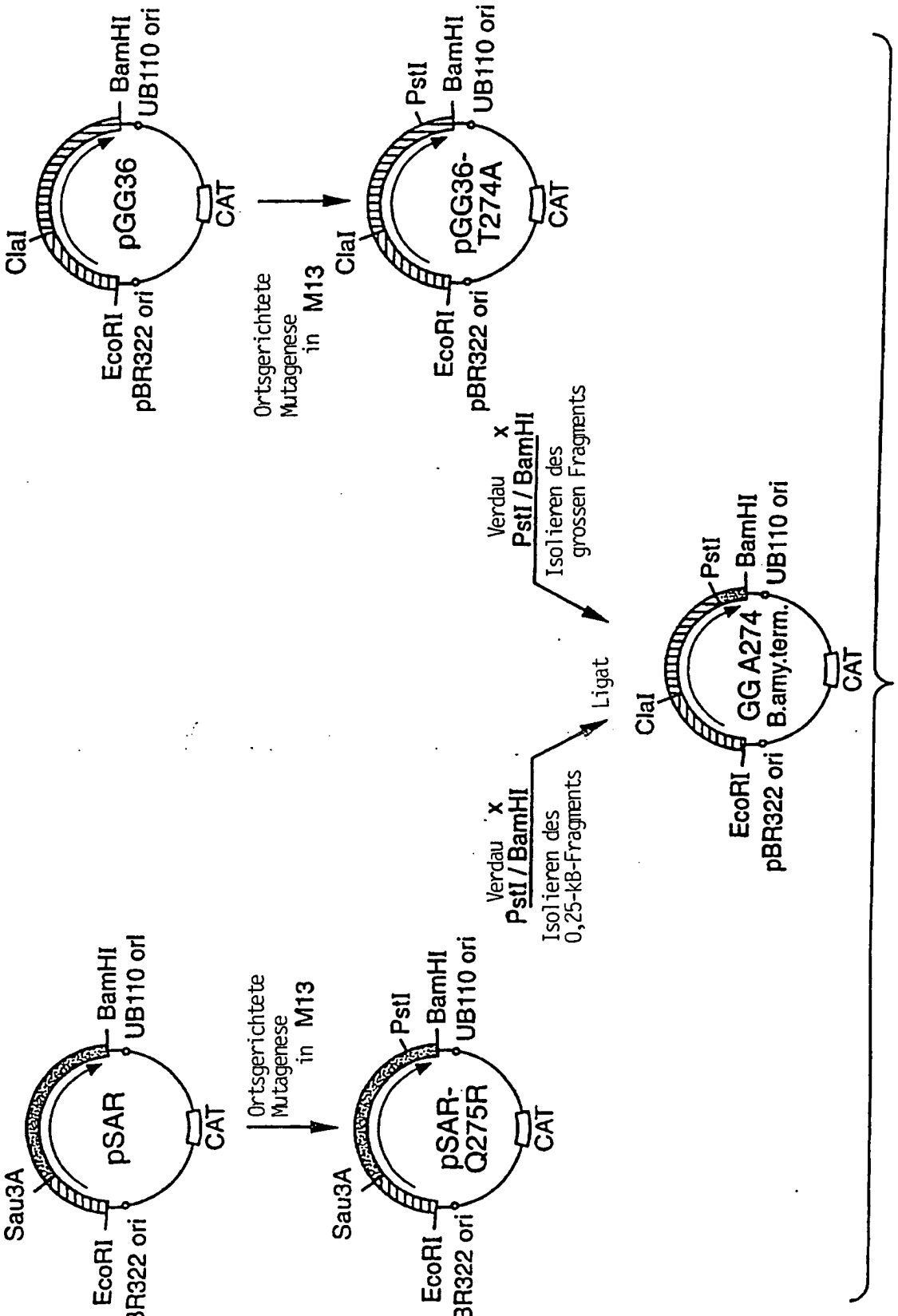

ClaI
BamHI
UB110 ori
pGG36
CAT
EcoRI
pBR322 ori
Ortsgerichtete Mutagenese in M13
PstI
pGG36-T274A
Verdau x PstI / BamHI
Isolieren des grossen Fragments
Sau3A
pSAR
pSAR-Q275R
Verdau x PstI / BamHI
Isolieren des 0,25-kB-Fragments
Ligat
GG A274 B.amy.term.

