



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0611936-0 A2**

(22) Data de Depósito: 16/06/2006
(43) Data da Publicação: 22/02/2011
(RPI 2094)



(51) Int.Cl.:
A61K 38/48
C12N 9/54
A61K 38/54

(54) Título: **PROTEASE, USO DE UMA PROTEASE, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE DOENÇA**

(30) Prioridade Unionista: 24/06/2005 DK PA 2005 00930, 23/11/2005 DK PA 2005 01643, 23/11/2005 DK PA 2005 01643, 24/06/2005 DK PA 2005 00930

(73) Titular(es): NOVOZYMES A/S, SOLVAY PHARMACEUTICALS GMBH

(72) Inventor(es): ALLAN SVENDSEN, CLAUD CRONE FUGLSANG, PETER COLIN GREGORY

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT DK2006000353 de 16/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/136160 de 28/12/2006

(57) Resumo: PROTEASE, USO DE UMA PROTEASE, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE DOENÇA. O uso farmacêutico de proteases relacionadas com os aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2, a serina protease derivada de Bacillus licheniformis, que também é designado subtilisina Carlsberg, opcionalmente em combinação com uma lipase e/ou uma amilase. Os exemplos de indicações médicas são: Tratamento de distúrbios digestivos, insuficiência exócrina pancreática (PEI), pancreatite, fibrose cística, diabetes tipo I e/ou diabetes tipo II.

“PROTEASE, USO DE UMA PROTEASE, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE DOENÇA”

Campo Técnico

A presente invenção diz respeito ao uso farmacêutico de proteases relacionadas com uma serina protease derivada de *Bacillus licheniformis* (aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2), opcionalmente em combinação com uma lipase e/ou uma amilase. Os exemplos de indicações médicas são: Tratamento de distúrbios digestivos, insuficiência exócrina pancreática (PEI), pancreatite, fibrose cística, diabetes tipo I e/ou diabetes tipo II.

Fundamentos da Técnica

Diversos medicamentos comerciais na forma de suplementos de enzima pancreática são conhecidos para o tratamento de insuficiência exócrina pancreática. Os ingredientes ativos destes produtos são enzimas digestivas, principalmente amilase, lipase e protease, que são normalmente produzidas no pâncreas e excretadas na parte superior do intestino delgado (o duodeno). As enzimas usadas em tais medicamentos derivam de pâncreas bovino ou suíno, entretanto também existem produtos no mercado com enzimas microbianas, por exemplo, o produto Nortase® que contém uma lipase de *Rhizopus oryzae*, uma protease de *Aspergillus oryzae*, e uma amilase de *Aspergillus oryzae*.

A US 5614189 (EP 600868) descreve o uso de, i.a., uma lipase derivada de *Humicola lanuginosa* na terapia de reposição de enzima pancreática, por exemplo no tratamento de pacientes que sofrem de fibrose cística. Esta lipase é de *Humicola lanuginosa* DSM 4109 e tem a sequência de aminoácido dos aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 14.

A WO 00/54799 descreve o uso de misturas de enzima fisiologicamente aceitáveis tendo atividade lipolítica, proteolítica e amiolítica no tratamento da diabetes melito tipo I e II.

A WO 02/060474 descreve o uso de uma lipase concentrada de *Rhizopus delemar*, uma protease neutra de *Aspergillus melleus*, e uma amilase de *Aspergillus oryzae* no tratamento da má digestão.

5 A WO 01/62280 descreve o uso de um certo cristal de lipase não fúngica reticulada com um agente de reticulação multifuncional, uma protease e uma amilase, em que o cristal de lipase é ativo em uma faixa de pH de cerca de 2,0 a 9,0, para tratar ou prevenir um distúrbios gastrintestinais em um mamífero. Uma lipase preferida é de *Pseudomonas*, as amilases preferidas são de *Bacillus* ou *Aspergillus*, as proteases preferidas são bromelaína, 10 papaína ou ficina.

A EP 0828509 descreve o uso de certas amilases estáveis em ácido, opcionalmente em combinação com certas lipases e/ou proteases estáveis em ácido, no tratamento de insuficiência pancreática exócrina. Uma amilase preferida é de *Aspergillus niger* e as lipases preferidas são de 15 *Rhizopus arrhizus* ou *Rhizopus javanicus*.

A WO 91/00345 descreve várias serina subtilisina proteases e variantes melhoradas destas, para o uso em composições de detergente.

20 A WO 2005/115445 (publicada depois das datas de prioridade do presente pedido) descreve o uso farmacêutico de proteases relacionadas com uma protease derivada de *Nocardiosis* sp. NRRL 18262 (esta protease tendo a seqüência de aminoácido de aminoácidos 1-188 da SEQ ID NO: 1 nesta referência), opcionalmente em combinação com uma lipase e/ou uma amilase. As indicações médicas são as mesmas como na presente invenção.

25 A WO 02/077187 divulga variantes de uma subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* tendo um epítipo de célula T alterado e vários usos destes. As composições farmacêuticas são reivindicadas.

A WO 01/12795 divulga o uso farmacêutico de composições de enzima proteolítica. As proteases preferidas são de *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus awamori*

ou *Bacillus subtilis*.

A WO 2004/078773 divulga como manter proteases tais como subtilisina proteases em um estado inativo que pode ser ativado na demanda através de um sinal externo. Entre outros usos o uso de pró-subtilisina em formulações de limpeza de fermento é divulgado e como fazer com que a subtilisina ativa seja formada. Uma enzima de protease preferida é a ProD-subtilisina ou ProD-subtilisina carregada (Yabuta *et al.*, J. Biol. Chem. 278: 15246-51, 2003).

A US 2002/0081703 divulga um método para reduzir a alergenicidade de proteínas não humanas, em que um epítipo é identificado e substituído com uma região análoga dentro de uma subtilisina humana. As composições farmacêuticas que compreendem uma subtilisina humana são reivindicadas.

Existe uma necessidade na técnica quanto a enzimas alternativas, preferivelmente melhoradas para uso farmacêutico, em particular para as indicações médicas mencionadas acima.

Sumário da invenção

A presente invenção fornece enzimas alternativas, preferivelmente melhoradas para uso farmacêutico, em particular para o tratamento de distúrbios digestivos, insuficiência exócrina pancreática (PEI), pancreatite, fibrose cística, diabetes tipo I e/ou diabetes tipo II. As novas enzimas são proteases, amilases e lipases. Preferivelmente, as enzimas para o uso de acordo com a invenção têm uma eficácia melhorada *in vivo* e/ou *in vitro*; um perfil de estabilidade ao pH melhorada; um perfil de atividade ao pH melhorada; são estáveis contra a degradação pelas proteases; são estáveis na presença de sais biliares; e/ou têm uma alergenicidade reduzida.

A presente invenção diz respeito a uma protease de pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 274 da SEQ ID NO: 2, para o uso como um medicamento, opcionalmente em combinação com uma

lipase e/ou uma amilase.

A invenção também diz respeito ao uso de tais proteases para a fabricação de um medicamento para o tratamento de distúrbios digestivos, PEI, pancreatite (aguda e/ou crônica), fibrose cística, diabetes tipo I e/ou diabetes tipo II, estes usos opcionalmente compreendendo ainda o uso de uma lipase e/ou uma amilase.

A invenção além disso diz respeito a uma composição farmacêutica que compreende tais proteases, junto com pelo menos um material auxiliar farmacêuticamente aceitável, opcionalmente incluindo uma lipase e/ou uma amilase.

A invenção também diz respeito a um método para o tratamento de distúrbios digestivos, PEI, pancreatite (aguda e/ou crônica), fibrose cística, diabetes tipo I e/ou diabetes tipo II, pela administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de tais proteases, opcionalmente juntas com uma lipase e/ou uma amilase.

Descrição Detalhada da invenção

Enzimas

A presente invenção diz respeito ao uso farmacêutico de proteases tendo pelo menos 50% de identidade à protease de aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2, uma serina protease derivada de *Bacillus licheniformis*, que também é designada subtilisina Carlsberg. A invenção também diz respeito ao uso de tais proteases para a fabricação de um medicamento para o tratamento de distúrbios digestivos, PEI, pancreatite, fibrose cística, diabetes tipo I e/ou diabetes tipo II. A invenção além disso diz respeito a uma composição farmacêutica que compreende tais proteases, junto com pelo menos um material auxiliar farmacêuticamente aceitável, assim como a um método para o tratamento das doenças mencionadas acima, pela administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de tais proteases.

No que segue, a protease para o uso nas composições, métodos

e usos da invenção é aludido como a “protease da invenção.”

Em formas de realização preferidas, a protease da invenção tem um grau de identidade com os aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2 de pelo menos 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59% ou pelo menos 60%. Em outras formas de realização preferidas, a protease da invenção tem um grau de identidade com os aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2 de pelo menos 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69% ou pelo menos 70%. Ainda em outras formas de realização preferidas, a protease da invenção tem um grau de identidade com os aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2 de pelo menos 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79% ou pelo menos 80%. Em formas de realização adicionais preferidas, a protease da invenção tem um grau de identidade com os aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2 de pelo menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% ou pelo menos 90%. Em formas de realização mais preferidas, a protease da invenção tem um grau de identidade com os aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2 de pelo menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou pelo menos 99%.

O termo “protease” é aqui definido como uma enzima que hidrolisa ligações peptídicas. O mesmo inclui qualquer enzima pertencente ao grupo de enzima EC 3.4 (incluindo cada uma das treze subclasses destes, estas enzimas sendo a seguir aludida como “pertencente ao grupo EC 3.4.-.-”). O número EC refere-se à Nomenclatura de Enzima 1992 da NC-IUBMB, Academic Press, San Diego, Califórnia, incluindo os suplementos 1 a 5 publicados na Eur. J. Biochem. 1994, 223, 1-5; Eur. J. Biochem. 1995, 232, 1-6; Eur. J. Biochem. 1996, 237, 1-5; Eur. J. Biochem. 1997, 250, 1-6; e Eur. J. Biochem. 1999, 264, 610-650; respectivamente. A nomenclatura é regularmente suplementada e atualizadas; ver por exemplo, a World Wide Web em <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzima/index.html>.

As proteases são classificadas com base no seu mecanismo

catalítico nos seguintes grupos: as serina proteases (S), cisteína proteases (C), aspártico proteases (A), metalo proteases (M) e desconhecidas ou como ainda não classificadas, proteases (U), ver Handbook of Proteolytic Enzymes, A. J. Barrett, N. D. Rawlings, J. F. Woessner (eds), Academic Press (1998), (no
 5 que segue aludida como “o *handbook*”), em particular a parte de introdução geral.

Em uma outra forma de realização, a protease da invenção é uma serina protease. O termo serina protease refere-se às serina peptidases e seus clãs como definido no *handbook*, ver em particular os capítulos 1-175.
 10 Uma serina protease é uma peptidase em que o mecanismo catalítico depende do grupo hidroxila de um resíduo de serina que atua como o nucleófilo que ataca a ligação peptídica.

Ainda em uma outra forma de realização, a protease da invenção é uma subtilisina e/ou derivada da família da subtilisina. Os termos
 15 subtilisina ou família de subtilisina incluem todo o Clã das SB serina proteases, em particular a Família S8 destes (o Clã SB é dado no Capítulo 93 do *handbook*). Para determinar se uma dada protease é uma subtilisina ou não, referência é feita ao *handbook* e os princípios aí indicados. Tal determinação pode ser realizada para todos os tipos de proteases, sejam proteases que
 20 ocorram naturalmente ou do tipo selvagem; ou proteases geneticamente engendradas ou sintéticas. Em uma forma de realização particular, a ordem da tríade catalítica na protease da invenção é Asp-His-Ser. Em uma outra forma de realização particular, a estrutura terciária da protease da invenção inclui tanto hélices alfa e folhas beta. O clã SB inclui endopeptidases e
 25 exopeptidases. Ainda em uma outra forma de realização particular a protease da invenção é uma endopeptidase. As endopeptidases mostram atividade nos substratos de peptídeos bloqueados no terminal N e C que são relevantes para a especificidade da protease em questão.

Em uma forma de realização particular, a protease da invenção

não é ProD-subtilisina ou ProD-subtilisina carregada (Yabuta *et al.*, J. Biol. Chem. 278: 15246-51, 2003). Em uma outra forma de realização particular a protease da invenção não é uma subtilisina de *Bacillus subtilis* do tipo selvagem e/ou não é derivada de *Bacillus subtilis*.

5 Conseqüentemente, em um primeiro aspecto, a protease da invenção é selecionada do grupo que consiste de: (a) proteases pertencentes ao grupo de enzima EC 3.4.-.-; (b) serina proteases; (c) subtilisina proteases de peptidase Clã SB; e (d) subtilisina proteases da Família S8.

10 Em um segundo aspecto, a protease da invenção é derivada de um microorganismo, por exemplo de um fungo ou de uma bactéria. Os exemplos de bactérias são cepas de *Bacillus*, tais como cepas de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus natto*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sp.*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis* var *natto* ou *Bacillus thuringiensis*; em particular cepas de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus clausii*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus natto*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sp.*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* ou *Bacillus subtilis* var *natto*; preferivelmente uma cepa de *Bacillus licheniformis*. Neste contexto, o termo “derivada de” inclui enzimas obteníveis ou obtida, de cepas do tipo selvagem; assim como, preferivelmente, variantes destas tendo pelo menos uma substituição, inserção e/ou deleção de pelo menos um resíduo de aminoácido. O termo variante também inclui *shufflants*, híbridos, enzimas quiméricas e enzimas de consenso. As variantes podem ter sido produzidas por qualquer método conhecido na técnica, tais como mutagênese direcionada ao sítio, mutagênese aleatória, processos de derivação de consenso (EP 897985) e embaralhamento de gene (WO 95/22625, WO 96/00343), etc.

25

Os seguintes são exemplos de proteases da invenção derivadas

de cepas de *Bacillus* e relacionadas com a protease dos aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2; Swissprot subt_bacli acesso nº P00780 (derivada de *Bacillus licheniformis*, aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 5); Swissprot subn_bacna acesso nº P35835 (derivada de *Bacillus natto*, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 6); Swissprot subt_bacpu acesso nº P07518 (derivada de *Bacillus pumilus*, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 7); Swissprot subt_bacsu acesso nº PO4189 (derivada de *Bacillus subtilis*, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 8); Swissprot subt_bacst acesso nº P29142 (derivada de *Bacillus stearothermophilus*, aminoácidos 1275 da SEQ ID NO: 9); Swissprot subn_bacam acesso nº P00782 (derivada de *Bacillus amyloliquefaciens*, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 10); Swissprot subs_bacle acesso nº P29600 (derivada de *Bacillus lentus*, aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 11); Swissprot elya_baccs acesso nº P41362 (derivada de *Bacillus clausii*, aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 12); e Swissprot elya_bacya acesso nº P20724 (derivada de *Bacillus* sp., aminoácidos de 1 a 268 da SEQ ID NO: 13); assim como variantes destes, como definido acima.

Os exemplos particulares adicionais de proteases da invenção são as proteases contidas nos seguintes produtos comerciais: Purafect MA, Purafect, Purafect Ox (variante M222S), Purafect Prime (Y217L), Properase (S87N + S101G + V104N), FN3 (N76D + S103A + V1041), FN4 (S101G + S103A + V1041 + G159D + A232V + Q236H + Q245R + N248D + N252K) - todos preferivelmente variantes da parte madura da SEQ ID NO: 10 e comercialmente disponível da Genencor/Danisco; Blap (a parte madura da SEQ ID NO: 11 com S99D + S101 R + S103A + V1041 + G160S), BLAP R (Blap com S3T + V4I + V199M + V2051 + L217D) e BLAP X (Blap com S3T + V41 + V2051) - todos de Henkel/Kemira; e KAP (A230V + S256G + S259N) de Kao.

Em um terceiro aspecto, a protease da invenção é ou pode ser observada como, uma variante da protease da SEQ ID NO: 2, isto é, a mesma

compreende pelo menos uma substituição, deleção e/ou inserção de um ou mais aminoácidos dos aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2. Preferivelmente, as mudanças de aminoácido são de uma natureza menor, que são substituições ou inserções de aminoácido conservativas que não afetam significativamente a dobra e/ou atividade da proteína; deleções pequenas; extensões de terminal amino ou carboxila pequenas, tais como um resíduo de metionina de terminal amino; um peptídeo ligador pequeno; ou uma extensão pequena que facilite a purificação pela mudança da carga líquida ou uma outra função, tal como um trato de poli-histidina, um epítipo antigênico ou um domínio de ligação. Neste contexto, o termo “pequeno” independentemente designa vários até 25 resíduos de aminoácido. Em formas de realização preferidas, o termo “pequeno” independentemente designa até 24, 23, 22, 21 ou até 20 resíduos de aminoácido. Em formas de realização adicionais preferidas, o termo “pequeno” independentemente designa até 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 ou até 10 resíduos de aminoácido. Em outras formas de realização preferidas, o termo “pequeno” independentemente designa até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou até 1 resíduo de aminoácido. Em formas de realização alternativas, o termo “pequeno” independentemente designa até 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27 ou até 26 resíduos de aminoácido.

Os exemplos de substituições conservativas estão dentro do grupo de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutâmico e ácido aspártico), aminoácidos polares (serina, treonina, glutamina e asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina, valina e alanina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptofano e tirosina) e aminoácidos pequenos (glicina, alanina, prolina, serina, treonina, cisteína e metionina).

Na alternativa, exemplos de substituições conservativas estão dentro do grupo de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina),

aminoácidos ácidos (ácido glutâmico e ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina e asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina e valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptofano e tirosina) e aminoácidos pequenos (glicina, alanina, serina, treonina e metionina). As substituições de aminoácido que no geral não alteram a atividade específica são conhecidos na técnica e são descritos, por exemplo, por H. Neurath e R. L. Hill, 1979, Em, The Proteins, Academic Press, Nova Iorque. As mudanças que ocorrem mais habitualmente são Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu e Asp/Gly.

As variantes preferidas de qualquer uma das partes da protease madura das SEQ ID NOs: 5 a 13, tais como, por exemplo, aminoácidos de 1 a 268 da SEQ ID NO: 13, compreendem pelo menos uma substituição, deleção e/ou inserção de um ou mais aminoácidos (quando comparada com a enzima precursora ou ancestral, a enzima tal como, por exemplo, os aminoácidos de 1 a 268 da SEQ ID NO: 13), como explicado acima para as variantes de aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2. Mais preferivelmente estas variantes são com substituições de aminoácido conservativas ou inserções, pequenas deleções, pequenos ligadores ou com pequenas extensões, como também explicado em detalhes acima para as variantes de aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2. Um exemplo específico de uma variante de protease da invenção é a variante 99aE da SEQ ID NO: 11 (ver Exemplo 4).

Em um quarto aspecto, a protease da invenção tem uma seqüência de aminoácido que difere em não mais do que 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12 ou não mais do que 11 aminoácidos dos aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2; ou, a mesma difere dos aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2 em não mais do que 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou em não mais do que 1 aminoácido. Em formas de realização alternativas, a protease da invenção tem uma seqüência de aminoácido que

difere em não mais do que 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27 ou não mais do que 26 aminoácidos dos aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2.

As variantes preferidas de qualquer uma das partes da protease madura das SEQ ID NOs: 5 a 13, tais como, por exemplo, os aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 7, têm uma seqüência de aminoácido que difere em não mais do que 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12 ou não mais do que 11 aminoácidos das partes maduras de qualquer uma das SEQ ID NOs: 5 a 13, tais como, por exemplo, os aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 7; ou, a mesma difere das partes maduras de qualquer uma das SEQ ID NOs: 5 a 13, tais como, por exemplo, os aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 7, em não mais do que 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou em não mais do que 1 aminoácido.

Em um quinto aspecto, a protease da invenção é uma variante alélica da SEQ ID NO: 2 (preferivelmente uma variante alélica da parte madura desta), uma variante alélica de qualquer uma das SEQ ID NOs. 5 a 13 (preferivelmente uma variante alélica de qualquer uma das partes maduras destas) ou um fragmento de qualquer uma destas que tenha atividade de protease. O termo variante alélica denota qualquer uma de duas ou mais das formas alternativas de um gene que ocupa os mesmos locais cromossômicos. A variação alélica surge naturalmente através da mutação e pode resultar em polimorfismo dentro das populações. As mutações de gene podem ser silenciosas (nenhuma mudança no polipeptídeo codificado) ou podem codificar polipeptídeos tendo seqüências de aminoácido alteradas. Uma variante alélica de um polipeptídeo é um polipeptídeo codificado por uma variante alélica de um gene. O termo fragmento é aqui definido como um polipeptídeo tendo um ou mais aminoácidos deletados do terminal amino e/ou carboxila dos aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2, ou, do terminal amino e/ou carboxila de qualquer uma das SEQ ID NOs: 5 a 13,

preferivelmente das partes maduras destes. Preferivelmente, um pequeno número de aminoácidos foi deletado, pequeno sendo definido como explicado acima. Mais preferivelmente, um fragmento contém pelo menos 244, 245, 246, 247, 248, 249 ou pelo menos 250 resíduos de aminoácido. O mais
5 preferivelmente, um fragmento contém pelo menos 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272 ou pelo menos 273 resíduos de aminoácido.