FIG._4

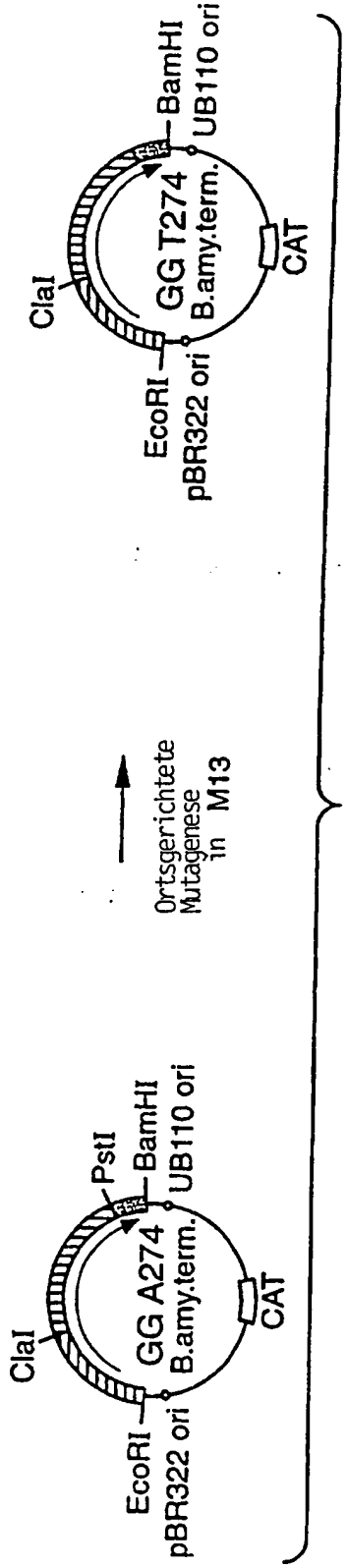

ClaI
EcoRI
pBR322 ori
GG A274
B.amy.term.
PstI
BamHI
UB110 ori
CAT
Ortsgerichtete
Mutagenese
in M13
ClaI
EcoRI
pBR322 ori
GG T274
B.amy.term.
BamHI
UB110 ori
CAT

FIG._5

```
        10                  30                  50
ATGAAGAAACCGTTGGGGAAAATTGTCGCAAGCACCGCACTACTCATTTCTGTTGCTTTT
MetLysLysProLeuGlyLysIleValAlaSerThrAlaLeuLeuIleSerValAlaPhe

        70                  90                  110
AGTTCATCGATCGCATCGGCTGCTGAAGAAGCAAAAGAAAAATATTTAATTGGCTTTAAT
SerSerSerIleAlaSerAlaAlaGluGluAlaLysGluLysTyrLeuIleGlyPheAsn

        130                 150                 170
GAGCAGGAAGCTGTCAGTGAGTTTGTAGAACAAGTAGAGGCAAATGACGAGGTCGCCATT
GluGlnGluAlaValSerGluPheValGluGlnValGluAlaAsnAspGluValAlaIle

        190                 210                 230
CTCTCTGAGGAAGAGGAAGTCGAAATTGAATTGCTTCATGAATTTGAAACGATTCCTGTT
LeuSerGluGluGluGluValGluIleGluLeuLeuHisGluPheGluThrIleProVal

        250                 270                 290
TTATCCGTTGAGTTAAGCCCAGAAGATGTGGACGCGCTTGAACTCGATCCAGCGATTTCT
LeuSerValGluLeuSerProGluAspValAspAlaLeuGluLeuAspProAlaIleSer

        310                 330                 350
TATATTGAAGAGGATGCAGAAGTAACGACAATGGCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGC
TyrIleGluGluAspAlaGluValThrThrMetAlaGlnSerValProTrpGlyIleSer

        370                 390                 410
CGTGTGCAAGCCCCAGCTGCCCATAACCGTGGATTGACAGGTTCTGGTGTAAAAGTTGCT
ArgValGlnAlaProAlaAlaHisAsnArgGlyLeuThrGlySerGlyValLysValAla
```

FIG._6A

```
        430                       450                       470
GTCCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTT
ValLeuAspThrGlyIleSerThrHisProAspLeuAsnIleArgGlyGlyAlaSerPhe

        490                       510                       530
GTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGACG
ValProGlyGluProSerThrGlnAspGlyAsnGlyHisGlyThrHisValAlaGlyThr

        550                       570                       590
ATTGCTGCTTTAAACAATTCGATTGGCGTTCTTGGCGTAGCGCCGAGCGCGGAACTATAC
IleAlaAlaLeuAsnAsnSerIleGlyValLeuGlyValAlaProSerAlaGluLeuTyr

        610                       630                       650
GCTGTTAAAGTATTAGGGGCGAGCGGTTCAGGTTCGGTCAGCTCGATTGCCCAAGGATTG
AlaValLysValLeuGlyAlaSerGlySerGlySerValSerSerIleAlaGlnGlyLeu

        670                       690                       710
GAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTTGCTAATTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCA
GluTrpAlaGlyAsnAsnGlyMetHisValAlaAsnLeuSerLeuGlySerProSerPro

        730                       750                       770
AGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGAGGCGTTCTTGTTGTAGCG
SerAlaThrLeuGluGlnAlaValAsnSerAlaThrSerArgGlyValLeuValValAla

        790                       810                       830
GCATCTGGGAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCGTTATGCGAACGCAATG
AlaSerGlyAsnSerGlyAlaGlySerIleSerTyrProAlaArgTyrAlaAsnAlaMet
```

FIG._6B

```
       850                   870                   890
GCAGTCGGAGCTACTGACCAAAACAACAACCGCGCCAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGG
AlaValGlyAlaThrAspGlnAsnAsnAsnArgAlaSerPheSerGlnTyrGlyAlaGly

       910                   930                   950
CTTGACATTGTCGCACCAGGTGTAAACGTGCAGAGCACATACCCAGGTTCAACGTATGCC
LeuAspIleValAlaProGlyValAsnValGlnSerThrTyrProGlySerThrTyrAla

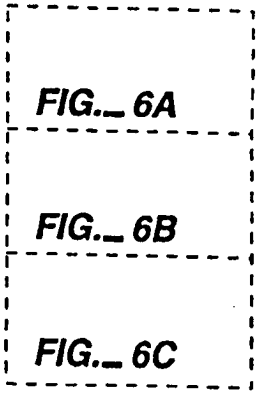
       970                   990                  1010
AGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAGCCCTTGTTAAA
SerLeuAsnGlyThrSerMetAlaThrProHisValAlaGlyAlaAlaAlaLeuValLys

      1030                  1050                  1070
CAAAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTACAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACG
GlnLysAsnProSerTrpSerAsnValGlnIleArgAsnHisLeuLysAsnThrAlaThr

      1090                  1110                  1130
AGCTTAGGAAGCACGAACTTGTATGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGC
SerLeuGlySerThrAsnLeuTyrGlySerGlyLeuValAsnAlaGluAlaAlaThrArg
```

FIG._6C

FIG._6



```
        10                  30                  50
ATGAAGAAACCGTTGGGGAAAATTGTCGCAAGCACCGCACTACTCATTTCTGTTGCTTTT
MetLysLysProLeuGlyLysIleValAlaSerThrAlaLeuLeuIleSerValAlaPhe

        70                  90                  110
AGTTCATCGATCGCATCGGCTGCTGAAGAAGCAAAAGAAAAATATTTAATTGGCTTTAAT
SerSerSerIleAlaSerAlaAlaGluGluAlaLysGluLysTyrLeuIleGlyPheAsn

        130                 150                 170
GAGCAGGAAGCTGTCAGTGAGTTTGTAGAACAAGTAGAGGCAAATGACGAGGTCGCCATT
GluGlnGluAlaValSerGluPheValGluGlnValGluAlaAsnAspGluValAlaIle

        190                 210                 230
CTCTCTGAGGAAGAGGAAGTCGAAATTGAATTGCTTCATGAATTTGAAACGATTCCTGTT
LeuSerGluGluGluGluValGluIleGluLeuLeuHisGluPheGluThrIleProVal

        250                 270                 290
TTATCCGTTGAGTTAAGCCCAGAAGATGTGGACGCGCTTGAACTCGATCCAGCGATTTCT
LeuSerValGluLeuSerProGluAspValAspAlaLeuGluLeuAspProAlaIleSer

        310                 330                 350
TATATTGAAGAGGATGCAGAAGTAACGACAATGGCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGC
TyrIleGluGluAspAlaGluValThrThrMetAlaGlnSerValProTrpGlyIleSer

        370                 390                 410
CGTGTGCAAGCCCCAGCTGCCCATAACCGTGGATTGACAGGTTCTGGTGTAAAAGTTGCT
ArgValGlnAlaProAlaAlaHisAsnArgGlyLeuThrGlySerGlyValLysValAla
```

FIG._7A

```
      430                   450                   470
GTCCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTT
ValLeuAspThrGlyIleSerThrHisProAspLeuAsnIleArgGlyGlyAlaSerPhe

      490                   510                   530
GTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGACG
ValProGlyGluProSerThrGlnAspGlyAsnGlyHisGlyThrHisValAlaGlyThr

      550                   570                   590
ATTGCTGCTTTAGACAACTCGATTGGCGTTCTTGGCGTAGCGCCGAGCGCGGAACTATAC
IleAlaAlaLeuAspAsnSerIleGlyValLeuGlyValAlaProSerAlaGluLeuTyr

      610                   630                   650
GCTGTTAAAGTATTAGGGGCGAGCGGTTCAGGCGCCATCAGCTCGATTGCCCAAGGATTG
AlaValLysValLeuGlyAlaSerGlySerGlyAlaIleSerSerIleAlaGlnGlyLeu

      670                   690                   710
GAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTTGCTAATTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCA
GluTrpAlaGlyAsnAsnGlyMetHisValAlaAsnLeuSerLeuGlySerProSerPro

      730                   750                   770
AGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGAGGCGTTCTTGTTGTAGCG
SerAlaThrLeuGluGlnAlaValAsnSerAlaThrSerArgGlyValLeuValValAla

      790                   810                   830
GCATCTGGGAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCGTTATGCGAACGCAATG
AlaSerGlyAsnSerGlyAlaGlySerIleSerTyrProAlaArgTyrAlaAsnAlaMet
```