Em resumo, uma forma de realização da presente invenção diz respeito a uma protease para uso farmacêutico, em que a) a protease
10 compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste dos aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2, aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 5, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 6, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 7, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 8, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 9, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID
15 NO: 10, aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 11, aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 12 e aminoácidos de 1 a 268 da SEQ ID NO: 13; e/ou b) a protease é uma variante de uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste dos aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2, aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 5, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID
20 NO: 6, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 7, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 8, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 9, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 10, aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 11, aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 12 e aminoácidos de 1 a 268 da SEQ ID NO: 13, em que a variante difere da respectiva seqüência de aminoácido
25 em não mais do que vinte e cinco aminoácidos e em que: (i) a variante compreende pelo menos uma substituição, deleção e/ou inserção de um ou mais aminoácidos quando comparada com a respectiva seqüência de aminoácido; e/ou (ii) a variante compreende pelo menos uma deleção pequena quando comparada com a respectiva seqüência de aminoácido; e/ou (iii) a

variante compreende pelo menos uma pequena Extensão de terminal N ou C quando comparada com a respectiva seqüência de aminoácido; e/ou c) a protease é uma variante alélica de uma protease tendo os aminoácidos selecionados do grupo que consiste dos aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2, aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 5, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 6, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 7, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 8, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 9, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 10, aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 11, aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 12 e aminoácidos de 1 a 268 da SEQ ID NO: 13; e/ou d) a protease é um fragmento de uma protease tendo os aminoácidos selecionados do grupo que consiste dos aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2, aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 5, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 6, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 7, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 8, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 9, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 10, aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 11, aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 12 e aminoácidos de 1 a 268 da SEQ ID NO: 13.

Em particular, a presente invenção diz respeito a uma protease para uso farmacêutico, em que a protease tem uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste dos aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2, aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 5, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 6, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 7, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 8, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 9, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 10, aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 11, aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 12 e aminoácidos de 1 a 268 da SEQ ID NO: 13.

Em uma outra forma de realização particular, a protease da invenção pode ser usada em combinação com uma protease adicional. Os exemplos de proteases adicionais são as proteases de mamífero e as proteases

microbianas. Uma protease de mamífero preferida é o extrato de pâncreas, por exemplo, de suíno ou boi, tal como pancreatina. A pancreatina pode ser usada na forma de um produto não revestido (bruto) ou na forma de um produto formulado (revestimento entérico (para fornecer resistência contra ácido gástrico) ou não funcionalmente revestido (revestido, mas não para fornecer resistência contra ácido gástrico)). A pancreatina potencialmente compreende ainda outros constituintes ativos enzimáticos como a lipase pancreática, BSSL (Lipase estimulada pelo sal biliar) e/ou amilase pancreática. As proteases microbianas preferidas derivam de cepas bacterianas ou fúngicas, por exemplo de uma cepa de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus oryzae* ou *Aspergillus melleus*, em particular o produto Prozyme 6[®] (protease alcalina neutra EC 3.4.21.63) que é comercialmente disponível da Amano Pharmaceuticals, Japão.

Opcionalmente, a protease da invenção é usada em combinação com uma lipase, com ou sem e amilase, como explicado mais abaixo.

No presente contexto, uma lipase significa uma hidrolase de éster carboxílico EC 3.1.1.-, que inclui atividades tais como EC 3.1.1.3 triacilglicerol lipase, EC 3.1.1.4 fosfolipase A1, EC 3.1.1.5 lisofosfolipase, EC 3.1.1.26 galactolipase, EC 3.1.1.32 fosfolipase A1, EC 3.1.1.73 feruloil esterase. Em uma forma de realização particular, a lipase é uma triacilglicerol lipase EC 3.1.1.3.

Em formas de realização particulares, a lipase é uma lipase de mamífero, por exemplo extrato de pâncreas de suíno ou boi, tal como pancreatina. A pancreatina pode ser usada na forma de um produto não revestido (bruto) ou na forma de um produto formulado (revestimento entérico ou não funcionalmente revestido, como definido acima). A pancreatina potencialmente compreende ainda outros constituintes enzimáticos ativos como protease pancreática, BSSL (Lipase estimulada pelo

sal biliar) e/ou amilase pancreática. A lipase também pode ser uma lipase microbiana, por exemplo derivada de cepas bacterianas ou fúngicas, tais como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aspergillus* ou *Rhizopus*. A lipase em particular pode ser derivada de uma cepa de *Rhizopus*, tais como *Rhizopus javanicus*,
 5 *Rhizopus oryzae* ou *Rhizopus delemar*, por exemplo o produto Lipase D Amano 2000® (também designado Lipase D2®) que é comercialmente disponível da Amano Pharmaceuticals, Japão.

Em outras formas de realização particulares, a lipase é uma lipase microbiana recombinantemente produzida, por exemplo derivada de
 10 um fungo tal como *Humicola* ou *Rhizomucor*, de uma levedura tal como *Candida* ou de uma bactéria tal como *Pseudomonas*. Em uma forma de realização preferida, a lipase é derivada de uma cepa de *Humicola lanuginosa* ou *Rhizomucor miehei*.

A lipase de *Humicola lanuginosa* (sinônimo *Thermomyces*
 15 *lanuginosus*) (SEQ ID NO: 14) está descrita na EP 305216 e as variantes de lipase particulares estão descritas, por exemplo, na WO 92/05249, WO 92/19726, WO 94/25577, WO 95/22615, WO 97/04079, WO 97/07202, WO 99/42566, WO 00/32758, WO 00/60063, WO 01/83770, WO 02/055679 e WO 02/066622. Uma variante de lipase de *Humicola lanuginosa* preferida é
 20 uma lipase que compreende os aminoácidos de 1 a 269 ou de 2 a 269, da SEQ ID NO: 15, tais como os seguintes: (i) aminoácidos +1 a +269 da SEQ ID NO: 15, (ii) aminoácidos -5 a +269 da SEQ ID NO: 15, (iii) aminoácidos -4 a +269 da SEQ ID NO: 15; (iv) aminoácidos -3 a +269 da SEQ ID NO: 15; (v) aminoácidos -2 a +269 da SEQ ID NO: 15; (vi) aminoácidos -1 a +269 da
 25 SEQ ID NO: 15, (vii) aminoácidos +2 a +269 da SEQ ID NO: 15, assim como (viii) qualquer mistura de duas ou mais das lipases de (i) a (vii) - assim como variantes destas. Em uma forma de realização particular, a lipase é selecionada das lipases de (i), (ii) e qualquer mistura de (i) e (ii). As misturas preferidas de (i) e (ii) compreendem pelo menos 5%, preferivelmente pelo

menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou pelo menos 95% da lipase (i), as porcentagens sendo determinadas pelo seqüenciamento de terminal N usando o método de Edman, como descrito no Exemplo 5 do pedido PCT que reivindica prioridade do pedido de patente DK 2005 00929).

- 5 Outras misturas preferidas são: (a) composições que compreendem de 35 a 75%, preferivelmente de 40 a 70%, mais preferivelmente de 45 a 65% da lipase (ii); (b) composições que compreendem de 20 a 60%, preferivelmente de 25 a 55%, mais preferivelmente de 30 a 50%, o mais preferivelmente de 35 a 47% da lipase (i); (c) composições que compreendem até 30%,
10 preferivelmente até 25%, mais preferivelmente até 20%, o mais preferivelmente até 16% da lipase (vii); e (d) qualquer combinação de (a), (b) e/ou (c), tal como uma composição que compreende de 45 a 65% da lipase (ii), de 35 a 47% da lipase (i) e até 16% da lipase (vii).

As lipases das SEQ ID NOs: 14 e 15, por exemplo, podem ser
15 preparadas como descrito na patente US nº 5.869.438 (a SEQ ID NO: 1 na patente US aludida é uma seqüência de DNA que codifica a lipase da SEQ ID NO: 14). A lipase da SEQ ID NO: 15, por exemplo, pode ser preparada pela expressão recombinante em uma célula hospedeira adequada de uma seqüência de DNA que é uma modificação da SEQ ID NO:1 da patente US, a
20 modificação refletindo as diferenças de aminoácido entre as SEQ ID NOs: 14 e 15 aqui. Tais modificações podem ser feitas pela mutagênese direcionada ao sítio, como é conhecido na técnica.

Ainda outros exemplos de lipases fúngicas são a cutinase de *Humicola insolens* que é descrita na EP 785994 e a fosfolipase de *Fusarium oxysporum* que é descrita na EP 869167. Os exemplos de lipases de levedura
25 são as lipases A e B de *Candida antarctica* das quais a lipase A é descrita na EP 652945 e a lipase B é descrita, por exemplo, por Uppenberg *et al* em Structure, 2 (1994), 293. Um exemplo de uma lipase bacteriana é a lipase derivada de *Pseudomonas cepacia*, que é descrita na EP 214761.

Em uma forma de realização preferida, a lipase é pelo menos 70% idêntica à lipase da SEQ ID NO: 15, preferivelmente os aminoácidos de 1 a 269 desta. Em formas de realização adicionais preferidas, o grau de identidade com a SEQ ID NO: 15, preferivelmente os aminoácidos de 1 a 269 desta, é pelo menos 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou pelo menos 99%. Em formas de realização alternativas, o grau de identidade com a SEQ ID NO: 15, preferivelmente os aminoácidos de 1 a 269 desta, é pelo menos cerca de 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68% ou pelo menos 69%.

Ainda em uma outra forma de realização preferida, a lipase, como a lipase de mamífero pancreática, é uma lipase específica da posição 1,3.

15 Opcionalmente, a protease da invenção, com ou sem uma lipase como descrito acima, é usada em combinação com uma amilase.

No presente contexto, uma amilase é uma enzima que catalisa a endo-hidrólise de amido e outros oligo- e polissacarídeos lineares e ramificados. A parte da amilose de amido é rica em ligações 1,4-alfa-glicosídicas, enquanto que a parte de amilopectina é mais ramificada contendo não apenas 1,4-alfa mas também ligações 1,6-alfa-glicosídicas. Em uma forma de realização particular, a amilase é uma enzima pertencente ao grupo EC 3.2.1.1.

25 Em formas de realização particulares, a amilase é uma amilase de mamífero, por exemplo extrato de pâncreas de suíno ou boi, tais como pancreatina. A pancreatina pode ser usada na forma de um produto não revestido (bruto) ou na forma de um produto formulado (revestimento entérico ou não funcionalmente revestido, como definido acima). A pancreatina potencialmente compreende ainda outros constituintes ativos

enzimáticos como protease pancreática, BSSL e/ou lipase pancreática. A amilase também pode ser uma amilase microbiana, por exemplo derivada de cepas bacterianas ou fúngicas, tais como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aspergillus* ou *Rhizopus*.

5 A amilase em particular pode ser derivada de uma cepa de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* ou *Aspergillus melleus*, por exemplo cada um dos produtos Amilase A1TM derivado de *Aspergillus oryzae* que é comercialmente disponível da Amano Pharmaceuticals, Japão ou Amilase EC[®] derivada de *Aspergillus melleus* que
10 é comercialmente disponível da Extract-Chemie, Alemanha.

Outros exemplos de amilases fúngicas são a amilase de *Aspergillus niger* (SWISSPROT P56271), que também é descrita no Exemplo 3 da WO 89/01969 e a amilase de *Aspergillus oryzae*. Os exemplos de variantes da amilase de *Aspergillus oryzae* são descritos na WO 01/34784.

15 A alfa-amilase derivada de *Bacillus licheniformis* é um exemplo de uma alfa-amilase bacteriana. Esta amilase é, por exemplo, descrita na WO 99/19467, junto com outras alfa-amilases bacterianas homólogas derivadas, por exemplo, de *Bacillus amiloliquefaciens* e *Bacillus stearothermophilus*, assim como variantes destas. Os exemplos de variantes
20 de amilase adicionais são aqueles descritos na patente US nº 4.933.279; EP 722490 e EP 904360.

As amilases preferidas são uma amilase que compreende os aminoácidos de 1 a 481 da SEQ ID NO: 16 (tais como os aminoácidos de 1 a 481, 1 a 484 ou 1 a 486 desta), os aminoácidos de 1 a 481 da SEQ ID NO: 17
25 e/ou os aminoácidos de 1 a 483 da SEQ ID NO: 18. Em uma forma de realização preferida, a amilase é pelo menos 70% idêntica a cada um de (i) aminoácidos de 1 a 481 da SEQ ID NO: 16, (ii) aminoácidos de 1 a 481 da SEQ ID NO: 17 e/ou (iii) aminoácidos de 1 a 483 da SEQ ID NO: 18. As amilases das SEQ ID NOs: 16 a 18, por exemplo, podem ser preparadas como

descrito no pedido DK co-pendente nº 2005 00931 intitulado “Amylases for Pharmaceutical Uses” e depositado em 24 de junho de 2005 pela Solvay Pharmaceuticals GmbH e Novozymes A/S.

Em formas de realização adicionais preferidas de cada um de

5 (i), (ii) ou (iii), os graus de identidade com as respectivas partes da SEQ ID NO: 16, 17 ou 18 é de pelo menos 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou pelo menos 99%. Em formas de realização alternativas, o grau de identidade com as respectivas partes da

10 SEQ ID NO: 16, 17 ou 18 é de pelo menos cerca de 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68% ou pelo menos 69%.

Para os propósitos da presente invenção, as combinações particularmente preferidas de enzimas são as seguintes: (i) A protease dos

15 aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2 em combinação com uma lipase que compreende os aminoácidos de 1 a 269 ou de 2 a 269, da SEQ ID NO: 15; (ii) a protease dos aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2 em combinação com uma amilase que compreende os aminoácidos de 1 a 481 da SEQ ID NO: 16 (tais como os aminoácidos de 1 a 481, 1 a 484 ou 1 a 486

20 desta); (iii) a protease dos aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2 em combinação com a amilase tendo os aminoácidos de 1 a 481 da SEQ ID NO: 17; (iv) a protease dos aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2 em combinação com a amilase tendo os aminoácidos de 1 a 483 da SEQ ID NO: 18; (v) a protease dos aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2 em

25 combinação com uma amilase que compreende os aminoácidos de 1 a 481 da SEQ ID NO: 16 (tais como os aminoácidos de 1 a 481, 1 a 484 ou 1 a 486 desta) e uma lipase que compreende os aminoácidos de 1 a 269 ou de 2 a 269, da SEQ ID NO: 15; (vi) a protease dos aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2 em combinação com a amilase tendo os aminoácidos de 1 a 481 da

SEQ ID NO: 17 e uma lipase que compreende os aminoácidos de 1 a 269 ou de 2 a 269, da SEQ ID NO: 15; e (vii) a protease dos aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2 em combinação com a amilase tendo os aminoácidos de 1 a 483 da SEQ ID NO: 18 e uma lipase que compreende os aminoácidos de 1 a 269 ou de 2 a 269, da SEQ ID NO: 15.

Conseqüentemente, uma forma de realização da presente invenção diz respeito a uma protease em combinação com uma lipase e/ou uma amilase para uso farmacêutico, em que (i) a protease é uma protease como aqui definida; (ii) a lipase compreende os aminoácidos de 2 a 269 da SEQ ID NO: 15; e (iii) a amilase é uma amilase selecionada do grupo que consiste de: a) uma amilase que compreende os aminoácidos de 1 a 481 da SEQ ID NO: 16, b) uma amilase tendo os aminoácidos de 1 a 481 da SEQ ID NO: 17 e c) uma amilase tendo os aminoácidos de 1 a 483 da SEQ ID NO: 18.

Em particular, a presente invenção diz respeito a uma protease em combinação com uma lipase e/ou uma amilase para uso farmacêutico, em que (i) a protease compreende ou preferivelmente é ou tem, os aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2; (ii) a lipase compreende os aminoácidos de 2 a 269 da SEQ ID NO: 15; e (iii) a amilase é uma amilase selecionada do grupo que consiste de: a) uma amilase que compreende os aminoácidos de 1 a 481 da SEQ ID NO: 16, b) uma amilase tendo os aminoácidos de 1 a 481 da SEQ ID NO: 17 e c) uma amilase tendo os aminoácidos de 1 a 483 da SEQ ID NO: 18.

Outras combinações preferidas de enzimas são as seguintes: (i) Uma protease tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2 em combinação com uma lipase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 15; (ii) uma protease tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2 em combinação com uma amilase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos de 1 a 481 da SEQ ID NO: 16; (iii)

uma protease tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2 em combinação com uma amilase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos de 1 a 481 da SEQ ID NO: 17; (iv) uma protease tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2 em combinação com uma amilase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos de 1 a 483 da SEQ ID NO: 18; (v) uma protease tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2 em combinação com uma amilase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos de 1 a 481 da SEQ ID NO: 16 e uma lipase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 15; (vi) uma protease tendo 50% de identidade com os aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2 em combinação com uma amilase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos de 1 a 481 da SEQ ID NO: 17 e uma lipase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 15; e (vii) uma protease tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2 em combinação com uma amilase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos de 1 a 483 da SEQ ID NO: 18 e uma lipase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 15. Em formas de realização preferidas de (i) a (vii), cada grau de identidade é, independentemente, pelo menos 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou pelo menos 99%.

Conseqüentemente, uma forma de realização da presente invenção diz respeito a uma protease em combinação com uma lipase e/ou uma amilase para uso farmacêutico, em que (i) a protease é selecionada do grupo de a) uma protease tendo pelo menos 50% de identidade com os

aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2; b) uma protease que compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste dos aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2, aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 5, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 6, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 7, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 8, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 9, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 10, aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 11, aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 12 e aminoácidos de 1 a 268 da SEQ ID NO: 13; c) uma protease sendo uma variante de uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste dos aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2, aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 5, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 6, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 7, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 8, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 9, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 10, aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 11, aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 12 e aminoácidos de 1 a 268 da SEQ ID NO: 13, em que a variante difere da respectiva seqüência de aminoácido em não mais do que vinte e cinco aminoácidos e em que: (i) a variante compreende pelo menos uma substituição, deleção e/ou inserção de um ou mais aminoácidos quando comparada com a respectiva seqüência de aminoácido; e/ou (ii) a variante compreende pelo menos uma deleção pequena quando comparada com a respectiva seqüência de aminoácido; e/ou (iii) a variante compreende pelo menos uma pequena extensão de terminal N ou C quando comparada com a respectiva seqüência de aminoácido; d) uma protease sendo uma variante alélica de uma protease tendo os aminoácidos selecionados do grupo que consiste dos aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2, aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 5, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 6, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 7, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 8, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 9, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 10, aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 11, aminoácidos de

1 a 269 da SEQ ID NO: 12 e aminoácidos de 1 a 268 da SEQ ID NO: 13; e) uma protease sendo um fragmento de uma protease tendo os aminoácidos selecionados do grupo que consiste dos aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2, aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 5, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 6, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 7, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 8, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 9, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 10, aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 11, aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 12 e aminoácidos de 1 a 268 da SEQ ID NO: 13; e f) uma protease tendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste dos aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2, aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 5, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 6, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 7, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 8, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 9, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 10, aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 11, aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 12 e aminoácidos de 1 a 268 da SEQ ID NO: 13; (ii) a lipase tem pelo menos 70% de identidade com uma lipase tendo os aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 15; e (iii) a amilase tem pelo menos 70% de identidade com uma amilase selecionada do grupo que consiste de: a) uma amilase tendo os aminoácidos de 1 a 481 da SEQ ID NO: 16, b) uma amilase tendo os aminoácidos de 1 a 481 da SEQ ID NO: 17 e c) uma amilase tendo os aminoácidos de 1 a 483 da SEQ ID NO: 18.

No geral, as enzimas de protease, lipase e amilase (daqui em diante “a(s) enzima(s),” a saber as enzimas da invenção) podem ser enzimas naturais ou do tipo selvagem (obtidas de animais, em particular mamíferos, por exemplo enzimas humanas ou de suíno; de plantas ou de microorganismos), mas também quaisquer mutantes, variantes, fragmentos etc. destas que exibam a atividade enzimática desejada, assim como enzimas sintéticas, tais como enzimas misturadas, híbridas ou enzimas quiméricas e

enzimas de consenso.