FIG._7B

```
850                 870                 890
GCAGTCGGAGCTACTGACCAAAACACAACCGCGCCAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGG
AlaValGlyAlaThrAspGlnAsnAsnArgAlaSerPheSerGlnTyrGlyAlaGly

910                 930                 950
CTTGACATTGTCGCACCAGGTGTAAACGTGCAGAGCACATACCCAGGTTCAACGTATGCC
LeuAspIleValAlaProGlyValAsnValGlnSerThrTyrProGlySerThrTyrAla

970                 990                 1010
AGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAGCCCTTGTTAAA
SerLeuAsnGlyThrSerMetAlaThrProHisValAlaGlyAlaAlaAlaLeuValLys

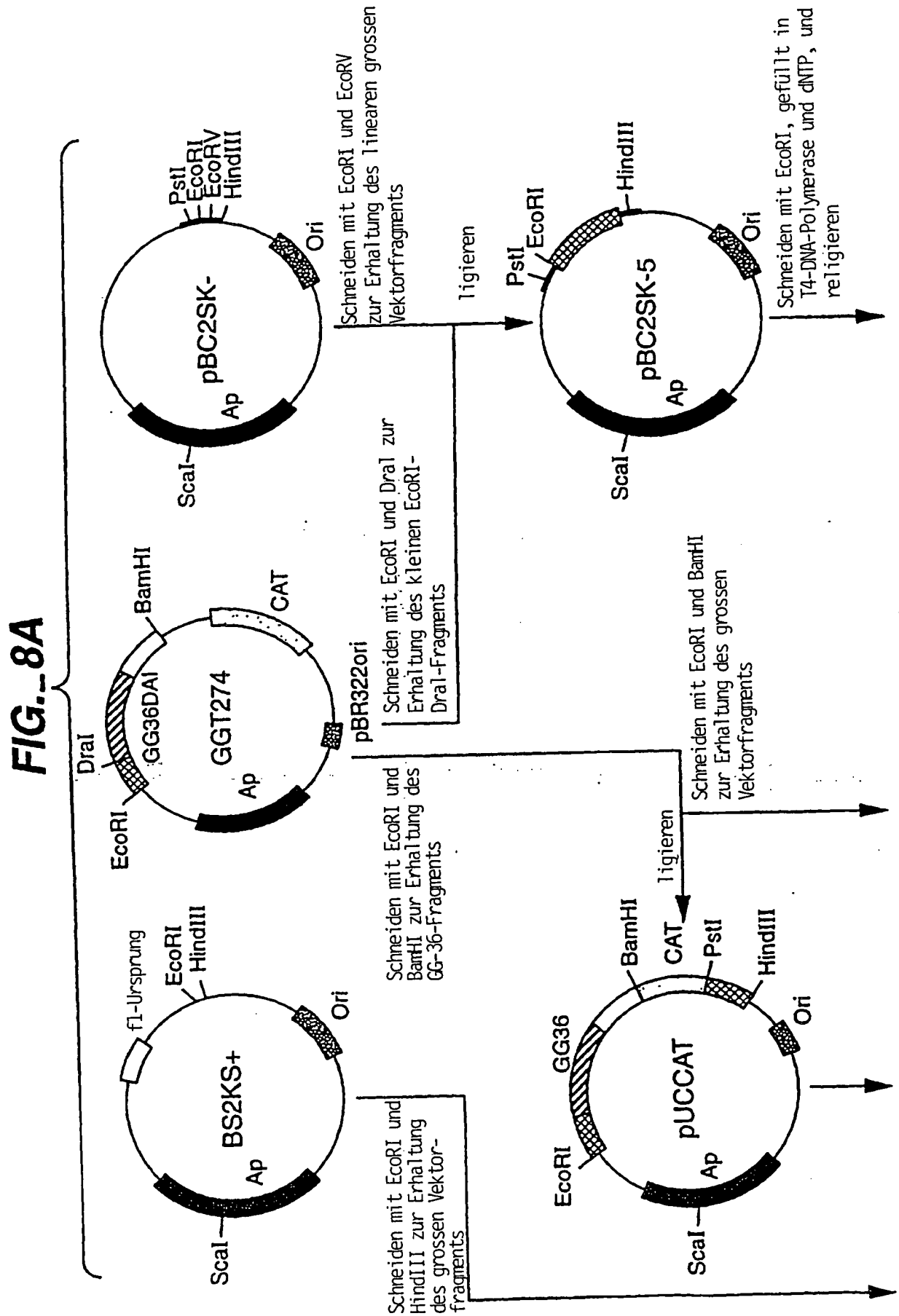
1030                1050                1070
CAAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTACAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACG
GlnLysAsnProSerTrpSerAsnValGlnIleArgAsnHisLeuLysAsnThrAlaThr

1090                1110                1130
AGCTTAGGAAGCACGAACTTGTATGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGC
SerLeuGlySerThrAsnLeuTyrGlySerGlyLeuValAsnAlaGluAlaAlaThrArg
```

FIG._7C

FIG._7

FIG._8A


pBC2SK-
PstI
EcoRI
EcoRV
HindIII
Ori
Ap
ScaI
Schneiden mit EcoRI und EcoRV zur Erhaltung des linearen grossen Vektorfragments
ligieren
PstI
EcoRI
HindIII
pBC2SK-5
Ori
Ap
ScaI
Schneiden mit EcoRI, gefüllt in T4-DNA-Polymerase und dNTP, und religieren
DraI
BamHI
CAT
GG36DAI
GGT274
Ap
EcoRI
pBR322ori
Schneiden mit EcoRI und DraI zur Erhaltung des kleinen EcoRI-DraI-Fragments
Schneiden mit EcoRI und BamHI zur Erhaltung des GG-36-Fragments
Schneiden mit EcoRI und BamHI zur Erhaltung des grossen Vektorfragments
ligieren
f1-Ursprung
EcoRI
HindIII
Ori
BS2KS+
Ap
ScaI
Schneiden mit EcoRI und HindIII zur Erhaltung des grossen Vektor-fragments
GG36
BamHI
CAT
PstI
HindIII
Ori
pUCCAT
Ap
EcoRI
ScaI

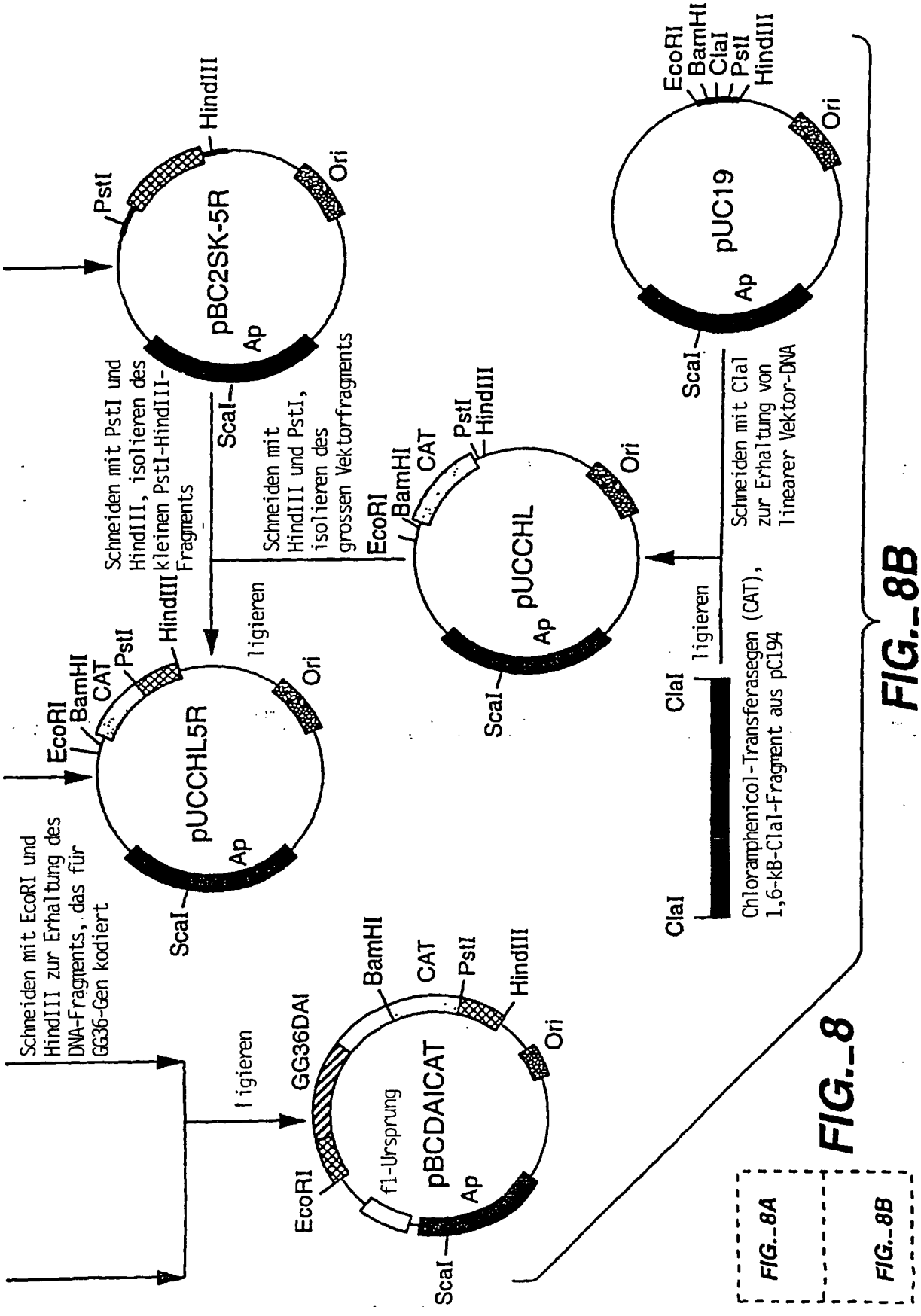


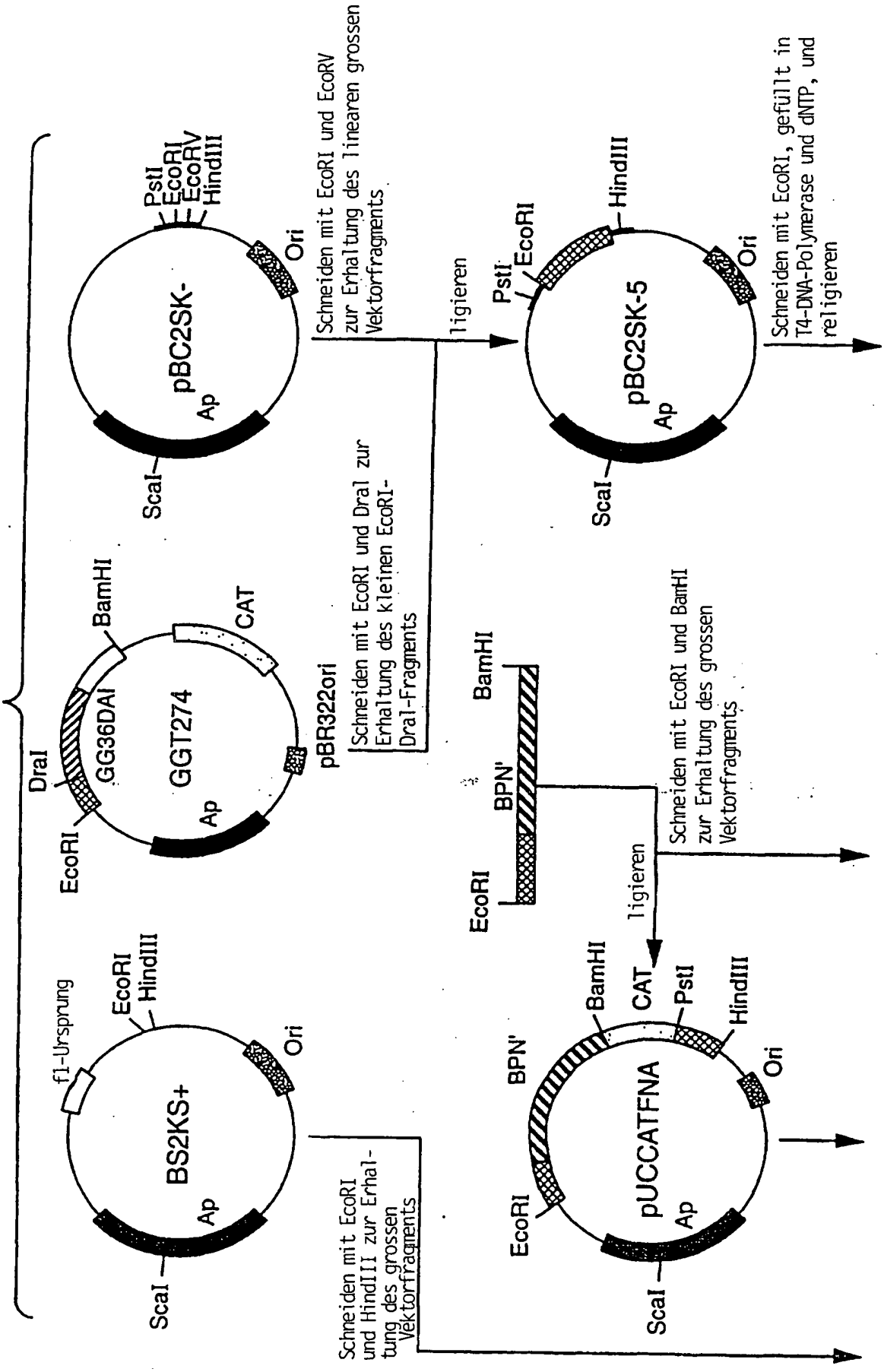
FIG._8B

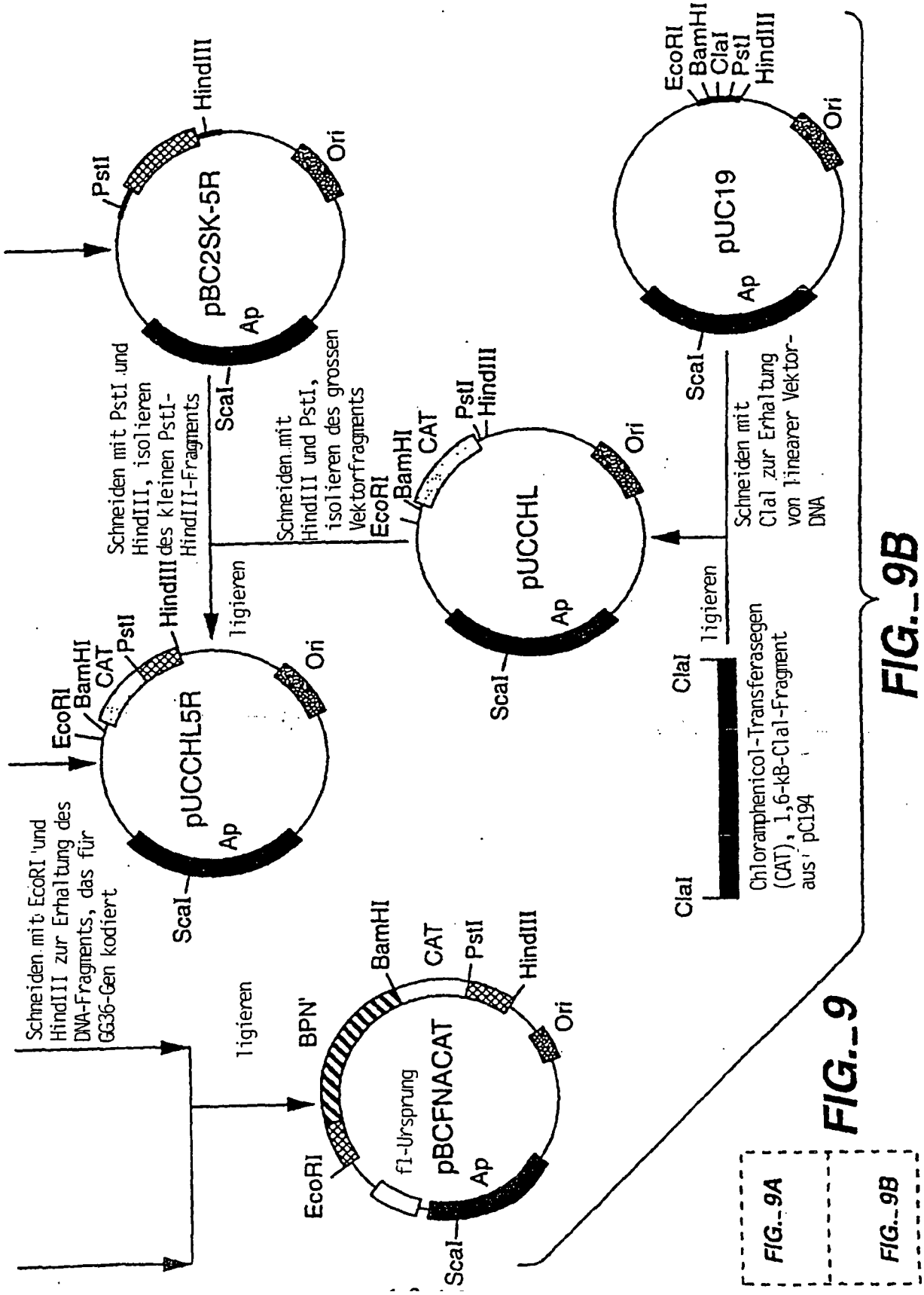
FIG._8

FIG._8A

FIG._8B

FIG._9A


PstI
EcoRI
EcoRV
HindIII
pBC2SK-
Ap
Ori
ScaI
Schneiden mit EcoRI und EcoRV zur Erhaltung des linearen grossen Vektorfragments
ligieren
PstI
EcoRI
HindIII
pBC2SK-5
Ap
Ori
ScaI
Schneiden mit EcoRI, gefüllt in T4-DNA-Polymerase und dNTP, und religieren
DraI
BamHI
GG36DAI
GGT274
CAT
Ap
EcoRI
pBR322ori
Schneiden mit EcoRI und DraI zur Erhaltung des kleinen EcoRI-DraI-Fragments
BamHI
BPN'
EcoRI
Schneiden mit EcoRI und BamHI zur Erhaltung des grossen Vektorfragments
ligieren
f1-Ursprung
EcoRI
HindIII
BS2KS+
Ap
Ori
ScaI
Schneiden mit EcoRI und HindIII zur Erhaltung des grossen Vektorfragments
BamHI
CAT
PstI
HindIII
BPN'
EcoRI
pUCCATFNA
Ap
Ori
ScaI