Em uma forma de realização específica, a(s) enzima(s) são variantes alergênicas baixas, planejadas para invocar uma resposta imunológica reduzida quando expostas aos animais, incluindo o ser humano.

- 5 O termo resposta imunológica deve ser entendida como qualquer reação pelo sistema imune de um animal exposto à(s) enzima(s). Um tipo de resposta imunológica é uma resposta alérgica que leva aos níveis aumentados de IgE no animal exposto. As variantes alergênicas baixas podem ser preparadas usando técnicas conhecidas no ramo. Por exemplo a(s) enzima(s) pode(m) ser
- 10 conjugada(s) com porções que protegem as partes poliméricas ou epítomos da(s) enzima(s) envolvida(s) em um resposta imunológica. A conjugação com polímeros pode envolver ligação química *in vitro* de polímero com a(s) enzima(s), por exemplo como descrito na WO 96/17929, WO 98/30682, WO 98/35026 e/ou WO 99/00489. A conjugação pode além disso ou
- 15 alternativamente a isto envolver a ligação *in vivo* de polímeros à(s) enzima(s). Tal conjugação pode ser obtida pelo engenheiramento genético da sequência de nucleotídeo que codifica a(s) enzima(s), inserção das seqüências de consenso que codificam sítios de glicosilação adicionais na(s) enzima(s) e expressão da(s) enzima(s) em um hospedeiro capaz de glicosilar a(s)
- 20 enzima(s), ver por exemplo a WO 00/26354. Um outro modo de fornecer variantes alergênicas baixas é o engenheiramento genético da sequência de nucleotídeo que codifica a(s) enzima(s) de modo a fazer com que as enzimas se auto-oligomerizem, no sentido de que os monômeros de enzima possam proteger os epítomos de outros monômeros de enzima e diminuindo deste
- 25 modo a antigenicidade dos oligômeros. Tais produtos e a sua preparação é descrita por exemplo na WO 96/16177. Os epítomos envolvidos em uma resposta imunológica podem ser identificados por vários métodos tais como o método da demonstração de fago descritos na WO 00/26230 e WO 01/83559 ou o método aleatório descrito na EP 561907. Uma vez que um epítomo tenha

sido identificado, a sua seqüência de aminoácido pode ser alterada para produzir propriedades imunológicas alteradas da(s) enzima(s) pelas técnicas de manipulação de gene conhecidas tais como a mutagênese direcionada ao sítio (ver por exemplo a WO 00/26230, WO 00/26354 e/ou WO 00/22103) e/ou a conjugação de um polímero pode ser feita em proximidade suficiente ao epítipo para o polímero proteger o epítipo.

Em formas de realização particulares, a(s) enzima(s) são (i) estáveis no pH 2 a 8, preferivelmente também no pH 3 a 7, mais preferivelmente no pH 4 a 6; (ii) ativo no pH 4 a 9, preferivelmente 4 a 8; (iii) estáveis contra a degradação pela pepsina e outras proteases digestivas (tais como as proteases pancreáticas, isto é, principalmente tripsina e quimiotripsina); e/ou (iv) estáveis e/ou ativos na presença de sais biliares.

Preferivelmente, a protease da invenção é estável ao ácido, o que significa que a enzima de protease pura permanece ativo mesmo depois da exposição continuada a um ambiente ácido. Preferivelmente, a atividade remanescente é um fator 1,1, 1,2, 1,3, 1,5, 1,6, 1,8, 2,0, 2,5 e 3,0 mais alto do que a atividade remanescente de uma protease comparável já conhecida para propósitos farmacêuticos.

Em outras formas de realização particulares, a estabilidade ao ácido significa que a atividade de protease da enzima de protease pura, em uma diluição que corresponde a $A_{280} = 1,0$ e seguindo incubação por 2 horas a 37°C a seguir de tampão (100 mM de ácido succínico, 100 mM de HEPES, 100 mM de CHES, 100 mM de CABS, 1 mM de CaCl_2 , 150 mM de KCl, 0,01% de Triton® X-100, pH 3,5) é de pelo menos 40% (ou pelo menos 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ou pelo menos 97%) da atividade de referência, como medido usando o ensaio descrito no Exemplo 2C da WO 01/58276 (substrato: SucAAPF-pNA, pH 9,0, 25°C). O termo atividade de referência refere-se à atividade de protease das mesmas protease, a seguir da incubação na forma pura, em uma diluição que corresponde a $A_{280} = 1,0$, por

2 horas a 5°C a seguir tampão (100 mM de ácido succínico, 100 mM de HEPES, 100 mM de CHES, 100 mM de CABS, 1 mM de CaCl₂, 150 mM de KCl, 0,01% de Triton® X-100, pH 9,0) em que a atividade é determinada como descrito acima. O termo A₂₈₀ = 1,0 significa concentração (diluição) tal da dita protease pura que dê origem a uma absorção de 1,0 a 280 nm em uma cubeta de 1 cm de trajetória em relação a um branco de tampão. O termo protease pura refere-se a uma amostra com uma razão de A₂₈₀/A₂₆₀ acima ou igual a 1,70 (ver o Exemplo 2E da WO 01/58276) e que por uma varredura de um gel de SDS-PAGE tingido com Coomassie é medido para ter pelo menos 95% de sua intensidade de varredura na faixa que corresponde à dita protease (ver o Exemplo 2A da WO 01/58276).

O termo “em combinação com” refere-se ao uso combinado de acordo com a invenção da protease, lipase e/ou amilase. O uso combinado pode ser simultâneo, sobreposto ou seqüencial, estes três termos sendo no geral interpretado considerando-se a prescrição feita pelo médico.

O termo “simultâneo” refere-se às circunstâncias sob as quais as enzimas são ativas ao mesmo tempo, por exemplo quando eles são administrados ao mesmo tempo como um ou mais produtos farmacêuticos separados ou se eles são administrados em uma e na mesma composição farmacêutica.

O termo “seqüencial” refere-se a tais casos onde uma e/ou duas das enzimas estão atuando primeiro e a segunda e/ou terceira enzima subsequente. Uma ação seqüencial pode ser obtida pela administração das enzimas em questão como formulações farmacêuticas separadas com intervalos desejados ou como uma composição farmacêutica em que as enzimas em questão são diferentemente formuladas (compartimentalizadas), por exemplo com uma vista para a obtenção de um tempo de liberação subsequente, fornecendo uma estabilidade de produto melhorada ou para otimizar a dosagem da enzima.

O termo “sobreposto” refere-se a tais casos onde os períodos de atividade da enzima não são nem completamente simultâneos nem completamente sequenciais, isto é existe um certo período em que as enzimas são ambas ou todas, ativas.

5 O termo “um”, por exemplo quando usada no contexto da(s) enzima(s) da invenção, significa pelo menos um. Em formas de realização particulares, “um” significa “um ou mais,” ou “pelo menos um”, que mais uma vez significa um, dois, três, quatro, cinco, etc.

10 A relacionabilidade entre duas seqüências de aminoácido é descrita pelo parâmetro “identidade”.

Para os propósitos da presente invenção, o alinhamento de duas seqüências de aminoácido é determinado usando-se o programa de Needle do pacote EMBOSS (<http://emboss.org>) versão 2.8.0. O programa de Needle implementa o algoritmo de alinhamento global descrito em
15 Needleman, S. B. e Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453. A matriz de substituição usada é BLOSUM62, penalidade de abertura de intervalo é 10 e a penalidade de extensão de intervalo é 0,5.

O grau de identidade entre uma seqüência de aminoácido da presente invenção (“seqüência da invenção”; por exemplo aminoácidos de 1 a
20 274 da SEQ ID NO: 2) e uma seqüência de aminoácido diferente (“seqüência estranha”; por exemplo aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 1 da WO 2005/115445) é calculada como o número de emparelhamentos exatos em um alinhamento das duas seqüências, dividido pelo comprimento da “seqüência da invenção” ou o comprimento da “seqüência estranha”, seja qual for a mais
25 curta. O resultado é expressado na identidade percentual.

Um emparelhamento exato ocorre quando a “seqüência da invenção” e a “seqüência estranha” têm resíduos de aminoácido idênticos nas mesmas posições da sobreposição (no exemplo de alinhamento abaixo isto é representado por “I”). O comprimento de uma seqüência é o número de

resíduos de aminoácido na seqüência (por exemplo o comprimento da SEQ ID NO: 2 é 274).

No exemplo de alinhamento, puramente hipotético, abaixo, a sobreposição é a seqüência de aminoácido “HTWGER-NL” da Seqüência 1; ou a seqüência de aminoácido “HGWGEDANL” da Seqüência 2. No exemplo um intervalo é indicado por um “-”.

Exemplo de alinhamento hipotético:

Seqüência 1: ACMSHTWGER-NL

| ||| ||

10 Seqüência 2: HGWGEDANLAMNPS

Conseqüentemente, a porcentagem de identidade da Seqüência 1 para a Seqüência 2 é $6/12 = 0,5$, que corresponde a 50%.

Em uma forma de realização particular, a porcentagem de identidade de uma seqüência de aminoácido de um polipeptídeo com ou aos, aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2 é determinada por i) alinhando as duas seqüências de aminoácido usando o programa Needle, com a matriz de substituição BLOSUM62, uma penalidade de abertura de intervalo de 10 e uma penalidade de extensão de intervalo de 0,5; ii) contar o número de emparelhamentos exatos no alinhamento; iii) dividir o número de emparelhamentos exatos pelo comprimento da mais curta das duas seqüências de aminoácido e iv) converter o resultado da divisão de iii) em porcentagem.

Na alternativa, o grau de identidade entre duas seqüências de aminoácido pode ser determinado pelo programa “align” que é um alinhamento de Needleman-Wunsch (isto é, um alinhamento global). As seqüências são alinhadas pelo programa, usando a matriz de contagem de padrão BLOSUM50. A penalidade para o primeiro resíduo de um intervalo é 12 e para os outros resíduos de um intervalo as penalidades são 2. O algoritmo de Needleman-Wunsch é descrito em Needleman, S. B. e Wunsch, C. D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48: 443-453 e o programa align

por Myers e W. Miller em “Optimal Alignments in Linear Space” CABIOS (computer applications in the biosciences) (1988) 4: 11-17. “Align” é parte do pacote FASTA versão v20u6 (ver W. R. Pearson e D. J. Lipman (1988), “Improved Tools for Biological Sequence Analysis”, PNAS 85: 2444-2448 e

5 W. R. Pearson (1990) “Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP e FASTA,” Methods in Enzymology 183: 63-98).

O grau de identidade entre uma amostra ou teste, a sequência de qualquer uma da(s) enzima(s) da invenção e uma sequência especificada pode ser determinado como segue: As duas sequências são alinhadas usando o

10 programa “align.” O número de emparelhamentos perfeitos (“Emparelhamentos perfeitos N”) no alinhamento é determinado (um emparelhamento perfeito significa o mesmo resíduo de aminoácido na mesma posição do alinhamento). O comprimento comum das duas sequências alinhadas também é determinado, a saber o número total dos aminoácidos no

15 alinhamento (a sobreposição), incluindo os intervalos de arrasto e carregador criado pelo alinhamento, se algum (“sobreposição N”). O grau de identidade é calculado como a razão entre “Emparelhamentos perfeitos N” e “sobreposição N” (para a conversão de identidade percentual, multiplicar por 100).

O grau de identidade entre a sequência de amostra ou de teste

20 e uma sequência especificada também pode ser determinado como segue: As sequências são alinhadas usando o programa “align.” O número de emparelhamentos perfeitos (“Emparelhamentos perfeitos N”) no alinhamento é determinado (um emparelhamento perfeito significa o mesmo resíduo de aminoácido na mesma posição do alinhamento). O comprimento da sequência

25 de amostra (o número de resíduos de aminoácido) é determinado (“amostra N”). O grau de identidade é calculado como a razão entre “Emparelhamentos perfeitos N” e “amostra N” (para a conversão da identidade percentual, multiplicar por 100).

O grau de identidade entre a sequência de amostra ou teste e

uma seqüência especificada também pode ser determinada como segue: As seqüências são alinhadas usando o programa “align.” O número de emparelhamentos perfeitos (“Emparelhamentos perfeitos N”) no alinhamento é determinado (um emparelhamento perfeito significa o mesmo resíduo de aminoácido na mesma posição do alinhamento). O comprimento da seqüência especificada (o número de resíduos de aminoácido) é determinado (“especificado N”). O grau de identidade é calculado como a razão entre “Emparelhamentos perfeitos N” e “especificado N” (para a conversão de identidade percentual, multiplicar por 100).

Preferivelmente, a sobreposição é de pelo menos 20% da seqüência especificada (“sobreposição N” como definido acima, dividido pelo número dos aminoácidos na seqüência especificada (“especificado N”) e multiplicado por 100), mais preferivelmente pelo menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou pelo menos 95%. Isto significa que pelo menos 20% (preferivelmente 25 a 95%) dos aminoácidos da seqüência especificada encontram-se incluídos na sobreposição, quando a seqüência de amostra é alinhada com a seqüência especificada.

Na alternativa, a sobreposição é de pelo menos 20% da seqüência especificada (“sobreposição N” como definido acima, dividido pela “amostra N” como definido acima e multiplicado por 100), mais preferivelmente pelo menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou pelo menos 95%. Isto significa que pelo menos 20% (preferivelmente 25 a 95%) dos aminoácidos da seqüência de amostra encontram-se incluídos na sobreposição, quando alinhados contra a seqüência especificada.

A atividade da(s) enzima(s) da invenção pode ser medida usando qualquer ensaio adequado. No geral, o pH do ensaio e a temperatura do ensaio podem ser adaptados à enzima em questão. Os exemplos de valores

de pH do ensaio são pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12. Os exemplos de temperaturas do ensaio são 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90 ou 95°C. os valores de pH preferidos e as temperaturas estão na faixa fisiológica, tais como valores de pH de 4, 5, 6, 7 ou 8 e temperaturas de 30, 35, 37 ou 40°C.

Por exemplo, a atividade de protease pode ser medida usando qualquer ensaio, em que um substrato é utilizado, que inclui ligações peptídicas relevantes para a especificidade da protease em questão. Os exemplos de ensaios de enzima adequados são incluídos na parte experimental, ver o Exemplo 2 em particular. Outros exemplos são os ensaios da Ph. Eur. quanto à atividade de lipase e amilase

Medicamento

No presente contexto, o termo “medicamento” significa um composto ou mistura de compostos, que trata, previne e/ou alivia os sintomas da doença; preferivelmente que trata e/ou alivia os sintomas da doença. O medicamento pode ser prescrito por um médico ou pode ser um produto vendido sem receita.

As composições farmacêuticas

A isolamento, purificação e concentração da(s) enzima(s) da invenção podem ser realizadas por meios convencionais. Por exemplo, eles podem ser recuperados a partir de um caldo de fermentação pelos procedimentos convencionais incluindo, mas não limitado a, centrifugação, filtração, extração, secagem por pulverização, evaporação ou precipitação e ainda purificados por uma variedade de procedimentos conhecidos na técnica incluindo, mas não limitado à, cromatografia (por exemplo, troca iônica, afinidade, hidrofóbica, cromatofocalização e exclusão de tamanho), procedimentos eletroforéticos (por exemplo, focalização eletroforética preparativa), solubilidade diferencial (por exemplo, precipitação com sulfato de amônio), SDS-PAGE ou extração (ver, por exemplo, Protein Purification,

J.-C. Janson e Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nova Iorque, 1989).

A preparação de uma protease pura da invenção é descrita no Exemplo 1 aqui. Neste exemplo, o gene que codifica a chamada componente C protease (SEQ ID NO: 4, codificado pela SEQ ID NO: 3) foi deletado da cepa produtora do *Bacillus licheniformis* pela mutagênese direcionada ao sítio, como é conhecido na técnica. Um outro método para a deleção deste gene pode ser, por exemplo, a mutação clássica como descrita, por exemplo, na patente US nº 4.266.031, preferivelmente combinada com os métodos de triagem de alto rendimento do estado da técnica.

No Exemplo 1, a célula que expressa a protease da SEQ ID NO: 2 é derivada de uma cepa do tipo selvagem do *Bacillus licheniformis*, a saber a cepa ATCC 14580, que está publicamente disponível da American Type Culture Collection, ATCC. Pode ser preferível inserir uma ou mais cópias adicionais de um gene que codifica uma protease da invenção, por exemplo um gene que codifica os aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2, nesta célula. Isto pode ser feito, por exemplo, como descrito na WO 02/00907, usando, por exemplo, um promotor divulgado na WO 99/43835.

Em uma forma de realização particular, preparações sólidas ou líquidas concentradas de cada uma das enzimas são preparadas separadamente. Estes concentrados, pelo menos em parte, podem ser separadamente formulados, como explicado em mais detalhes abaixo.

Em uma outra forma de realização particular, a(s) enzima(s) é/são incorporada(s) nas composições farmacêuticas da invenção na forma de concentrados sólidos. A(s) enzima(s) pode(m) ser levada(s) ao estado sólido por vários métodos como é conhecido na técnica. Por exemplo, o estado sólido pode ser cristalino, onde as moléculas de enzima são dispostos em uma forma altamente ordenada ou um precipitado, onde as moléculas de enzima são dispostas em uma forma menos ordenada ou desordenada.

A cristalização, por exemplo, pode ser realizada em um pH

próximo ao pI da(s) enzima(s) e em baixa condutividade, por exemplo 10 mS/cm ou menos, como descrito na EP 691982.

Vários métodos de precipitação são conhecidos na técnica, incluindo a precipitação com sais, tais como sulfato de amônio e/ou sulfato de sódio; com solventes orgânicos, tais como etanol e/ou isopropanol; ou com polímeros, tais como PEG (Poli Etileno Glicol). Na alternativa, a(s) enzima(s) podem ser precipitadas a partir de uma solução pela remoção do solvente (tipicamente água) pelos vários métodos conhecidos na técnica, por exemplo liofilização, evaporação (por exemplo na pressão reduzida) e/ou secagem por pulverização.

Em uma outra forma de realização particular, o concentrado sólido da(s) enzima(s) tem um teor de proteína de enzima ativa de pelo menos 50% (p/p) por referência ao teor de proteína total do concentrado sólido. Ainda em outras formas de realização particulares, o teor de proteína de enzima ativa, em relação ao teor de proteína total do concentrado sólido é de pelo menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 ou pelo menos 95% (p/p). O teor de proteína pode ser medido como é conhecido na técnica, por exemplo pela varredura densitométrica de géis de SDS-PAGE tingido com coomassie, usando-se um kit comercial, tal como o Ensaio de Proteína ESL, ordem nº 1767003, que é comercialmente disponível da Roche ou com base no método descrito no Exemplo 8 da WO 01/58276.

Preferivelmente, a proteína de enzima da protease constitui pelo menos 50%, mais preferivelmente pelo menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96 ou pelo menos 97% do espectro de proteína do concentrado de protease sólida para o uso de acordo com a invenção, como medido pela varredura densitométrica de um gel de SDS-PAGE tingido com coomassie.

Uma composição farmacêutica da invenção compreende a(s) enzima(s), preferivelmente na forma de preparações de enzima concentradas, mais preferivelmente concentrados sólidos, junto com pelo menos um

material auxiliar ou subsidiário farmacêuticamente aceitável, tal como (i) pelo menos um carregador e/ou excipiente; ou (ii) pelo menos um carregador, excipiente, diluente e/ou adjuvante. Os exemplos não limitantes de outros ingredientes opcional,, todos farmacêuticamente aceitáveis, são

5 desintegradores, lubrificantes, agentes de tamponamento, agentes umectantes, conservantes, agentes flavorizantes, solventes, agentes de solubilização, agentes de suspensão, emulsificadores, estabilizadores, propelentes e veículos.

No geral, dependendo i.a. da indicação médica em questão, a

10 composição da invenção pode ser planejada para todas as maneiras de administração conhecidas na técnica, preferivelmente incluindo a administração enteral (através do canal alimentar). Assim, a composição pode estar nas formas sólida, semi-sólida, líquida ou gasosa, tais como tabletes, cápsulas, pós, grânulos, microesferas, ungüentos, cremes, espumas, soluções,

15 supositório, injeções, inalantes, géis, microesferas, loções e aerossóis. O médico saberá selecionar a via mais adequada de administração e naturalmente evitar as vias de administração potencialmente nocivas ou de outro modo desvantajosa.

Os seguintes métodos e materiais auxiliares são portanto

20 também meramente exemplares e não são de nenhum modo limitantes.

Para as preparações sólidas orais, a(s) enzima(s) pode(m) ser usada(s) sozinha(s) ou em combinação com aditivos apropriados para fabricar pelotas, micropelotas, tabletes, microtabletes, pós, grânulos ou cápsulas, por exemplo, com carregadores convencionais, tais como lactose, manitol, amido

25 de milho ou amido de batata; com excipientes ou aglutinantes, tais como celulose cristalina ou microcristalina, derivados de celulose, acácia, amido de milho ou gelatinas; com desintegradores, tais como amido de milho, amido de batata ou carboximetilcelulose sódica; com lubrificantes, tais como cera de carnaúba, cera branca, goma laca, sílica coloidal isenta de água, polietileno

glicol (PEGs, também conhecidos sob o termo macrogol) de 1500 a 20000, em particular PEG 4000, PEG 6000, PEG 8000, povidona, talco, mono-oleína ou estearato de magnésio; e se desejado, com diluentes, adjuvantes, agente de tamponamento, agentes umidificadores, conservantes tais como metil-para-
5 hidroxibenzoato (E218), agentes de coloração tais como dióxido de titânio (E171) e agentes flavorizantes tais como sacarose, sacarina, óleo de laranja, óleo de limão e vanilina. As preparações orais são exemplos de preparações preferidas para o tratamento da indicação médica de PEI.

A(s) enzima(s), muito no geral, também podem ser formuladas
10 em preparações orais líquidas, dissolvendo-as, colocando-as em suspensão ou emulsificando-as em um solvente aquoso tal como água ou em solventes não aquosos tais como vegetais ou outros óleos similares, glicerídeos de ácido alifático sintéticos, ésteres de ácidos alifáticos superiores, propileno glicol, polietileno glicol tais como PEG 4000 ou álcoois inferiores tais como álcoois
15 C₁-C₄ lineares ou ramificados, por exemplo 2-propanol; e se desejado, com materiais ou aditivos subsidiários convencionais tais como solubilizadores, adjuvantes, diluentes, agentes isotônicos, agentes de suspensão, agentes emulsificadores, estabilizantes e conservantes.

Além disso, a(s) enzima(s) no geral podem ser fabricadas em
20 supositório, para a administração retal misturando-se com uma variedade de bases tais como bases emulsificantes ou bases solúveis em água. O supositório pode incluir veículos tais como manteiga de cacau, carboceras e polietileno glicóis, que fundem na temperatura corporal, embora sejam solidificadas na temperatura ambiente.

25 O uso de lipossomas, como um veículo de liberação é um outro método de interesse geral possível. Os lipídeos podem ser qualquer combinação útil de lipídeos que formem lipossoma conhecidos, incluindo lipídeos catiônicos ou zwitteriônicos, tais como fosfatidilcolina. O lipídeo remanescente normalmente será um lipídeo neutro ou ácido, tal como

colesterol, fosfatidil serina, fosfatidil glicerol e outros. Para preparar os lipossomas, o procedimento descrito por Kato *et al.* (1991) J. Biol. Chem. 266:3361 pode ser usado.

5 As formas de dosagem unitária para a administração oral ou retal tais como xaropes, elixires, pós e suspensões podem ser fornecidas em que cada unidade de dosagem, por exemplo, o que cabe em uma colher de chá, o que cabe em uma colher de sopa, cápsula, tablete ou supositório, contém uma quantidade pré determinada da(s) enzima(s). Similarmente, as formas de dosagem unitárias para injeção podem compreender a(s) enzima(s)
10 em uma composição como uma solução em água estéril, solução salina estéril ou um outro carregador farmacêuticamente aceitável.

O termo “forma de dosagem unitária”, como aqui usado, refere-se a unidades fisicamente separadas adequadas como dosagens unitárias para pacientes humanos e animal, cada unidade contendo uma
15 quantidade pré determinada de enzima(s) em uma quantidade suficiente para produzir o efeito desejado.

Em uma forma de realização particular, a composição farmacêutica da invenção é para a administração enteral, preferivelmente oral.

Em outras formas de realização particulares, a composição oral
20 é (i) uma composição líquida contendo cristais da(s) enzima(s); (ii) uma suspensão líquida de sedimentos de enzima(s) (altamente) purificada(s); (iii) um gel contendo a(s) enzima(s) na forma sólida ou solubilizada; (iv) uma suspensão líquida de enzima(s) imobilizada(s) ou de enzimas adsorvidas nas partículas e outros; ou (v) uma composição sólida na forma de pó, pelotas,
25 grânulos ou microesferas contendo a(s) enzima(s), se desejado na forma de tabletes, cápsulas ou coisa parecida, que são opcionalmente revestidas, por exemplo com um revestimento estável ao ácido.

Em uma outra forma de realização particular da composição, a(s) enzima(s) são compartimentalizadas, a saber separadas umas das outras,

por exemplo por meio de revestimentos separados.

Ainda em uma outra forma de realização particular da composição, a protease é separada de outros componentes enzimáticos da composição, tais como a lipase e/ou a amilase.

5 A dosagem da(s) enzima(s) variará amplamente, dependendo da(s) enzima(s) específica(s) a ser(em) administrada(s), da frequência de administração, da maneira de administração, da gravidade dos sintomas e da suscetibilidade do paciente aos efeitos colaterais e outros. Algumas das enzimas específicas podem ser mais potentes do que outras.

10 Os exemplos de preparações orais sólidas da(s) enzima(s) da invenção compreendem: (i) uma protease da invenção que compreende uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2; (ii) uma lipase tendo pelo menos 70% de identidade com uma lipase tendo os aminoácidos de 1 a 269 da SEQ
15 ID NO: 15; e (iii) uma amilase tendo pelo menos 70% de identidade com uma amilase selecionada do grupo que consiste de a) uma amilase tendo os aminoácidos de 1 a 481 da SEQ ID NO: 16, b) uma amilase tendo os aminoácidos de 1 a 481 da SEQ ID NO: 17 e c) uma amilase tendo os aminoácidos de 1 a 483 da SEQ ID NO: 18; em que preferivelmente as
20 dosagens clínicas diárias previstas das enzimas de (i), (ii) e (iii) são como segue (todas em mg de proteína de enzima por kg de peso corporal (pc)): para a protease de (i): 0,005 a 500, 0,01 a 250, 0,05 a 100 ou 0,1 a 50 mg/kg de pc; para a lipase de (ii): 0,01 a 1000, 0,05 a 500, 0,1 a 250 ou 0,5 a 100 mg/kg de pc; para a amilase de (iii): 0,001 a 250, 0,005 a 100, 0,01 a 50 ou 0,05 a 10
25 mg/kg de pc.

Um exemplo preferido de preparações orais sólidas da(s) enzima(s) da invenção compreende: (i) uma protease que compreende, preferivelmente tendo, os aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2; (ii) uma lipase que compreende os aminoácidos de 2 a 269 da SEQ ID NO: 15 e/ou

(iii) uma amilase que compreende os aminoácidos de 1 a 481 da SEQ ID NO: 16.

Os exemplos de dosagens clínicas diárias previstas das enzimas de (i), (ii) e (iii) são como segue (todas em mg de proteína de enzima por kg de peso corporal (pc)): para a protease de (i): 0,05 a 100, 0,1 a 50 ou 0,5 a 25 mg/kg de pc; para a lipase de (ii): 0,1 a 250, 0,5 a 100 ou 1 a 50 mg/kg de pc; para a amilase de (iii): 0,01 a 50, 0,05 a 10 ou 0,1 a 5 mg/kg de pc.

As ligações de amida (peptídeo), assim como os terminais amino e carbóxi, podem ser modificados para maior estabilidade sobre a administração oral. Por exemplo, o terminal carbóxi pode ser amidado.

As formas de realização particulares das composições farmacêuticas da invenção, adequadas para o tratamento de distúrbios digestivos, PEI, pancreatite, fibrose cística, diabetes tipo I e/ou diabetes tipo II, podem ser preparadas pela incorporação da(s) enzima(s) da invenção em pelotas. As pelotas no geral podem compreender de 10 a 90% (p/p, em relação ao peso seco das pelotas resultantes) de um polímero orgânico fisiologicamente aceitável, de 10 a 90% (p/p, em relação ao peso seco das pelotas resultantes) de celulose ou um derivado de celulose e de 80 a 20% (p/p, em relação ao peso seco das pelotas resultantes) da(s) enzima(s), a quantidade total de polímero orgânico, celulose ou derivado de celulose e enzima(s) perfazendo até 100% em cada caso.

O polímero orgânico fisiologicamente aceitável pode ser selecionado do grupo que consiste de polietileno glicol 1500, polietileno glicol 2000, polietileno glicol 3000, polietileno glicol 4000, polietileno glicol 6000, polietileno glicol 8000, polietileno glicol 10000, polietileno glicol 20000, hidroxipropil metilcelulose, polioxietileno, copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno e misturas dos ditos polímeros orgânicos. O polietileno glicol 4000 é preferido como polímero orgânico fisiologicamente

aceitável.

A celulose ou um derivado de celulose por exemplo pode ser selecionado de celulose, acetato de celulose, éster de ácido graxo de celulose, nitratos de celulose, éter de celulose, carboximetil celulose, etil celulose, 5 hidroxietil celulose, hidroxipropil celulose, metil celulose, metil etilcelulose e metil-hidroxipropil celulose. A celulose, em particular celulose microcristalina é preferida como celulose ou derivado de celulose.

As pelotas resultantes podem ser revestidas com um revestimento entérico adequado, outros revestimentos não funcionais ou ser 10 usadas diretamente sem tal revestimento. Além disso, as pelotas resultantes podem ser enchidas em cápsulas como cápsulas de gelatina dura ou cápsulas isentas de gelatina de um tamanho adequado para terapia de um distúrbio ou doença como descrito em mais detalhes acima. Em uma forma de realização da invenção, as pelotas produzidas a partir de tipos de enzima diferentes, em 15 particular da lipase, protease e/ou amilase podem ser enchidas nas ditas cápsulas. Durante o enchimento das cápsulas com os tipos de enzima diferentes, a dosagem dos tipos de enzima únicos (a saber lipase, protease ou amilase) pode ser adaptada para as necessidades específicas de um certo grupo de indicação ou um certo subgrupo de paciente pela adição de uma 20 quantidade especificada de qualquer uma de lipase, protease e/ou amilase às cápsulas, isto é, as cápsulas podem ser produzidas de modo que variem em suas razões específicas de lipase:protease:amilase.

As composições farmacêuticas preferidas da lipase da invenção são descritas na WO 2005/092370, em particular as formulações que 25 compreendem os excipientes preferidos mencionados nesta. Em uma forma de realização particularmente preferida, a composição farmacêutica compreende uma mistura de macrogolglicerídeo de mono-, di- e tri-acilglicerídeos e polietileno glicol (PEG) mono- e di-ésteres de ácidos carboxílicos C₆-C₂₂ e também possivelmente pequenas proporções de glicerol e polietileno glicol

livre.

O polietileno glicol (PEG) contido nas misturas de macrogolglicerídeo é preferivelmente PEG que tem em média de 6 a no máximo 40 unidades de óxido de etileno por molécula ou um peso molecular
5 dentre 200 e 2000.

Um outro aspecto da invenção fornece a composição farmacêutica da(s) enzima(s) da invenção compreendendo um sistema que consiste de tensoativo, co-tensoativo e fase lipofílica, o sistema tendo um valor HLB (Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico) maior do que ou igual a 10 e
10 um ponto de fusão maior do que ou igual a 30°C. Em uma forma de realização preferida o sistema tem um valor HLB de 10 a 16, preferivelmente de 12 a 15 e tem um ponto de fusão dentre 30 e 600°C, preferivelmente entre 40 e 500°C. Em particular, o sistema caracterizado pelo valor HLB e ponto de fusão é uma mistura de mono-, di- e triacilglicerídeos e mono- e diésteres de
15 polietileno glicol (PEG) com ácidos carboxílicos alifáticos com 8 a 20, preferivelmente de 8 a 18, átomos de carbono, por meio do qual o polietileno glicol preferivelmente tem de cerca de 6 a cerca de 32 unidades de óxido de etileno por molécula e o sistema opcionalmente contém glicerina livre e/ou polietileno glicol livre. O valor HLB de um tal sistema é preferivelmente
20 regulado pelo comprimento da cadeia do PEG. O ponto de fusão de um tal sistema é regulado pelo comprimento da cadeia dos ácidos graxos, o comprimento da cadeia do PEG e o grau de saturação das cadeias de ácido graxo e por este motivo o óleo de partida para a preparação da mistura de macrogolglicerídeo.

25 “Ácidos carboxílicos C8-C18 alifáticos” designa misturas em que o ácido caprílico (C8), ácido cáprico (C10), ácido láurico (C12), ácido mirístico (C14), ácido palmítico (C16) e ácido esteárico (C18) são contidos em uma proporção significativa e variável, se estes ácidos são saturados e os ácidos carboxílicos C8-C18 insaturados correspondentes. As proporções

destes ácidos graxos podem variar de acordo com os óleos de partida.

Uma tal mistura de mono-, di- e triacilglicerídeos e mono- e diésteres de polietileno glicol (PEG) com ácidos carboxílicos alifáticos com 8 a 18 átomos de carbono por exemplo podem ser obtidos por uma reação entre
5 um polietileno glicol com um peso molecular dentre 200 e 1500 e um óleo de partida, o óleo de partida consistindo de uma mistura de triglicerídeo com ácidos graxos que são selecionados do grupo contendo ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oléico e ácido linolênico, individualmente ou como uma mistura.
10 Opcionalmente, o produto de uma tal reação também pode conter pequenas proporções de glicerina e polietileno glicol livre.

Tais misturas são comercialmente disponíveis por exemplo sob o nome comercial Gelucire®. Uma forma de realização vantajosa da invenção fornece que, dos produtos conhecidos sob o nome comercial Gelucire®, em
15 particular “Gelucire® 50/13” e/ou “Gelucire® 44/14” representam misturas adequadas para o uso nas preparações farmacêuticas de acordo com a invenção.

Gelucire® 50/13 é uma mistura com mono-, di- e triacilglicerídeos e mono- e diésteres de polietileno glicol, com ácido
20 palmítico (C16) e ácido esteárico (C18) de 40% a 50% e de 48% a 58%, respectivamente perfazendo a proporção maior dos ácidos graxos ligados. A proporção de ácido caprílico (C8) e ácido cáprico (C10) é menor do que 3% em cada caso e a proporção de ácido láurico (C12) e ácido mirístico (C14) em cada caso é menor do que 5%.

25 Gelucire® 44/14 é uma mistura com mono-, di- e triacilglicerídeos e mono- e diésteres de polietileno glicol, as respectivas proporções de ácido palmítico (C16) sendo de 4 a 25%, ácido esteárico (C18) de 5 a 35%, ácido caprílico (C8) menor do que 15%, ácido cáprico (C10) menor do que 12%, ácido láurico (C12) de 30 a 50% e ácido mirístico (C14)

de 5 a 25%. Gelucire® 44/14, por exemplo, pode ser preparado por uma reação de alcoólise/esterificação usando óleo de dendê e polietileno glicol 1500.

Uma forma de realização preferida da presente invenção fornece uma composição farmacêutica da(s) enzima(s) da invenção que compreende(m) um sistema contendo uma mistura de mono-, di- e triacilglicerídeos e polietileno glicol mono- e diésteres de ácidos carboxílicos C8-C18 alifáticos e também possivelmente pequenas proporções de glicerina e polietileno glicol livre, o sistema tendo um ponto de fusão entre 40°C e 55°C e um valor HLB na faixa entre 12 e 15. Mais preferido, o sistema tem um ponto de fusão entre 44°C e 50°C e um valor HLB na faixa de 13 a 14. Alternativamente, o sistema tem um ponto de fusão em torno de 44°C e um valor HLB de 14 ou o sistema tem um ponto de fusão em torno de 50°C e um valor HLB de 13.

15 Métodos de Tratamento

A protease da invenção, opcionalmente em combinação com uma lipase e/ou uma amilase (a(s) enzima(s) da invenção), é útil no tratamento terapêutico e/ou profilático de várias doenças ou distúrbios em animais. O termo “animal” inclui todos os animais e em particular seres humanos. Os exemplos de animais são não ruminantes e ruminantes, tais como ovelha, cabra e gado, por exemplo gado de corte e vacas. Em uma forma de realização particular, o animal é um animal não ruminante. Os animais não ruminantes incluem animais mono-gástricos, por exemplo cavalo, porco (incluindo, mas não limitado a, porquinhos, porcos em crescimento e porcas); aves domésticas tais como perus, patos e galinhas (incluindo mas não limitado a frangos, poedeiras); bezerros jovens; animais de estimação tais como gato e cachorro; e peixe (incluindo mas não limitado a salmão, truta, tilápia, peixe gato e carpas; e crustáceos (incluindo mas não limitado a camarões e pitus). Em uma forma de realização particular o animal é um

mamífero, mais em particular um ser humano.

Por exemplo, a(s) enzima(s) são úteis no tratamento de distúrbios digestivos como má digestão ou dispepsia que são freqüentemente causadas por uma produção deficiente e/ou secreção no trato gastrintestinal de enzimas digestivas normalmente secretadas, *i.a.*, do estômago e do pâncreas.

Além disso, a(s) enzima(s) são particularmente úteis no tratamento de PEI. PEI pode ser verificado usando, *i.a.*, o teste de Borgstrom (JOP. J Pancreas (Online) 2002; 3(5): 116-125) e esta pode ser causada pelas doenças e condições tais como câncer pancreático, cirurgia pancreática e/ou gástrica, por exemplo ressecção total ou parcial do pâncreas, gastrectomia, cirurgia de desvio pós gastrintestinal (por exemplo gastroenterostomia de Billroth II); pancreatite crônica; Síndrome de Shwachman Diamond; obstrução dutal do pâncreas ou do duto biliar comum (por exemplo de neoplasmo); e/ou fibrose cística (uma doença herdada em que um muco espesso bloqueia os dutos do pâncreas). A(s) enzima(s) também pode(m) ser útil(eis) no tratamento de pancreatite aguda.

O efeito da(s) enzima(s) sobre os distúrbios digestivos pode ser medido como no geral descrito na EP 0600868, em que o Exemplo 2 descreve um teste de digestibilidade *in vitro* para medir o teste de estabilidade da lipase sob condições gástricas e o Exemplo 3 um teste de digestibilidade *in vitro* para a atividade da lipase na presença de sais biliares. Os testes correspondentes podem ser ajustados quanto a protease e amilase. Também a WO 02/060474 divulga testes adequados, por exemplo (1) um teste *in vitro* para medir a digestão lipídica em uma alimentação de teste de suíno e (2) um teste *in vivo* com suíno com pâncreas insuficiente em que a digestibilidade da gordura, proteína e amido é medida.

Em uma forma de realização particular, o efeito da protease da invenção é medido usando o teste de triagem *in vivo* quanto a eficácia da protease do Exemplo 3.

Como um outro exemplo, a(s) enzima(s) são útil(eis) no tratamento da diabetes melito tipo I e/ou tipo II, em particular para o tratamento adjuvante em uma terapia na diabetes de distúrbios digestivos que usualmente acompanham esta doença, com uma vista para diminuir complicações posteriores.

O efeito sobre a diabetes melito da(s) enzima(s) pode ser determinado por um ou mais dos métodos descritos na WO 00/54799, por exemplo controlando-se o nível de hemoglobina glicosilada, o nível da glicose do sangue, ataque hipoglicêmico, a situação de vitaminas solúveis em gordura como vitaminas A, D e E, a dosagem diária requerida de insulina, o índice de peso corporal e períodos hiper glicêmicos.

Em uma forma de realização particular, a protease da invenção não é para o uso como um agente de remoção de corpos estranhos e tecido morto de feridas e/ou não para o uso na cicatrização de ferimento.

A invenção aqui descrita e reivindicada não deve ser limitada no escopo pelas formas de realização específicas aqui divulgadas, visto que estas formas de realização são intencionadas como ilustrações de diversos aspectos da invenção. Quaisquer formas de realização equivalentes são intencionadas a estar dentro do escopo desta invenção. De fato, várias modificações da invenção além daquelas aqui mostradas e descritas tornar-se-ão evidentes àqueles habilitados na técnica da descrição precedente. Tais modificações também são intencionadas a cair dentro do escopo das reivindicações anexas. No caso de conflito, a presente divulgação incluindo as definições controlarão.

Várias referências são aqui citadas, as divulgações das quais são incorporadas por referência em suas totalidades.