pBC2SK-5R
PstI
HindIII
Ori
Ap
ScaI
Schneiden mit PstI und HindIII, isolieren des kleinen PstI-HindIII-Fragments
Schneiden mit HindIII und PstI, isolieren des grossen Vektorfragments
ligieren
pUCCHL5R
EcoRI
BamHI
CAT
PstI
HindIII
Ori
Ap
ScaI
Schneiden mit EcoRI und HindIII zur Erhaltung des DNA-Fragments, das für GG36-Gen kodiert
pUCCHL
EcoRI
BamHI
CAT
PstI
HindIII
Ori
Ap
ScaI
pUC19
EcoRI
BamHI
ClaI
PstI
HindIII
Ori
Ap
ScaI
Schneiden mit ClaI zur Erhaltung von linearer Vektor-DNA
ligieren
ClaI
ClaI
Chloramphenicol-Transferasegen (CAT), 1,6-kB-ClaI-Fragment aus pC194
ligieren
BPN'
BamHI
CAT
PstI
HindIII
Ori
f1-Ursprung
pBCFNACAT
EcoRI
Ap
ScaI
FIG._9B
FIG._9
FIG._9A
FIG._9B

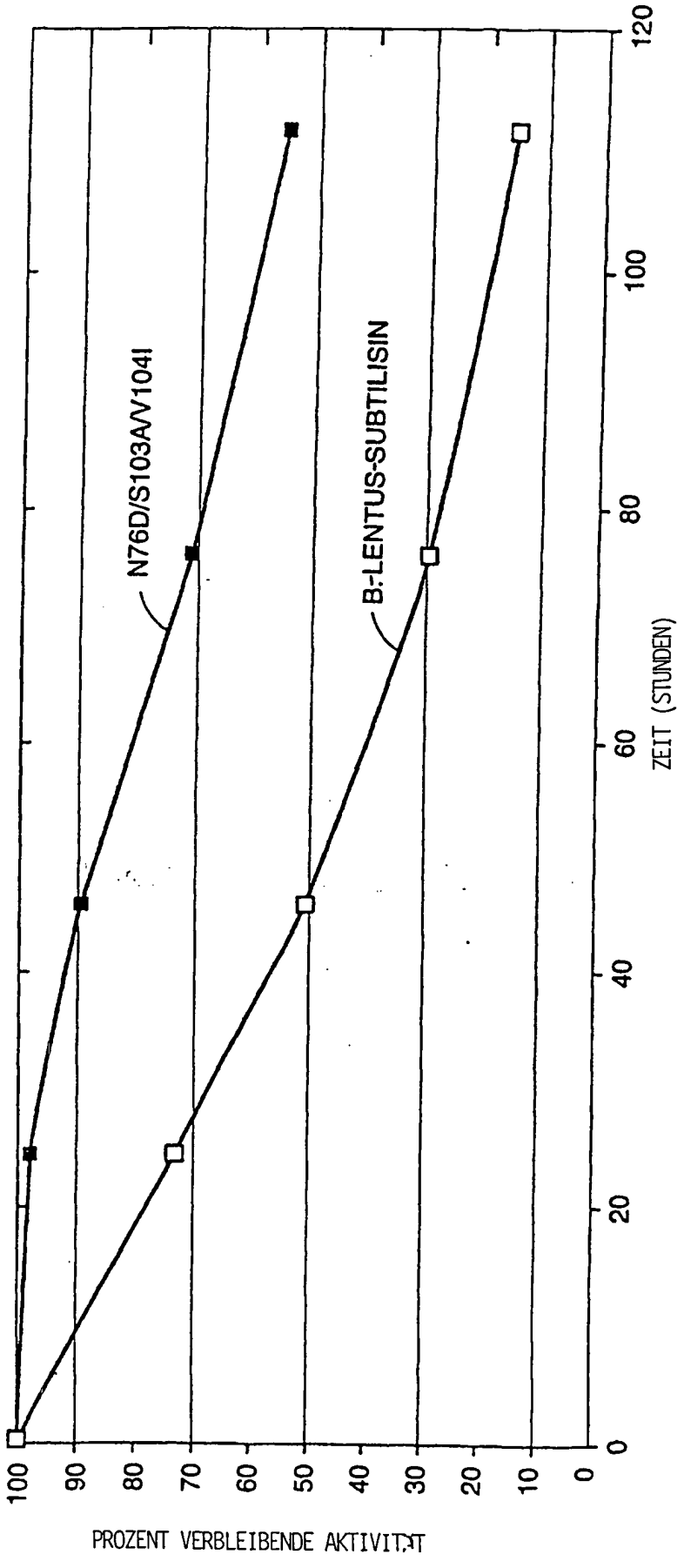

N76D/S103A/V104I
B.LENTUS-SUBTILISIN
PROZENT VERBLEIBENDE AKTIVITÄT
ZEIT (STUNDEN)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
20
40
60
80
100
120

FIG._10