Exemplos

Exemplo 1: Preparação de protease de *Bacillus licheniformis* purificada

Uma preparação pura da protease de *Bacillus licheniformis* dos

aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 1 foi preparada como segue:

Materiais e Métodos:

Caldo TY: triptona 20 g/l, extrato de levedura 5 g/l, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 7 mg/l, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 15 mg/l, pH 7,3.

5 Caldo PS-1: Sacarose 100 g, farinha de soja 40 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Merck 6579) 10 g, CaCO_3 5 g, Pluronic PE 6100 (BASF) 0,1 ml, água de torneira até 1000 ml.

Fermentação:

10 Uma cepa derivada de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 pela deleção do gene (SEQ ID NO: 3) que codifica uma outra protease, foi propagada durante a noite a 37°C em meio ágar TY (caldo TY solidificado com 2% de ágar) e inoculado em frascos agitados contendo 100 ml de caldo PS-1. Os frascos agitados foram incubados a 37°C por 90 horas com uma velocidade de agitação de 225 rpm.

15 Purificação:

o caldo de fermentação foi floculado e as células foram separadas do líquido contendo enzima pela centrifugação. A eletroforese em gel de SDS poliacrilamida do sobrenadante revelou uma faixa forte de um peso molecular relativo de aproximadamente 31 kDa que corresponde à
20 protease desejada. A presença de uma atividade de protease forte no sobrenadante também foi confirmada pela presença de zonas de depuração grandes em placas de ágar com 1% de leite desnatado, pH 7 e 9. Como uma etapa seguinte, o líquido da centrífuga foi filtrado para remover os sólidos em suspensão remanescentes e depois concentrados pela ultrafiltração usando
25 membranas apropriadas isto é, com um valor de corte abaixo do tamanho da protease. Finalmente o concentrado foi filtrado em germe.

100 ml do concentrado líquido filtrado em germe foi diluído 10x em 100 mM de H_3BO_3 , 10 mM de ácido succínico/NaOH, 2 mM de CaCl_2 , pH 7,0. O pH da solução de protease resultante foi 7,0. 120 ml destes

foram aplicados a uma coluna de 100 ml de bacitracin-agarose (UpFront Chromatography, catálogo nº 600-0100) equilibrada em 100 mM de H_3BO_3 , 10 mM de ácido succínico/NaOH, 2 mM de CaCl_2 , pH 7,0. Depois um lavagem completa da coluna com o tampão de equilíbrio, a coluna foi eluída

5 escalonadamente com 100 mM de H_3BO_3 , 10 mM de ácido succínico/NaOH, 2 mM de CaCl_2 , 1 M de NaCl, pH 7,0, 25% (v/v) de isopropanol. A etapa de Bacitracina-sílica foi repetida 7 vezes (8 vezes no total). Todos os eluídos foram combinados (420 ml) e os eluídos foram diluídos para 15 L com água desmineralizada. O pH da protease diluída foi ajustado ao pH 6,0 com 20% de

10 CH_3COOH e aplicado a uma coluna FF de SP-sefarose de 400 ml equilibrada em 50 mM de H_3BO_3 , 5 mM de ácido succínico/NaOH, 1 mM de CaCl_2 , pH 6,0. A coluna foi lavada cuidadosamente com o tampão de equilíbrio e a coluna foi eluída com um gradiente linear de NaCl (0 a 0,5 M) em 3 volumes de coluna. O pico da protease eluído (200 ml) foi transferido para 20 mM de

15 HEPES/NaOH, 100 mM de NaCl, 1 mM de CaCl_2 , pH 7,0 pela troca de tampão em uma coluna G25 sephadex de 1,4 L (HEPES é o ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico). A protease trocada em tampão (340 ml) foi filtrada em uma unidade de filtração de 0,22 μ (tal como Corning, catálogo nº 431097).

20 **Exemplo 2: Ensaio de Enzima**

Ensaio de Suc-AAPF-pNA de Protease

Substrato: Suc-AAPF-pNA (Sigma® S-7388).

Ensaio tampão: 100 mM de ácido succínico, 100 mM de HEPES (Sigma H-3375), 100 mM de CHES (Sigma C-2885), 100 mM de

25 CABS (Sigma C-5580), 1 mM de CaCl_2 , 150 mM de KCl, 0,01% de Triton® X-100 ajustado ao pH 9,0 com HCl ou NaOH.

Temperatura de Ensaio: 25°C.

300 μ l de amostra de protease diluída foram misturados com 1,5 ml do tampão de ensaio e a reação de atividade foi iniciada pela adição de

1,5 ml de substrato de pNA (50 mg dissolvidos em 1,0 ml de DMSO e ainda diluída 45x com 0,01% de Triton[®] X-100) e, depois de misturar, o aumento em A405 foi monitorado por um espectrofotômetro como uma medição da atividade de protease. As amostras de protease foram diluídas antes da
5 medição da atividade de modo a garantir que todas as medições de atividade caíam dentro da parte linear da curva de resposta de dose para o ensaio.

Ensaio FIP Protease

A atividade de protease também pode ser determinada usando um ensaio de FIP (Federation Internationale Pharmaceutique), 1 unidade FIP
10 = 1 unidade Ph. Eur. (European Pharmacopoeia). Este ensaio é descrito, junto com outros ensaios FIP na: Federation Internationale Pharmaceutique, Scientific Section: International Commission para a padronização de enzimas farmacêuticas. a) "Pharmaceutical Enzymes," Editores: R. Ruysen e A. Lauwers, E. Story Scientia, Ghent, Belgica (1978), b) European
15 Pharmacopoeia. Ver também Deemester *et al* in Lauwers A, Scharpó S (eds): Pharmaceutical Enzymes, Nova Iorque, Marcel Dekker, 1997, p. 343-385. Este ensaio foi usado para determinar a atividade de protease na pancreatina. Para determinar a atividade FIP de proteases microbianas, a etapa de ativação pela adição da enterocinase foi omitida.

20 Princípio: A caseína do substrato é hidrolisado pela protease no pH 7,5 e em uma temperatura de 35°C. A reação é interrompida pela adição de ácido tricloroacético e a caseína não degradada é separada por filtração. A quantidade de peptídeos que permanecem em solução é determinada pela espectrofotometria a 275 nm.

25 Definição da atividade: A atividade de protease é determinada como a quantidade de peptídeos não precipitado por uma solução a 5,0% (p/vol, isto é, 5,0 g/100 ml) de ácido tricloroacético, pela referência a um pó de referência do pâncreas (padrão de referência da protease) de conhecidos FIP atividade.

Materiais e métodos:

Solução de Caseína:

1,25 g de caseína (matéria seca), por exemplo Calbiochem nº 218680, é colocada em suspensão em água até que uma solução praticamente clara é obtida. O pH é ajustado a 8,0 e a solução é diluída com água a um volume final de 100 ml. Aqui e a seguir, água significa água desionizada.

Tampão de Borato pH 7,5:

2,5 g de cloreto de sódio, 2,85 g tetraborato de dissódio e 10,5 g de ácido bórico são dissolvidos em 900 ml de água, o pH é ajustado ao pH 7,5 +/- 0,1 e diluído a 1000 ml com água.

Papel de Filtro:

Filtros dobrados com um diâmetro de 125 mm, por exemplo Schleicher & Schuell nº 1574½. O teste de papel de filtro: Filtro de 5 ml de 5,0% de ácido tricloroacético através do filtro. A absorção a 275 nm do filtrado deve ser menor do que 0,04, usando solução de ácido tricloroacético não filtrado como um branco.

Padrão de referência de protease:

A protease (pâncreas) comercialmente disponível da International Commission on Pharmaceutical Enzymes, Centre for Standards, Harelbekestraat 72, B-9000 Ghent, Bélgica. O padrão tem uma atividade rotulada (A) em FIP/unidades Ph. Eur./g. Pesar acuradamente uma quantidade que corresponda a aprox. 130 unidades de protease-FIP/Ph.Eur.. Adicionar uma ponta de espátula de areia do mar, umidificada com umas poucas gotas de cloreto de cálcio 0,02 M (pH 6,0 a 6,2) e triturado o todo com uma vareta de vidro de extremidade plana. Diluir com aprox. 90 ml da mesma solução de cloreto de cálcio gelado e agitar a suspensão por 15 a 30 minutos em um banho de gelo. O pH é ajustado a 6,1 e o volume é ajustado a 100 ml com a mesma solução de cloreto de cálcio. 5,0 ml desta suspensão é diluída com tampão de borato pH 7,5 a 100 ml. Para o teste de atividade, 1,0, 2,0 e 3,0 ml

desta solução são usados como referência (no que segue designados S1, S2 e S3, S para Padrão).

Suspensão de Teste:

- Preparar uma suspensão da amostra como descrito acima para
- 5 o padrão de referência de protease, usando uma quantidade equivalente de amostra a aprox. 260 unidades FIP/Ph.Eur.. O pH é ajustado a 6,1 e água é adicionada a 100 ml. 5,0 ml desta solução é misturada com 5 ml de solução de cloreto de cálcio. 5 ml desta diluição é ainda diluído a 100 ml com tampão de borato. Usar 2,0 ml desta solução para o ensaio (no que segue a amostra é
- 10 designada Un, amostra de atividade desconhecida, número n).

Procedimento de Ensaio (teste de atividade):

- O ensaio é realizado para as três suspensões de referência (S1, S2, S3) e para a suspensão de amostra (Un), Todas em triplicata. Um branco por amostra é suficiente (designada S1b, S2b, S3b e Unb, respectivamente).
- 15 Um cego (B) é preparado sem amostra/padrão como compensação líquida para o espectrofotômetro. O tampão de borato é adicionado aos tubos como segue: Cego (B) 3,0 ml; amostra (Un) 1,0 ml; padrões (S1, S2 e S3) 2,0, 1,0 e 0 ml, respectivamente. O padrão de referência de protease é adicionado a S1, S2 e S3 como segue: 1,0, 2,0 e 3,0 ml, respectivamente. A suspensão de teste
- 20 é adicionada aos tubos de amostra como segue (Un): 2,0 ml. 5 ml de ácido tricloroacético são adicionados a todos os cegos (S1b, S2b, S3b, Unb e B) seguido pela mistura imediata. Todos os tubos são tampados com uma tampa de vidro e colocados juntos com a solução de substrato em um banho de água em temperatura constante ($35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$). Quando o equilíbrio de temperatura
- 25 é atingido, no tempo zero, 2,0 ml de solução de caseína é adicionado aos tubos S1, S2, S3 e Un, seguido pela mistura imediata. Exatamente 30 minutos depois, 5,0 ml de ácido tricloroacético são adicionados a cada um dos tubos S1, S2, S3 e Un, seguido pela mistura imediata. Os tubos são retirados do banho de água e deixado repousar na temperatura ambiente por 20 minutos

para completar a precipitação das proteínas. O conteúdo de cada tubo é filtrado duas vezes através do mesmo filtro e a absorção dos filtrados é medida a 275 nm usando o filtrado do tubo B como líquido de compensação. A atividade da amostra (U_n) em unidades FIP é calculada em relação à atividade rotulada conhecida (A) dos padrões (S_1 , S_2 , S_3). Os valores de absorção menos os respectivos cegos (por exemplo a absorção de S_1 menos a absorção de S_1 b) deve residir no intervalo de 0,15 a 0,60.

Ensaio de AU Protease

Hemoglobulina desnaturada (0,65% (p/p) em tampão de 6,7 mM de $KH_2PO_4/NaOH$ contendo uréia, pH 7,50) é degradada a 25°C por 10 minutos pela protease e a hemoglobina não degradada é precipitada com ácido tricloroacético (TCA) e removida pela filtração. Os produtos da degradação da hemoglobulina solúveis em TCA no filtrado são determinados com reagente de fenol de Folin & Ciocalteu (1 volume de Reagente de Fenol de Folin-Ciocalteu Merck 9001.0500 para 2 volumes de água desmineralizada), que dá uma cor azul com diversos aminoácidos (sendo medido a 750 nm). A unidade de atividade (AU) é medida e definida pela referência a um padrão. O substrato de hemoglobina desnaturado pode ser preparado como segue: 1154 g de uréia (Harnstoff, Merck 8487) é dissolvido em 1000 ml de água desmineralizada, 240,3 g de NaOH são adicionados e depois, lentamente, 63,45 g de hemoglobina (Merck 4300) são adicionados, seguido por 315,6 g de KH_2PO_4 e água desmineralizada até 3260 g. O pH é ajustado a 7,63. Mais detalhes e um padrão de Alcalase adequado estão disponíveis sob solicitação da Novozymes A/S, Krogshoejvej 36, DK-2880 Bagsvaerd, Dinamarca (ensaio nº EB-SM-0349.01).

Ensaio pNP de Lipase

Substrato: Valerato de para-Nitro-Fenila (pNP)

Ensaio pH: 7,7

Temperatura do ensaio: 40°C

Tempo de reação: 25 min

O produto digerido com cor amarela tem uma absorbância característica a 405 nm. A sua quantidade é determinada pela espectrofotometria. Uma unidade de lipase é a quantidade de enzima que libera 1 micromol de ácido butírico titulável por minuto sob as condições de ensaio dadas. Uma descrição de ensaio mais detalhada, AF95/6-GB, está disponível sob solicitação da Novozymes A/S, Krogshoejvej 36, DK-2880 Bagsvaerd, Dinamarca.

Ensaio LU de Lipase

Neste ensaio, a degradação catalisada pela lipase de 0,16 M de tributirin (tributirato de glicerol, Merck 1.01958,000) no pH 7,00 e 30°C (+/- 1°C) é seguida pela titulação estacionária do pH do ácido butírico liberado com 0,025 M de hidróxido de sódio desgaseificado, isento de CO₂ (Hidróxido de sódio titrisol, Merck 9956). O consumo do titulante é registrado como uma função do tempo.

O substrato é emulsificado com um emulsificador de goma arábica a 0,6% p/v (20,0 g de Goma Arábica, 89,5 g de NaCl, 2,05 g de KH₂PO₄, adicionar água até 1,5 L, deixar até completamente dissolvido, adicionar 2700 ml de glicerol, ajustar o pH para 4,5. 90 ml de tributirin são misturados com 300 ml de emulsificador de goma arábica e 1410 ml de água desmineralizada e homogeneizados por 3 minutos usando por exemplo um emulsificador de Silverson L4RT a 7000 rpm e depois ajustado ao pH 4,75). As amostras de Lipase são diluídas primeiro em tampão de glicina a 0,1 M pH 10,8, em seguida em água desmineralizada, com objetivo de um nível de atividade de 1,5 a 4,0 LU/ml. 15 ml da solução de substrato emulsificado são vertidos no vaso de titulação. 1,0 ml de solução de amostra é adicionado e o pH é mantido a 7,0 durante a titulação. A quantidade de titulante adicionada por minuto para manter um pH constante é medida. O cálculo da atividade está fundamentado na inclinação média da faixa linear da curva de titulação.

Um padrão de atividade conhecida pode ser usado como uma checagem de nível.

1 LU (unidade de lipase) é a quantidade de enzima que libera 1 micro mol de ácido butírico titulável por minuto sob as condições de ensaio dadas acima. 1 kLU (quilo Unidade de lipase) = 1000 LU.

Uma descrição do ensaio mais detalhada, EB-SM-0095,02, está disponível sob solicitação da Novozymes A/S, Krogshoejvej 36, DK-2880 Bagsvaerd, Dinamarca.

Ensaio em pH estacionário de Lipase

Este ensaio está fundamentado na liberação catalisada pela lipase de ácidos graxos de uma emulsão de óleo de oliva na presença de 0,65 mM de sais biliares. O Substrato é emulsificado com goma arábica como emulsificador (175 g de óleo de oliva emulsificado com 630 ml de solução de goma arábica (474,6 g de goma arábica, 64 g de cloreto de cálcio em 4000 ml de água) por 15 min em um misturador; depois de esfriar até a temperatura ambiente, o pH é ajustado ao pH 6.8 a 7,0 usando NaOH 4 M).

Para a determinação, 19 ml da emulsão e 10 ml de solução de sais biliares (492 mg de sais biliares são dissolvidos em água e enchidos até 500 ml) são misturados no vaso de reação e aquecidos de 36,9°C a 37,5°C. A reação é iniciada pela adição de 1,0 ml de solução de enzima. O ácido liberado é titulado automaticamente no pH 7,0 pela adição de hidróxido de sódio 0,1 M para um total de 5 min. A atividade é calculada a partir da inclinação da curva de titulação entre o 1° e o 5° minutos. Para a calibração, um padrão é medido em três níveis diferentes de atividade.

25 Amilase

Substrato: Tabletes Phadebas (Pharmacia Diagnostics; polímero de amido reticulado, insolúvel, de cor azul, que são misturados com albumina sérica bovina e uma substância tampão e fabricado em tabletes)

Temperatura do ensaio: 37°C

Ensaio pH: 4,3 (ou 7,0, se desejado)

Tempo de reação: 20 min

Depois da suspensão em água o amido é hidrolisado pela alfa-amilase, dando fragmentos azuis solúveis. A absorbância da solução azul resultante, medido a 620 nm, é uma função da atividade de alfa-amilase. Uma Unidade de alfa-Amilase Fúngica (1 FAU) é a quantidade de enzima que decompõem 5,26 g de amido (Merck, Amilum solubile Erg. B. 6, Lote 9947275) por hora nas condições de ensaio padrão. Uma descrição do ensaio mais detalhada, APTSMYQI-3207, está disponível sob solicitação da Novozymes A/S, Krogshoejvej 36, DK-2880 Bagsvaerd, Dinamarca.

Exemplo 3: Teste de tiragem *in vivo* da protease de *Bacillus licheniformis*

A protease de *Bacillus licheniformis* purificado do Exemplo 1 foi testado em miniporcoss Gottingen fêmeas (Ellegaard) com pancreatina como um sinal de medida. A insuficiência exócrina pancreática (PEI) foi induzida nos miniporcoss pela ligação do duto pancreático e eles também foram adaptados com uma cânula reentrante íleo-cecal, todos sob anestesia com halotano e em um peso de cerca de 25 kg, como descrito em Tabeling *et al.*, J. 1999, Studies on nutrient digestibilities (pre-caecal and total) in pancreatic duct-ligated pigs and the effects of enzyme substitution, J. Anim. Physiol. A. Anim. Nutr. 82: 251-263 (daqui em diante aludida como “Tabeling 1999”); e em Gregory *et al.*, J. 1999. Growth and digestion in pancreatic duct ligated pigs, Effect of enzyme supplementation in “Biology of the Pancreas in Growing Animals” (SG Pierzynowski & R. Zabielski eds), Elsevier Science BV, Amsterdam, pp 381-393 (daqui em diante aludida como “Gregory *et al* 1999”). Um período de pelo menos 4 semanas foi deixado para a recuperação da cirurgia, antes que os estudos fossem começados. Antes que o estudo começasse, a situação da PEI de cada porco foi confirmada por intermédio do teste de quimiotripsina das fezes (comercialmente disponível da Immundiagnostik AG, Wiesenstrasse 4, D-64625 Bensheim, Alemanha,

com catálogo N° K 6990).

5 Durante os estudos, os porcos foram alojados em gaiolas de metabolismo modificadas em um ciclo de luz-escuro de 12:12 horas e deixado livre acesso a água e alimentados duas refeições/dia. Para avaliar a eficácia da
10 protease, os porcos foram alimentados com uma refeição de teste de 250 g misturados com 1 litro de água, 0,625 g de Cr_2O_3 (marcador de óxido crômico) e nas quantidades diferentes de protease (0, 1000, 2500, 6000 FIP U protease/refeição (unidades FIP da protease, ver o Exemplo 2)) foram misturados imediatamente antes da alimentação. A refeição de teste conteve
15 21,4% de proteína, 51,9% de amido, 2,6% de gordura e teve a seguinte composição (g/100 g de matéria seca): Farinha de peixe 3,5, farinha de carne de aves 10,2, farinha de trigo 29,5, arroz descascado 14, amido de batata 11, amido de milho 14, caseína 5,9, pó de celulose 4,3, vitaminas, minerais e elementos traço 7,6 (como para a exigência nutricional para porcos, ver por exemplo a Tabela A da WO 01/58276).

O quimo curado foi coletado em gelo por um total de 8 horas depois do primeiro aparecimento do marcador de refeição no íleo (quimo verde) e armazenado a -20°C antes da análise. Pelo menos um dia de lavagem foi deixado entre as determinações separadas.

20 Em resumo, as amostras congeladas foram secadas por congelamento e analisadas quanto a matéria seca (DM) e proteína bruta. A DM foi estimada pelo peso depois da secagem por congelamento seguido pela incubação de 8 horas a 103°C . A proteína bruta foi calculada como nitrogênio (N) multiplicado por um fator de 6,25, isto é, Proteína bruta (g/kg) = N (g/kg)
25 x 6,25 como estabelecido em Animal Nutrition, 4ª edição, Capítulo 13 (Eds. P. McDonald, R. A. Edwards e J. F. D. Greenhalgh, Longman Scientific e Technical, 1988, ISBN 0-582-40903-9). O teor de nitrogênio foi determinado pelo método de Kjeldahl (Naumann e Bassler, 1993, Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. 3ª edição VDLUFA-Verlag, Darmstadt,

Alemanha (VDLUFA = Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- and Forschungsanstalten).

O cálculo da digestibilidade da proteína pré-cecal aparente foi feita de acordo com a fórmula:

$$\text{Digestibilidade aparente (\%)} = 100 - \frac{[\% \text{ de } Cr_2O_3 \text{ em a lim entação} \cdot \frac{\% \text{ de proteína na amostra}}{\% \text{ de proteína na a lim ent.}}] \cdot 100}{\% \text{ de } Cr_2O_3 \text{ na amostra}}$$

5 em que Cr_2O_3 e a proteína foram expressados como g/100 g de matéria seca. A quantidade de Cr_2O_3 pode ser determinada pelos métodos conhecidos na técnica, preferivelmente pela oxidação para cromato e a medição da extinção a 365 nm, como descrito por Petry e Rapp em Zeitung kw Tierphysiologie (1970), vol. 27, p. 181-189. Os resultados deste estudo são representados na

10 Tabela 1.

Tabela 1: Influência da suplementação de enzima na digestibilidade de proteína aparente

Suplemento de Enzima	0	1000 U FIP	2500 U FIP	6000 U FIP
Nenhum suplemento	14,7 +/- 2,1			
Pancreatina		31,7 +/- 12,4	59,4 +/- 4,9	70,7 +/- 0,9
Protease de <i>Bacillus licheniformis</i>		39,1 +/- 8,6	58,5 +/- 11,3	65,5 +/- 1,1

Os valores são média $\pm$ SD

A partir dos resultados na Tabela 1 é evidente que a protease da SEQ ID NO: 2 de acordo com a invenção atua com a mesma atividade como as preparações de pancreatina conhecidas. A protease da invenção causou uma melhora forte e dependente da dose sobre a digestibilidade da proteína, já mostrando uma melhora altamente eficiente na dosagem mais baixa testada.

20 **Exemplo 4: Teste *in vitro* de proteases**

Várias proteases foram testadas *in vitro* quanto a capacidade do ar para degradar a proteína sob condições que simulam a digestão.

Proteases

As seguintes subtilisina proteases da invenção foram testadas:

25 A protease de *Bacillus licheniformis* dos aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID

NO: 1; a protease de *Bacillus amiloliquefaciens* dos aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 10 e a protease da variante 99aE do *Bacillus lentus* dos aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 11 (um E (Glu) sendo inserido depois do resíduo de aminoácido nº 99, S (Ser), nos aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 11). Estas proteases todas têm uma identidade percentual com os aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 1 acima de 50%.

Para comparação, algumas subtilisina proteases fora da invenção também foram incluídas, a saber de *Bacillus halmapalus* NCIB 12513 (descrita na WO 88/01293 e também na WO 98/012005 (SEQ ID NO: 42, *Bacillus* sp. JP170)) e de *Bacillus* sp. NCIMB 40339 (descrita na WO 92/017577 como *Bacillus* sp. TY145). Estas proteases todas têm uma identidade percentual com os aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 1 abaixo de 50%. Além disso, a protease que não de subtilisina de *Nocardiosis* descrita na WO 2005/115445 (aminoácidos de 1 a 188 da SEQ ID NO: 1 nesta) foi incluída para comparação. Esta protease também tem identidade abaixo de 50% com os aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 1. Finalmente, a pancreatina foi incluída como um controle positivo.

As proteases foram todas dosadas de modo idêntico em uma base em proteína de enzima, a saber 72, 36, 18 e 9 mg de Proteína de Enzima (EP) por refeição de 250 g. A quantidade de proteína de enzima da protease foi calculada com base nos valores A280 e a seqüência de aminoácidos (composições de aminoácido) usando os princípios esboçados em S. C. Gill & P. H. von Hippel, Analytical Biochemistry 182, 319-326, (1989).

Materiais e Métodos

Sais biliares (isto é, taurocolato de sódio BRP, lote 2, da Ph. Eur ou FIP, também comercialmente disponível por exemplo da LGC promochem, 500 g/mol), Pepsina (Merck, VL 317492 437 (1.07192)), Pancreatina (da Solvay Pharmaceuticals). Dieta de Protease: 51,9% de amido, 21,3% de proteína e 2,6% de gorduras/lipídeos.

Modelo *In Vitro*

A dieta de protease foi dissolvida em HCl 0,1 M a uma concentração de 0,2 g de dieta/ml. O pH foi ajustado para atingir o pH 3,0 (simulando condições gástricas). 100 µl de pasta fluida de dieta, 20 µl de pepsina (concentração final de 70 mg/L em água desmineralizada (Milli-Q) e 30 µl de protease (ou Milli-Q no controle sem enzima) foram adicionados a cada reservatório em uma placa de microtítulo (MTP). Estes foram incubados por 1 hora a 37°C, 700 rpm. No final de 1 hora de incubação, o pH foi medido a 3,4. Para elevar o pH a 6,0 (simulando as condições intestinais), 25 µl de um tampão de pH 5/9 misto (0,8 M de MES, 0,8 M de imidazol, 0,8 M de Na-acetato, pH 5,0 ou pH 9,0; 40% de tampão pH 5 e 60% de tampão pH 9) foram adicionados a cada reservatório. Adicionalmente, 25 µl de sais biliares (concentração final de 5 mM) foram adicionados e estes foram incubados 2 horas a 37°C, 700 rpm. Depois da incubação *in vitro*, as MTP's foram centrifugadas a 2700 rpm (1500g), 4°C por 10 min e os sobrenadantes foram coletados para outras investigações.

Determinação de grupos amino livre (OPA)

Os sobrenadantes das digestões *in vitro* foram analisadas pela determinação dos grupos amino livres pela reação com OPA (O-ftaldialdeído). O procedimento da determinação OPA foi como segue; 20 µl de sobrenadante diluído *in vitro* foi transferido para nova MTP e adicionados 200 µl de reagente OPA (80 mg de OPA são dissolvidos em 2 ml de etanol a 96%; 3,81 g de tetraborato de di-sódio decaidratado, 1 ml de SDS a 10%, 88 mg de DTT e a solução de OPA-etanol é feita até 100 ml com água Milli-Q). A absorbância foi medida a 340 nm. Uma série de padrão de serina (0,5 mg/ml a 0,0078 mg/ml) foi incluída nas determinações.

A Tabela 2 abaixo mostra os resultados como mM de grupos amino hidrolisados. Os resultados são valores médios de determinações em duplicata e o desvio padrão (s.d.) também é indicado. Apenas os resultados

com 72 mg de proteína de enzima por refeição são mostrados, visto que neste teste os resultados com as dosagens de enzima mais baixas não permitem a discriminação apropriada entre as enzimas.

Tabela 2

Protease testada	SEQ 1	SEQ 10	JP170	TY145	<i>Nocardiosis</i>	Pancreatina
Grupos amino Hidrolisados (mM)	7,4	4,9	0,81	0,38	9,1	2,5
S.d.	0,6	2,4	0,11	0,37	1,7	1,6
% de identidade com a SEQ 1	100	70	35	47	18	-

5 Os resultados da Tabela 2 mostram que as proteases da invenção (SEQ 1, SEQ 10) executam muito bem neste modelo *in vitro*. Este não é o caso para as proteases JP170 e TY145 que não são parte da presente invenção. De fato, desconsiderando a *Nocardiosis* protease que é um tipo muito diferente de protease e não incluída na presente invenção, parece haver
10 uma correlação entre as identidades percentuais com a SEQ ID NO: 1 da invenção e o desempenho neste modelo (quanto mais alta a % de identidade, melhor o desempenho).

Em um experimento separado, realizado como descrito acima, nós testamos o desempenho *in vitro* da variante de protease de *Bacillus lentus*
15 da invenção (variante da SEQ 11), incluindo também aqui para comparação a protease de *Nocardiosis*. Os resultados de dose-resposta são mostrados na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3

Grupos amino hidrolisados (mM)	Protease testada		S,d,	
	<i>Nocardiosis</i>	Variante SEQ 11	<i>Nocardiosis</i>	Variante SEQ 11
Dosagem de Enzima (mg de EP/refeição)				
72	6,9	3,8	0,0	0,2
36	5,3	3,2	0,8	0,4
18	4,0	2,3	0,3	0,3
9	2,8	1,8	0,4	0,5
% de identidade to SEQ 1	18	61	-	-

20 Primeiramente, estes resultados mostram uma boa relação de dose-resposta. Em segundo lugar, deve ser mencionado que também a protease da invenção (variante SEQ 11) executa muito bem, em particular na

dosagem de 72 mg de EP/refeição. A variante SEQ 11 parece ainda ajustar-se bem na correlação entre identidade percentual para a SEQ ID NO: 1 e o desempenho aludido acima (em relação à *Nocardiosis* protease, que foi incluída em ambos os experimentos).

5 Exemplo 5: Composições de protease farmacêutica

(A) Pelotas de Alta Concentração

Um concentrado líquido filtrado contra germes da protease dos aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 1 foi preparado como descrito no Exemplo 1 e secado por pulverização. O teor de proteína de protease medido do pó de protease secado por pulverização foi de 58,5%. 1125 g de protease seca por pulverização na forma de pó foi pré-misturada seca junto com celulose microcristalina (450 g) e polietileno glicol 4000 (Macrogol® 4000; 675 g) em um misturador comercialmente disponível. Álcool isopropílico (460 g; 100%) foi adicionado e a massa úmida resultante foi continuada ser cuidadosamente misturada na temperatura ambiente. A massa homogeneizada foi depois extrudada em uma extrusora comercialmente disponível que foi adaptada com uma matriz perfurada tendo um diâmetro de furo de 0.8 mm para formar pelotas cilíndricas. A temperatura do cabeçote não excedeu 50°C durante a extrusão. O extrudado produzido foi de pelotas arredondadas a esféricas com um esferonizador comercialmente disponível pela adição da quantidade necessária de álcool isopropílico 100% (54,5 g). As pelotas foram secadas em uma temperatura de produto de aproximadamente 40°C em um secador a vácuo comercialmente disponível (da Voetsch). A temperatura do produto não excedeu 45°C. As pelotas secas foram depois separadas usando-se uma máquina de peneiramento mecânico com peneiras de 0,7 e 1,4 mm. As frações de peneira de 0,7 mm e de 1,4 mm foram coletadas e enchidas em porções de 200 mg de pelotas cada uma em cápsulas de tamanho 2. A concentração da protease das pelotas secas resultantes foi de aproximadamente 29,3% (p/p).

(B) Pelotas de Concentração mais Baixa

Similar ao exemplo (A) fornecido acima, as pelotas com um teor mais baixo de protease como substância medicamentosa foram produzidas com um tamanho de lote de 2250 g usando 562,5 g de protease secada por pulverização na forma de pó (com um teor de proteína de protease medido de 58,5%), celulose microcristalina (1125 g), polietileno glicol 4000 (562,5 g), álcool isopropílico para umedecimento (700 g) e álcool isopropílico para arredondamento (61,2 g). A concentração da protease das pelotas secas resultantes foi de aproximadamente 14,6% (p/p).

As pelotas resultantes dos exemplos (A) e (B) foram testadas quanto a atividade proteolítica pela aplicação dos método FIP às proteases a partir de pó de pâncreas com a modificação de que a etapa de ativação foi omitida. Nenhuma perda na atividade proteolítica foi encontrada nas pelotas em cada caso em relação ao material de protease em pó de partida.

As pelotas resultantes dos exemplos (A) e (B) foram depois testadas quanto a desintegração de acordo com a Pharm. Eur. 2.9.1. (Seção "Disintegration of tablets and capsules") (solução de teste: água - 500 ml, 37°C).

A desintegração das pelotas do exemplo (A) foi completada dentro de 3 min. A desintegração das pelotas do exemplo (B) foi completada dentro de 11 min.

Exemplo 6: Composições farmacêuticas de protease e amilase

As pelotas de concentração alta contendo amilase e protease foram preparadas como segue:

Um concentrado líquido foi preparado como descrito na DK 2005 00931 (um ultrafiltrado filtrado contra germes) da amilase tendo os aminoácidos de 1 a 486 da SEQ ID NO: 16. O concentrado líquido foi secado por pulverização. O teor de proteína de amilase medido do pó de amilase secado por pulverização foi de 37%. A amilase secada por pulverização na

forma de pó (398,5 g) foi pré-misturada seca junto com pó de protease secado por pulverização preparado como descrito no Exemplo 5 (746,5 g; tendo um teor de proteína de protease medido de 58,5%), celulose microcristalina (458 g) e polietileno glicol 4000 (Macrogol[®] 4000; 687 g) em um misturador comercialmente disponível. Álcool isopropílico 100% (460 g) foi adicionado e a massa úmida resultante foi continuada até estar completamente misturada na temperatura ambiente. A massa homogeneizada foi depois extrudada em uma extrusora comercialmente disponível que foi adaptada com uma matriz perfurada tendo um diâmetro de furo de 0,8 mm para formar pelotas cilíndricas. A temperatura do cabeçote não excedeu 50°C durante a extrusão. O extrudado produzido foi de pelotas arredondadas a esféricas com um esferonizador comercialmente disponível pela adição da quantidade necessária de álcool isopropílico 100% (58 g). As pelotas foram secadas usando uma temperatura de abastecimento de aproximadamente 40°C em um secador a vácuo comercialmente disponível (da Voetsch). A temperatura do produto não excedeu 45°C. As pelotas secadas foram depois separadas usando-se uma máquina de peneiramento mecânico com peneiras de 0,7 e 1,4 mm. As frações de peneira de 0,7 mm e 1,4 mm foram coletadas e podem ser enchidas em porções de 200 mg cada uma em cápsulas de tamanho 2. A concentração de protease das pelotas secas resultantes foi de aproximadamente 19,1% (p/p) e a concentração de amilase das pelotas secas resultantes foi de aproximadamente 6,4% (p/p).

As pelotas resultantes foram testadas quanto às atividades proteolíticas e amilolíticas de acordo com os métodos como esboçado acima. Nenhuma perda na atividade proteolítica ou amilolítica foi encontrada nas pelotas em cada caso em relação aos materiais de protease ou amilase em pó de partida, respectivamente.

Exemplo 7: Estabilidade e eficácia *in vivo* de lipase na presença de protease

A estabilidade e eficácia de uma variante de lipase de *Humicola lanuginosa* da SEQ ID NO: 15 na presença de uma protease da invenção (a protease tendo os aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 1) foram testados como segue:

5 A lipase purificada foi testada em um teste *in vivo* como no geral descrito no Exemplo 2 do pedido PCT que reivindica prioridade do pedido DK nº 2005 00929, exceto que a dosagem foi de acordo com as unidades de lipase estimadas no ensaio de FIP pancreático também descrito nesta referência. Os valores de digestibilidade (coeficiente de absorção de
10 gordura; CFA) foram estimados como também descrito no pedido de patente aludido.

A lipase foi testada sozinha e em combinação com a protease, em várias combinações de dosagem. A atividade de protease foi determinada usando-se o ensaio de FIP pancreático (ver referência no Exemplo 1).

15 Os resultados são mostrados na Tabela 4 abaixo, dado como valores de CFA médio (%) e com indicação do desvio padrão (sd).

Tabela 4

Tratamento	Dosagem de Lipase (Unidades de FIP Pancreático por refeição)	Dosagem de Protease (Unidades de FIP Pancreático por refeição)	CFA (%)	sd
PEI não tratada (Controle)	0	0	21,7	4,5
Lipase sozinha	107200	0	59,2	4,7
Lipase + Protease	107200	1200	55,6	6,7
Lipase + Protease	107200	2400	58,7	5,1
Lipase sozinha	780892	0	75,6	4,7
Lipase + Protease	780892	9000	81,4	4,0
Lipase + Protease	780892	18000	76,0	3,2

20 Para cada uma das duas dosagens de lipase aqui testadas não houve nenhuma diferença significativa entre os resultados sem e com protease, nas duas dosagens diferentes. Portanto pode ser concluído que a protease não teve nenhum efeito adverso sobre a lipase *in vivo*.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

```

<110> Novozymes A/S
      Solvay Pharmaceuticals GmbH
<120> Proteases para uso farmacêutico
<130> 10794.204-WO
<160> 18
<170> PatentIn versão 3.3
<210> 1
<211> 1140
<212> DNA
<213> Bacillus licheniformis
<220>
<221> sig_peptideo
<222> (1)..(87)
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1137)
<220>
<221> misc_estrutura
<222> (88)..(315)
<223> Proregion
<220>
<221> mat_peptideo
<222> (316)..(1134)
<400> 1
atg  atg agg aaa aag agt  ttt tgg ctt ggg atg ctg acg gcc ttc atg      48
Met  Met Arg Lys Lys Ser   Phe Trp Leu Gly Met Leu Thr Ala Phe Met
-105                -100                -95                -90

ctc gtg ttc acg atg gca ttc agc gat tcc gct tct gct gct caa ccg      96
Leu Val Phe Thr Met Ala Phe Ser Asp Ser Ala Ser Ala Ala Gln Pro
                -85                -80                -75

gcg aaa aat gtt gaa aag gat tat att gtc gga ttt aag tca gga gtg      144
Ala Lys Asn Val Glu Lys Asp Tyr Ile Val Gly Phe Lys Ser Gly Val
                -70                -65                -60

aaa acc gca tct gtc aaa aag gac atc atc aaa gag agc ggc gga aaa      192
Lys Thr Ala Ser Val Lys Lys Asp Ile Ile Lys Glu Ser Gly Gly Lys
                -55                -50                -45

gtg gac aag cag ttt aga atc atc aac gcg gca aaa gcg aag cta gac      240
Val Asp Lys Gln Phe Arg Ile Ile Asn Ala Ala Lys Ala Lys Leu Asp
                -40                -35                -30

aaa gaa gcg ctt aag gaa gtc aaa aat gat ccg gat gtc gct tat gtg      288
Lys Glu Ala Leu Lys Glu Val Lys Asn Asp Pro Asp Val Ala Tyr Val
-25                -20                -15                -10

gaa gag gat cat gtg gcc cat gcc ttg gcg caa acc gtt cct tac ggc      336
Glu Glu Asp His Val Ala His Ala Leu Ala Gln Thr Val Pro Tyr Gly
                -5                -1  1                5

att cct ctc att aaa gcg gac aaa gtg cag gct caa ggc ttt aag gga      384
Ile Pro Leu Ile Lys Ala Asp Lys Val Gln Ala Gln Gly Phe Lys Gly
                10                15                20

gcg aat gta aaa gta gcc gtc ctg gat aca gga atc caa gct tct cat      432
Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp Thr Gly Ile Gln Ala Ser His
                25                30                35

ccg gac ttg aac gta gtc ggc gga gca agc ttt gtg gct ggc gaa gct      480
Pro Asp Leu Asn Val Val Gly Gly Ala Ser Phe Val Ala Gly Glu Ala
40                45                50                55

tat aac acc gac ggc aac gga cac ggc aca cat gtt gcc ggt aca gta      528
Tyr Asn Thr Asp Gly Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val
                60                65                70

gct gcg ctt gac aat aca acg ggt gta tta ggc gtt gcg cca agc gta      576
Ala Ala Leu Asp Asn Thr Thr Gly Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Val
                75                80                85

```

```

tcc ttg tac gcg gtt aaa gta ctg aat tca agc gga agc gga tca tac      624
Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Asn Ser Ser Gly Ser Gly Ser Tyr
          90                      95                      100
agc ggc att gta agc gga atc gag tgg gcg aca aca aac ggc atg gat      672
Ser Gly Ile Val Ser Gly Ile Glu Trp Ala Thr Thr Asn Gly Met Asp
          105                      110                      115
gtt atc aat atg agc ctt ggg gga gca tca ggc tcg aca gcg atg aaa      720
Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Ala Ser Gly Ser Thr Ala Met Lys
          120                      125                      130                      135
cag gca gtc gac aat gca tat gca aga ggg gtt gtc gtt gta gct gca      768
Gln Ala Val Asp Asn Ala Tyr Ala Arg Gly Val Val Val Val Ala Ala
          140                      145                      150
gca ggg aac agc gga tct tca gga aac acg aat aca att ggc tat cct      816
Ala Gly Asn Ser Gly Ser Ser Gly Asn Thr Asn Thr Ile Gly Tyr Pro
          155                      160                      165
gcg aaa tac gat tct gtc atc gct gtt ggt gcg gta gac tct aac agc      864
Ala Lys Tyr Asp Ser Val Ile Ala Val Gly Ala Val Asp Ser Asn Ser
          170                      175                      180
aac aga gct tca ttt tcc agc gtc gga gca gag ctt gaa gtc atg gct      912
Asn Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly Ala Glu Leu Glu Val Met Ala
          185                      190                      195
cct ggc gca ggc gtg tac agc act tac cca acg aac act tat gca aca      960
Pro Gly Ala Gly Val Tyr Ser Thr Tyr Pro Thr Asn Thr Tyr Ala Thr
          200                      205                      210                      215
ttg aac gga acg tca atg gct tct cct cat gta gcg gga gca gca gct      1008
Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala
          220                      225                      230
ttg atc ttg tca aaa cat ccg aac ctt tca gct tca caa gtc cgc aac      1056
Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Leu Ser Ala Ser Gln Val Arg Asn
          235                      240                      245
cgt ctc tcc agc acg gcg act tat ttg gga agc tcc ttc tac tat ggg      1104
Arg Leu Ser Ser Thr Ala Thr Tyr Leu Gly Ser Ser Phe Tyr Tyr Gly
          250                      255                      260
aaa ggt ctg atc aat gtc gaa gct gcc gct caa taa                      1140
Lys Gly Leu Ile Asn Val Glu Ala Ala Ala Gln
          265                      270
<210> 2
<211> 379
<212> PRT
<213> Bacillus licheniformis
<400> 2
Met Met Arg Lys Lys Ser Phe Trp Leu Gly Met Leu Thr Ala Phe Met
-105                      -100                      -95                      -90
Leu Val Phe Thr Met Ala Phe Ser Asp Ser Ala Ser Ala Ala Gln Pro
          -85                      -80                      -75
Ala Lys Asn Val Glu Lys Asp Tyr Ile Val Gly Phe Lys Ser Gly Val
          -70                      -65                      -60
Lys Thr Ala Ser Val Lys Lys Asp Ile Ile Lys Glu Ser Gly Gly Lys
          -55                      -50                      -45
Val Asp Lys Gln Phe Arg Ile Ile Asn Ala Ala Lys Ala Lys Leu Asp
          -40                      -35                      -30
Lys Glu Ala Leu Lys Glu Val Lys Asn Asp Pro Asp Val Ala Tyr Val
-25                      -20                      -15                      -10
Glu Glu Asp His Val Ala His Ala Leu Ala Gln Thr Val Pro Tyr Gly
          -5                      -1                      1                      5
Ile Pro Leu Ile Lys Ala Asp Lys Val Gln Ala Gln Gly Phe Lys Gly
          10                      15                      20
Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp Thr Gly Ile Gln Ala Ser His
          25                      30                      35
Pro Asp Leu Asn Val Val Gly Gly Ala Ser Phe Val Ala Gly Glu Ala
          40                      45                      50                      55
Tyr Asn Thr Asp Gly Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val
          60                      65                      70

```

Ala Ala Leu Asp Asn Thr Thr Gly Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Val
75 80 85
Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Asn Ser Ser Gly Ser Gly Ser Tyr
90 95 100
Ser Gly Ile Val Ser Gly Ile Glu Trp Ala Thr Thr Asn Gly Met Asp
105 110 115
Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Ala Ser Gly Ser Thr Ala Met Lys
120 125 130 135
Gln Ala Val Asp Asn Ala Tyr Ala Arg Gly Val Val Val Val Ala Ala
140 145 150
Ala Gly Asn Ser Gly Ser Ser Gly Asn Thr Asn Thr Ile Gly Tyr Pro
155 160 165
Ala Lys Tyr Asp Ser Val Ile Ala Val Gly Ala Val Asp Ser Asn Ser
170 175 180
Asn Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly Ala Glu Leu Glu Val Met Ala
185 190 195
Pro Gly Ala Gly Val Tyr Ser Thr Tyr Pro Thr Asn Thr Tyr Ala Thr
200 205 210 215
Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala
220 225 230
Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Leu Ser Ala Ser Gln Val Arg Asn
235 240 245
Arg Leu Ser Ser Thr Ala Thr Tyr Leu Gly Ser Ser Phe Tyr Tyr Gly
250 255 260
Lys Gly Leu Ile Asn Val Glu Ala Ala Ala Gln
265 270

<210> 3

<211> 948

<212> DNA

<213> Bacillus licheniformis

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(948)

<220>

<221> sig_peptideo

<222> (1)..(93)

<220>

<221> misc_estrutur

<222> (94)..(282)

<223> Pro-peptideo

<220>

<221> mat_peptideo

<222> (283)..(948)

<400> 3

ttg gtt agt aaa aag agt gtt aaa cga ggt ttg atc aca ggt ctc att	48
Leu Val Ser Lys Lys Ser Val Lys Arg Gly Leu Ile Thr Gly Leu Ile	
-90 -85 -80	
ggt att tct att tat tct tta ggt atg cac ccg gcc caa gcc gcg cca	96
Gly Ile Ser Ile Tyr Ser Leu Gly Met His Pro Ala Gln Ala Ala Pro	
-75 -70 -65	
tcg cct cat act cct gtt tca agc gat cct tca tac aaa gcg gaa aca	144
Ser Pro His Thr Pro Val Ser Ser Asp Pro Ser Tyr Lys Ala Glu Thr	
-60 -55 -50	
tcg gtt act tat gac cca cac att aag agc gat caa tac ggc ttg tat	192
Ser Val Thr Tyr Asp Pro His Ile Lys Ser Asp Gln Tyr Gly Leu Tyr	
-45 -40 -35	
tca aaa gcg ttt aca ggc acc ggc aaa gtg aat gaa aca aag gaa aaa	240
Ser Lys Ala Phe Thr Gly Thr Gly Lys Val Asn Glu Thr Lys Glu Lys	
-30 -25 -20 -15	
gcg gaa aaa aag tca ccc gcc aaa gct cct tac agc att aaa tcg gtg	288
Ala Glu Lys Lys Ser Pro Ala Lys Ala Pro Tyr Ser Ile Lys Ser Val	
-10 -5 -1 1	
att ggt tct gat gat cgg aca agg gtc acc aac aca acc gca tat ccg	336

Ile	Gly	Ser	Asp	Asp	Arg	Thr	Arg	Val	Thr	Asn	Thr	Thr	Ala	Tyr	Pro		
		5					10					15					
tac	aga	gcg	atc	gtt	cat	att	tca	agc	agc	atc	ggg	tca	tgc	acc	gga	384	
Tyr	Arg	Ala	Ile	Val	His	Ile	Ser	Ser	Ser	Ile	Gly	Ser	Cys	Thr	Gly		
		20				25					30						
tgg	atg	atc	ggg	ccg	aaa	acc	gtc	gca	aca	gcc	gga	cac	tgc	atc	tat	432	
Trp	Met	Ile	Gly	Pro	Lys	Thr	Val	Ala	Thr	Ala	Gly	His	Cys	Ile	Tyr		
		35			40					45				50			
gac	aca	tca	agc	ggg	tca	ttt	gcc	ggg	aca	gcc	act	gtt	tcg	ccg	gga	480	
Asp	Thr	Ser	Ser	Gly	Ser	Phe	Ala	Gly	Thr	Ala	Thr	Val	Ser	Pro	Gly		
				55					60					65			
cgg	aac	ggg	aca	agc	tat	cct	tac	ggc	tca	gtt	aaa	tcg	acg	cgc	tac	528	
Arg	Asn	Gly	Thr	Ser	Tyr	Pro	Tyr	Gly	Ser	Val	Lys	Ser	Thr	Arg	Tyr		
			70					75					80				
ttt	att	ccg	tca	gga	tgg	aga	agc	gga	aac	acc	aat	tac	gat	tac	gga	576	
Phe	Ile	Pro	Ser	Gly	Trp	Arg	Ser	Gly	Asn	Thr	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Gly		
		85				90					95						
gca	atc	gaa	cta	agc	gaa	ccg	atc	ggc	aat	act	gtc	gga	tac	ttc	gga	624	
Ala	Ile	Glu	Leu	Ser	Glu	Pro	Ile	Gly	Asn	Thr	Val	Gly	Tyr	Phe	Gly		
		100				105					110						
tac	tcg	tac	act	act	tca	tca	ctt	gtt	ggg	aca	act	gtt	acc	atc	agc	672	
Tyr	Ser	Tyr	Thr	Thr	Ser	Ser	Leu	Val	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Ile	Ser		
					120					125					130		
ggc	tac	cca	ggc	gat	aaa	aca	gca	ggc	aca	caa	tgg	cag	cat	tca	gga	720	
Gly	Tyr	Pro	Gly	Asp	Lys	Thr	Ala	Gly	Thr	Gln	Trp	Gln	His	Ser	Gly		
				135					140					145			
ccg	att	gcc	atc	tcc	gaa	acg	tat	aaa	ttg	cag	tac	gca	atg	gac	acg	768	
Pro	Ile	Ala	Ile	Ser	Glu	Thr	Tyr	Lys	Leu	Gln	Tyr	Ala	Met	Asp	Thr		
				150				155					160				
tac	gga	gga	caa	agc	ggg	tca	ccg	gta	ttc	gaa	caa	agc	agc	tcc	aga	816	
Tyr	Gly	Gly	Gln	Ser	Gly	Ser	Pro	Val	Phe	Glu	Gln	Ser	Ser	Ser	Arg		
			165			170						175					
acg	aac	tgt	agc	ggg	ccg	tgc	tcg	ctt	gcc	gta	cac	aca	aat	gga	gta	864	
Thr	Asn	Cys	Ser	Gly	Pro	Cys	Ser	Leu	Ala	Val	His	Thr	Asn	Gly	Val		
		180			185						190						
tac	ggc	ggc	tcc	tcg	tac	aac	aga	ggc	acc	cgg	att	aca	aaa	gag	gtg	912	
Tyr	Gly	Gly	Ser	Ser	Tyr	Asn	Arg	Gly	Thr	Arg	Ile	Thr	Lys	Glu	Val		
				200					205					210			
ttc	gac	aat	ttg	acc	aac	tgg	aaa	aac	agc	gca	caa					948	
Phe	Asp	Asn	Leu	Thr	Asn	Trp	Lys	Asn	Ser	Ala	Gln						
				215					220								

<210> 4

<211> 316

<212> PRT

<213> Bacillus licheniformis

<400> 4

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

35 40 45 50
 Asp Thr Ser Ser Gly Ser Phe Ala Gly Thr Ala Thr Val Ser Pro Gly
 55 60 65
 Arg Asn Gly Thr Ser Tyr Pro Tyr Gly Ser Val Lys Ser Thr Arg Tyr
 70 75 80
 Phe Ile Pro Ser Gly Trp Arg Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asp Tyr Gly
 85 90 95
 Ala Ile Glu Leu Ser Glu Pro Ile Gly Asn Thr Val Gly Tyr Phe Gly
 100 105 110
 Tyr Ser Tyr Thr Thr Ser Ser Leu Val Gly Thr Thr Val Thr Ile Ser
 115 120 125 130
 Gly Tyr Pro Gly Asp Lys Thr Ala Gly Thr Gln Trp Gln His Ser Gly
 135 140 145
 Pro Ile Ala Ile Ser Glu Thr Tyr Lys Leu Gln Tyr Ala Met Asp Thr
 150 155 160
 Tyr Gly Gly Gln Ser Gly Ser Pro Val Phe Glu Gln Ser Ser Arg
 165 170 175
 Thr Asn Cys Ser Gly Pro Cys Ser Leu Ala Val His Thr Asn Gly Val
 180 185 190
 Tyr Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Arg Gly Thr Arg Ile Thr Lys Glu Val
 195 200 205 210
 Phe Asp Asn Leu Thr Asn Trp Lys Asn Ser Ala Gln
 215 220

<210> 5
 <211> 379
 <212> PRT
 <213> Bacillus licheniformis
 <220>
 <221> SINAL
 <222> (1)..(29)
 <220>
 <221> PROPEP
 <222> (30)..(105)
 <220>
 <221> mat_peptideo
 <222> (106)..(379)
 <400> 5

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

Ser Gly Ile Val Ser Gly Ile Glu Trp Ala Thr Thr Asn Gly Met Asp
 105 110 115
 Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro Ser Gly Ser Thr Ala Met Lys
 120 125 130 135
 Gln Ala Val Asp Asn Ala Tyr Ala Arg Gly Val Val Val Val Ala Ala
 140 145 150
 Ala Gly Asn Ser Gly Ser Ser Gly Asn Thr Asn Thr Ile Gly Tyr Pro
 155 160 165
 Ala Lys Tyr Asp Ser Val Ile Ala Val Gly Ala Val Asp Ser Asn Ser
 170 175 180
 Asn Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly Ala Glu Leu Glu Val Met Ala
 185 190 195
 Pro Gly Ala Gly Val Tyr Ser Thr Tyr Pro Thr Ser Thr Tyr Ala Thr
 200 205 210 215
 Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala
 220 225 230
 Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Leu Ser Ala Ser Gln Val Arg Asn
 235 240 245
 Arg Leu Ser Ser Thr Ala Thr Tyr Leu Gly Ser Ser Phe Tyr Tyr Gly
 250 255 260
 Lys Gly Leu Ile Asn Val Glu Ala Ala Ala Gln
 265 270

<210> 6

<211> 381

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis var. natto

<220>

<221> SINAL

<222> (1)..(23)

<220>

<221> PROPEP

<222> (24)..(106)

<220>

<221> mat_peptideo

<222> (107)..(381)

<400> 6

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

```

      105              110              115
Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro Thr Gly Ser Thr Ala
  120              125              130
Leu Lys Thr Val Val Asp Lys Ala Val Ser Ser Gly Ile Val Val Ala
  135              140              145              150
Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Ser Ser Gly Ser Thr Ser Thr Val Gly
      155              160              165
Tyr Pro Ala Lys Tyr Pro Ser Thr Ile Ala Val Gly Ala Val Asn Ser
      170              175              180
Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly Ser Glu Leu Asp Val
      185              190              195
Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr Leu Pro Gly Gly Thr Tyr
  200              205              210
Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala
  215              220              225              230
Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Thr Trp Thr Asn Ala Gln Val
      235              240              245
Arg Asp Arg Leu Glu Ser Thr Ala Thr Tyr Leu Gly Asn Ser Phe Tyr
      250              255              260
Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala Ala Ala Gln
      265              270              275
<210> 7
<211> 275
<212> PRT
<213> Bacillus pumilus (mesentericus)
<220>
<221> mat_peptideo
<222> (1)..(275)
<400> 7
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 Ala Pro Ser Ser Ala 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 Ala 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 Ser Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala
      260              265              270

```

Ala Ala Gln
 275
 <210> 8
 <211> 381
 <212> PRT
 <213> Bacillus subtilis
 <220>
 <221> SINAL
 <222> (1)..(23)
 <220>
 <221> PROPEP
 <222> (24)..(106)
 <220>
 <221> mat_peptideo
 <222> (107)..(381)
 <400> 8
 Met Arg Ser Lys Lys Leu Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Thr Leu
 -105 -100 -95
 Ile Phe Thr Met Ala Phe Ser Asn Met Ser Val Gln Ala Ala Gly Lys
 -90 -85 -80 -75
 Ser Ser Thr Glu Lys Lys Tyr Ile Val Gly Phe Lys Gln Thr Met Ser
 -70 -65 -60
 Ala Met Ser Ser Ala Lys Lys Lys Asp Val Ile Ser Glu Lys Gly Gly
 -55 -50 -45
 Lys Val Gln Lys Gln Phe Lys Tyr Val Asn Ala Ala Ala Ala Thr Leu
 -40 -35 -30
 Asp Glu Lys Ala Val Lys Glu Leu Lys Lys Asp Pro Ser Val Ala Tyr
 -25 -20 -15
 Val Glu Glu Asp His Ile Ala His Glu Tyr Ala Gln Ser Val Pro Tyr
 -10 -5 -1 1 5
 Gly Ile Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu His Ser Gln Gly Tyr Thr
 10 15 20
 Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp Ser Gly Ile Asp Ser Ser
 25 30 35
 His Pro Asp Leu Asn Val Arg Gly Gly Ala Ser Phe Val Pro Ser Glu
 40 45 50
 Thr Asn Pro Tyr Gln Asp Gly Ser Ser His Gly Thr His Val Ala Gly
 55 60 65 70
 Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly Val Ser Pro
 75 80 85
 Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Asp Ser Thr Gly Ser Gly
 90 95 100
 Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu Trp Ala Ile Ser Asn Asn
 105 110 115
 Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro Thr Gly Ser Thr Ala
 120 125 130
 Leu Lys Thr Val Val Asp Lys Ala Val Ser Ser Gly Ile Val Val Ala
 135 140 145 150
 Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Ser Ser Gly Ser Thr Ser Thr Val Gly
 155 160 165
 Tyr Pro Ala Lys Tyr Pro Ser Thr Ile Ala Val Gly Ala Val Asn Ser
 170 175 180
 Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Ala Gly Ser Glu Leu Asp Val
 185 190 195
 Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr Leu Pro Gly Gly Thr Tyr
 200 205 210
 Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala
 215 220 225 230
 Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Thr Trp Thr Asn Ala Gln Val
 235 240 245
 Arg Asp Arg Leu Glu Ser Thr Ala Thr Tyr Leu Gly Asn Ser Phe Tyr
 250 255 260
 Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala Ala Ala Gln

```

265                270                275
<210> 9
<211> 381
<212> PRT
<213> Bacillus stearothermophilus
<220>
<221> SINAL
<222> (1)..(29)
<220>
<221> PROPEP
<222> (30)..(106)
<220>
<221> mat_peptideo
<222> (107)..(381)
<400> 9
Met Arg Ser Lys Lys Leu Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Thr Leu
-105 -100 -95
Ile Phe Thr Met Ala Phe Ser Asn Met Ser Val Gln Ala Ala Gly Lys
-90 -85 -80 -75
Ser Ser Thr Glu Lys Lys Tyr Ile Val Gly Phe Lys Gln Thr Met Ser
-70 -65 -60
Ala Met Ser Ser Ala Lys Lys Lys Asp Val Ile Ser Glu Lys Gly Gly
-55 -50 -45
Lys Val Gln Lys Gln Phe Lys Tyr Val Asn Ala Ala Ala Ala Thr Leu
-40 -35 -30
Asp Glu Lys Ala Val Lys Glu Leu Lys Lys Asp Pro Ser Val Ala Tyr
-25 -20 -15
Val Glu Glu Asp His Ile Ala His Glu Tyr Ala Gln Ser Val Pro Tyr
-10 -5 -1 1 5
Gly Ile Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu His Ser Gln Gly Tyr Thr
10 15 20
Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp Ser Gly Ile Asp Ser Ser
25 30 35
His Pro Asp Leu Asn Val Arg Gly Gly Ala Ser Phe Val Pro Ser Glu
40 45 50
Thr Asn Pro Tyr Gln Asp Gly Ser Ser His Gly Thr His Val Ala Gly
55 60 65 70
Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly Val Ser Pro
75 80 85
Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Asp Ser Thr Gly Ser Gly
90 95 100
Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu Trp Ala Ile Ser Asn Asn
105 110 115
Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro Ser Gly Ser Thr Ala
120 125 130
Leu Lys Thr Val Val Asp Lys Ala Val Ser Ser Gly Ile Val Val Ala
135 140 145 150
Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Ser Ser Gly Ser Ser Ser Thr Val Gly
155 160 165
Tyr Pro Ala Lys Tyr Pro Ser Thr Ile Ala Val Gly Ala Val Asn Ser
170 175 180
Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Ala Gly Ser Glu Leu Asp Val
185 190 195
Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr Leu Pro Gly Gly Thr Tyr
200 205 210
Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala
215 220 225 230
Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Thr Trp Thr Asn Ala Gln Val
235 240 245
Arg Asp Arg Leu Glu Ser Thr Ala Thr Tyr Leu Gly Asn Ser Phe Tyr
250 255 260
Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala Ala Ala Gln
265 270 275

```

```

<210> 10
<211> 382
<212> PRT
<213> Bacillus amyloliquefaciens
<220>
<221> SINAL
<222> (1)..(32)
<220>
<221> PROPEP
<222> (33)..(107)
<220>
<221> mat_peptideo
<222> (108)..(382)
<400> 10
Met Arg Gly  Lys Lys Val Trp Ile  Ser Leu Leu Phe Ala Leu Ala Leu
      -105                -100                -95
Ile Phe Thr Met Ala Phe Gly Ser Thr Ser Ser Ala Gln Ala Ala Gly
      -90                -85                -80
Lys Ser Asn Gly Glu Lys Lys Tyr Ile Val Gly Phe Lys Gln Thr Met
      -75                -70                -65                -60
Ser Thr Met Ser Ala Ala Lys Lys Lys Asp Val Ile Ser Glu Lys Gly
      -55                -50                -45
Gly Lys Val Gln Lys Gln Phe Lys Tyr Val Asp Ala Ala Ser Ala Thr
      -40                -35                -30
Leu Asn Glu Lys Ala Val Lys Glu Leu Lys Lys Asp Pro Ser Val Ala
      -25                -20                -15
Tyr Val Glu Glu Asp His Val Ala His Ala Tyr Ala Gln Ser Val Pro
      -10                -5                -1  1                5
Tyr Gly Val Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu His Ser Gln Gly Tyr
      10                15                20
Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp Ser Gly Ile Asp Ser
      25                30                35
Ser His Pro Asp Leu Lys Val Ala Gly Gly Ala Ser Met Val Pro Ser
      40                45                50
Glu Thr Asn Pro Phe Gln Asp Asn Asn Ser His Gly Thr His Val Ala
      55                60                65
Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly Val Ala
      70                75                80                85
Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala Asp Gly Ser
      90                95                100
Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu Trp Ala Ile Ala Asn
      105                110                115
Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro Ser Gly Ser Ala
      120                125                130
Ala Leu Lys Ala Ala Val Asp Lys Ala Val Ala Ser Gly Val Val Val
      135                140                145
Val Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Thr Ser Gly Ser Ser Ser Thr Val
      150                155                160                165
Gly Tyr Pro Gly Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala Val Gly Ala Val Asp
      170                175                180
Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly Pro Glu Leu Asp
      185                190                195
Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr Leu Pro Gly Asn Lys
      200                205                210
Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala Gly
      215                220                225
Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Trp Thr Asn Thr Gln
      230                235                240                245
Val Arg Ser Ser Leu Glu Asn Thr Thr Thr Lys Leu Gly Asp Ser Phe
      250                255                260
Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala Ala Ala Gln
      265                270                275
<210> 11

```

```

<211> 269
<212> PRT
<213> Bacillus lentus
<220>
<221> mat_peptideo
<222> (1)..(269)
<400> 11
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

```

```

<210> 12
<211> 380
<212> PRT
<213> Bacillus clausii
<220>
<221> SINAL
<222> (1)..(27)
<220>
<221> PROPEP
<222> (28)..(111)
<220>
<221> mat_peptideo
<222> (112)..(380)
<400> 12
Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu
-110 -105 -100
Ile Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ala Glu Glu Ala
-95 -90 -85
Lys Glu Lys Tyr Leu Ile Gly Phe Asn Glu Gln Glu Ala Val Ser Glu
-80 -75 -70 -65
Phe Val Glu Gln Val Glu Ala Asn Asp Glu Val Ala Ile Leu Ser Glu
-60 -55 -50

```

Glu Glu Glu Val Glu Ile Glu Leu Leu His Glu Phe Glu Thr Ile Pro
 -45 -40 -35
 Val Leu Ser Val Glu Leu Ser Pro Glu Asp Val Asp Ala Leu Glu Leu
 -30 -25 -20
 Asp Pro Ala Ile Ser Tyr Ile Glu Glu Asp Ala Glu Val Thr Thr Met
 -15 -10 -5 -1
 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

<210> 13

<211> 378

<212> PRT

<213> Bacillus sp.

<220>

<221> SINAL

<222> (1)..(27)

<220>

<221> PROPEP

<222> (28)..(110)

<220>

<221> mat_peptideo

<222> (111)..(378)

<400> 13

Met Asn Lys Lys Met Gly Lys Ile Val Ala Gly Thr Ala Leu Ile
 -110 -105 -100
 Ile Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Gln Ala Ala Glu Glu Ala
 -95 -90 -85 -80
 Lys Glu Lys Tyr Leu Ile Gly Phe Lys Glu Gln Glu Val Met Ser Gln
 -75 -70 -65
 Phe Val Asp Gln Ile Asp Gly Asp Glu Tyr Ser Ile Ser Ser Gln Ala
 -60 -55 -50
 Glu Asp Val Glu Ile Asp Leu Leu His Glu Phe Asp Phe Ile Pro Val

```

      -45              -40              -35
Leu Ser Val Glu Leu Asp Pro Glu Asp Val Asp Ala Leu Glu Leu Asp
      -30              -25              -20
Pro Ala Ile Ala Tyr Ile Glu Glu Asp Ala Glu Val Thr Thr Met Gln
      -15              -10              -5              -1  1
Thr Val Pro Trp Gly Ile Asn Arg Val Gln Ala Pro Ile Ala Gln Ser
      5              10              15
Arg Gly Phe Thr Gly Thr Gly Val Arg Val Ala Val Leu Asp Thr Gly
      20              25              30
Ile Ser Asn His Ala Asp Leu Arg Ile Arg Gly Gly Ala Ser Phe Val
      35              40              45
Pro Gly Glu Pro Asn Ile Ser Asp Gly Asn Gly His Gly Thr Gln Val
      50              55              60              65
Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly Val
      70              75              80
Ala Pro Asn Val Asp Leu Tyr Gly Val Lys Val Leu Gly Ala Ser Gly
      85              90              95
Ser Gly Ser Ile Ser Gly Ile Ala Gln Gly Leu Gln Trp Ala Ala Asn
      100              105              110
Asn Gly Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ser Ser Ala Gly Ser
      115              120              125
Ala Thr Met Glu Gln Ala Val Asn Gln Ala Thr Ala Ser Gly Val Leu
      130              135              140              145
Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Gly Asn Val Gly Phe Pro
      150              155              160
Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln Asn Asn
      165              170              175
Asn Arg Ala Thr Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile Val Ala
      180              185              190
Pro Gly Val Gly Val Gln Ser Thr Val Pro Gly Asn Gly Tyr Ala Ser
      195              200              205
Phe Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Val Ala Ala
      210              215              220              225
Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile Arg Asn
      230              235              240
His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Asn Leu Gly Asn Thr Thr Gln Phe Gly
      245              250              255
Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
      260              265

```

<210> 14

<211> 269

<212> PRT

<213> Thermomyces lanuginosus

<220>

<221> mat_peptideo

<222> (1)..()

<400> 14

```

Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe Asn Leu Phe Ala Gln Tyr
1              5              10              15
Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn Asp Ala Pro Ala Gly Thr
      20              25              30
Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro Glu Val Glu Lys Ala Asp
      35              40              45
Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser Gly Val Gly Asp Val Thr
      50              55              60
Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys Leu Ile Val Leu Ser Phe
      65              70              75              80
Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile Gly Asn Leu Asn Phe Asp
      85              90              95
Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly Cys Arg Gly His Asp Gly
      100              105              110
Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp Thr Leu Arg Gln Lys Val
      115              120              125

```

Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr Arg Val Val Phe Thr Gly
 130 135 140
 His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val Ala Gly Ala Asp Leu Arg
 145 150 155 160
 Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser Tyr Gly Ala Pro Arg Val
 165 170 175
 Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr Val Gln Thr Gly Gly Thr
 180 185 190
 Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile Val Pro Arg Leu Pro Pro
 195 200 205
 Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Lys Ser
 210 215 220
 Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp Ile Val Lys Ile Glu Gly
 225 230 235 240
 Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro Asn Ile Pro Asp Ile Pro
 245 250 255
 Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly Thr Cys Leu
 260 265

<210> 15

<211> 274

<212> PRT

<213> Humicola lanuginosa

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(269)

<220>

<221> mat_peptideo

<222> (6)..(269)

<400> 15

Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe Asn
 -5 -1 1 5 10
 Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn Asp
 15 20 25
 Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro Glu
 30 35 40
 Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser Gly
 45 50 55
 Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys Leu
 60 65 70 75
 Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile Gly
 80 85 90
 Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly Cys
 95 100 105
 Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp Thr
 110 115 120
 Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr Arg
 125 130 135
 Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val Ala
 140 145 150 155
 Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser Tyr
 160 165 170
 Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr Val
 175 180 185
 Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile Val
 190 195 200
 Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro Glu
 205 210 215
 Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Arg Arg Arg Asp Ile
 220 225 230 235
 Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro Asn
 240 245 250
 Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly Thr
 255 260 265

Cys Leu

<210> 16

<211> 513

<212> PRT

<213> Bacillus stearothermophilus

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(513)

<400> 16

Ala	Ala	Pro	Phe	Asn	Gly	Thr	Met	Met	Gln	Tyr	Phe	Glu	Trp	Tyr	Leu
1				5					10					15	
Pro	Asp	Asp	Gly	Thr	Leu	Trp	Thr	Lys	Val	Ala	Asn	Glu	Ala	Asn	Asn
			20					25					30		
Leu	Ser	Ser	Leu	Gly	Ile	Thr	Ala	Leu	Trp	Leu	Pro	Pro	Ala	Tyr	Lys
		35					40					45			
Gly	Thr	Ser	Arg	Ser	Asp	Val	Gly	Tyr	Gly	Val	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Asp
	50					55					60				
Leu	Gly	Glu	Phe	Asn	Gln	Lys	Gly	Thr	Val	Arg	Thr	Lys	Tyr	Gly	Thr
65					70					75					80
Lys	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Ala	Ile	Gln	Ala	Ala	His	Ala	Ala	Gly	Met
				85					90					95	
Gln	Val	Tyr	Ala	Asp	Val	Val	Phe	Asp	His	Lys	Gly	Gly	Ala	Asp	Gly
			100					105					110		
Thr	Glu	Trp	Val	Asp	Ala	Val	Glu	Val	Asn	Pro	Ser	Asp	Arg	Asn	Gln
		115					120					125			
Glu	Ile	Ser	Gly	Thr	Tyr	Gln	Ile	Gln	Ala	Trp	Thr	Lys	Phe	Asp	Phe
	130					135					140				
Pro	Gly	Arg	Gly	Asn	Thr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Lys	Trp	Arg	Trp	Tyr	His
145					150					155				160	
Phe	Asp	Gly	Val	Asp	Trp	Asp	Glu	Ser	Arg	Lys	Leu	Ser	Arg	Ile	Tyr
				165					170					175	
Lys	Phe	Arg	Gly	Lys	Ala	Trp	Asp	Trp	Glu	Val	Asp	Thr	Glu	Phe	Gly
			180					185					190		
Asn	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ala	Asp	Leu	Asp	Met	Asp	His	Pro	Glu
		195					200					205			
Val	Val	Thr	Glu	Leu	Lys	Asn	Trp	Gly	Lys	Trp	Tyr	Val	Asn	Thr	Thr
		210				215					220				
Asn	Ile	Asp	Gly	Phe	Arg	Leu	Asp	Ala	Val	Lys	His	Ile	Lys	Phe	Ser
225					230					235					240
Phe	Phe	Pro	Asp	Trp	Leu	Ser	Tyr	Val	Arg	Ser	Gln	Thr	Gly	Lys	Pro
				245					250					255	
Leu	Phe	Thr	Val	Gly	Glu	Tyr	Trp	Ser	Tyr	Asp	Ile	Asn	Lys	Leu	His
			260					265					270		
Asn	Tyr	Ile	Thr	Lys	Thr	Asp	Gly	Thr	Met	Ser	Leu	Phe	Asp	Ala	Pro
		275					280					285			
Leu	His	Asn	Lys	Phe	Tyr	Thr	Ala	Ser	Lys	Ser	Gly	Gly	Ala	Phe	Asp
	290					295					300				
Met	Arg	Thr	Leu	Met	Thr	Asn	Thr	Leu	Met	Lys	Asp	Gln	Pro	Thr	Leu
305					310					315					320
Ala	Val	Thr	Phe	Val	Asp	Asn	His	Asp	Thr	Glu	Pro	Gly	Gln	Ala	Leu
				325					330					335	
Gln	Ser	Trp	Val	Asp	Pro	Trp	Phe	Lys	Pro	Leu	Ala	Tyr	Ala	Phe	Ile
			340					345					350		
Leu	Thr	Arg	Gln	Glu	Gly	Tyr	Pro	Cys	Val	Phe	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Tyr
		355					360					365			
Gly	Ile	Pro	Gln	Tyr	Asn	Ile	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Lys	Ile	Asp	Pro
	370					375					380				
Leu	Leu	Ile	Ala	Arg	Arg	Asp	Tyr	Ala	Tyr	Gly	Thr	Gln	His	Asp	Tyr
385					390					395					400
Leu	Asp	His	Ser	Asp	Ile	Ile	Gly	Trp	Thr	Arg	Glu	Gly	Gly	Thr	Glu
				405					410					415	
Lys	Pro	Gly	Ser	Gly	Leu	Ala	Ala	Leu	Ile	Thr	Asp	Gly	Pro	Gly	Gly

			420					425				430					
Ser	Lys	Trp	Met	Tyr	Val	Gly	Lys	Gln	His	Ala	Gly	Lys	Val	Phe	Tyr		
		435					440					445					
Asp	Leu	Thr	Gly	Asn	Arg	Ser	Asp	Thr	Val	Thr	Ile	Asn	Ser	Asp	Gly		
	450					455					460						
Trp	Gly	Glu	Phe	Lys	Val	Asn	Gly	Gly	Ser	Val	Ser	Val	Trp	Val	Pro		
465					470					475					480		
Arg	Lys	Thr	Thr	Val	Ser	Thr	Ile	Ala	Arg	Pro	Ile	Thr	Thr	Arg	Pro		
				485				490						495			
Trp	Thr	Gly	Glu	Phe	Val	Arg	Trp	Thr	Glu	Pro	Arg	Leu	Val	Ala	Trp		
			500					505					510				

Pro

<210> 17

<211> 481

<212> PRT

<213> Bacillus licheniformis

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(481)

<400> 17

Val	Asn	Gly	Thr	Leu	Met	Gln	Tyr	Phe	Glu	Trp	Tyr	Thr	Pro	Asn	Asp		
1				5					10					15			
Gly	Gln	His	Trp	Lys	Arg	Leu	Gln	Asn	Asp	Ala	Glu	His	Leu	Ser	Asp		
			20					25					30				
Ile	Gly	Ile	Thr	Ala	Val	Trp	Ile	Pro	Pro	Ala	Tyr	Lys	Gly	Thr	Ser		
	35					40						45					
Gln	Ala	Asp	Val	Gly	Tyr	Gly	Ala	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Asp	Leu	Gly	Glu		
	50					55				60							
Phe	His	Gln	Lys	Gly	Thr	Val	Arg	Thr	Lys	Tyr	Gly	Thr	Lys	Gly	Glu		
65					70					75					80		
Leu	Gln	Ser	Ala	Ile	Lys	Ser	Leu	His	Ser	Arg	Asp	Ile	Asn	Val	Tyr		
				85					90					95			
Gly	Asp	Val	Val	Ile	Asn	His	Lys	Gly	Gly	Ala	Asp	Ala	Thr	Glu	Asp		
		100						105					110				
Val	Thr	Ala	Val	Glu	Val	Asp	Pro	Ala	Asp	Arg	Asn	Arg	Val	Ile	Ser		
	115						120					125					
Gly	Glu	His	Leu	Ile	Lys	Ala	Trp	Thr	His	Phe	His	Phe	Pro	Gly	Arg		
	130					135					140						
Gly	Ser	Thr	Tyr	Ser	Asp	Phe	Lys	Trp	Tyr	Trp	Tyr	His	Phe	Asp	Gly		
145					150					155					160		
Thr	Asp	Trp	Asp	Glu	Ser	Arg	Lys	Leu	Asn	Arg	Ile	Tyr	Lys	Phe	Gln		
				165					170					175			
Gly	Lys	Thr	Trp	Asp	Trp	Glu	Val	Ser	Asn	Glu	Phe	Gly	Asn	Tyr	Asp		
			180					185					190				
Tyr	Leu	Met	Tyr	Ala	Asp	Ile	Asp	Tyr	Asp	His	Pro	Asp	Val	Val	Ala		
	195						200					205					
Glu	Ile	Lys	Arg	Trp	Gly	Thr	Trp	Tyr	Ala	Asn	Glu	Leu	Gln	Leu	Asp		
	210					215					220						
Gly	Phe	Arg	Leu	Asp	Ala	Val	Lys	His	Ile	Lys	Phe	Ser	Phe	Leu	Arg		
225					230					235					240		
Asp	Trp	Val	Asn	His	Val	Arg	Glu	Lys	Thr	Gly	Lys	Glu	Met	Phe	Thr		
				245					250					255			
Val	Ala	Glu	Tyr	Trp	Ser	Asn	Asp	Leu	Gly	Ala	Leu	Glu	Asn	Tyr	Leu		
		260						265					270				
Asn	Lys	Thr	Asn	Phe	Asn	His	Ser	Val	Phe	Asp	Val	Pro	Leu	His	Tyr		
	275						280					285					
Gln	Phe	His	Ala	Ala	Ser	Thr	Gln	Gly	Gly	Gly	Tyr	Asp	Met	Arg	Lys		
	290					295					300						
Leu	Leu	Asn	Gly	Thr	Val	Ser	Lys	His	Pro	Leu	Lys	Ser	Val	Thr			
305					310					315					320		
Phe	Val	Asp	Asn	His	Asp	Thr	Gln	Pro	Gly	Gln	Ser	Leu	Glu	Ser	Thr		
				325					330						335		

Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg
 340 345 350
 Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly Thr Lys
 355 360 365
 Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile Glu Pro
 370 375 380
 Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His Asp Tyr
 385 390 395 400
 Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp Ser Ser
 405 410 415
 Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly Gly
 420 425 430
 Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr Trp His
 435 440 445
 Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser Glu Gly
 450 455 460
 Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr Val Gln
 465 470 475 480
 Arg

<210> 18

<211> 483

<212> PRT

<213> Bacillus sp.

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(483)

<400> 18

His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr
 1 5 10 15
 Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Ser Asp Ala Ser
 20 25 30
 Asn Leu Lys Asp Lys Gly Ile Ser Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp
 35 40 45
 Lys Gly Ala Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr
 50 55 60
 Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr Gly
 65 70 75 80
 Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Asn Ala Leu Lys Ser Asn Gly
 85 90 95
 Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp
 100 105 110
 Ala Thr Glu Met Val Lys Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn
 115 120 125
 Gln Glu Val Ser Gly Glu Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp
 130 135 140
 Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Asn Phe Lys Trp Arg Trp Tyr
 145 150 155 160
 His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Lys Leu Asn Asn Arg
 165 170 175
 Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Lys Gly Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu
 180 185 190
 Phe Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met Asp His
 195 200 205
 Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr Thr Asn
 210 215 220
 Thr Leu Gly Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His Ile Lys
 225 230 235 240
 Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Ile Asn His Val Arg Ser Ala Thr Gly
 245 250 255
 Lys Asn Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu Gly Ala
 260 265 270
 Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val Phe Asp

[illegible]

REIVINDICAÇÕES

1. Protease, caracterizada pelo fato de que tem pelo menos 50 % de identidade com os aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2, para o uso como um medicamento.

5 2. Protease de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que

10 a) a protease compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste dos aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2, aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 5, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 6, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 7, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 8, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 9, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 10, aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 11, aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 12, e aminoácidos de 1 a 268 da SEQ ID NO: 13; e/ou

15 b) a protease é uma variante de uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste dos aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2, aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 5, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 6, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 7, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 8, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 9, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 10, aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 11, aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 12, e aminoácidos de 1 a 268 da SEQ ID NO: 13, em que a variante difere da respectiva seqüência de aminoácido em não mais do que vinte e cinco aminoácidos, e em que:

25 (i) a variante compreende pelo menos uma substituição, deleção e/ou inserção de um ou mais aminoácidos quando comparada com a respectiva seqüência de aminoácido; e/ou

 (ii) a variante compreende pelo menos uma deleção pequena quando comparada com a respectiva seqüência de aminoácido; e/ou

 (iii) a variante compreende pelo menos uma extensão de

terminal N ou C pequenas quando comparada com a respectiva seqüência de aminoácido; e/ou

c) a protease é uma variante alélica de uma protease tendo os aminoácidos selecionados do grupo que consiste dos aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2, aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 5, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 6, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 7, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 8, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 9, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 10, aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 11, aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 12, e aminoácidos de 1 a 268 da SEQ ID NO: 13; e/ou

d) a protease é um fragmento de uma protease tendo os aminoácidos selecionados do grupo que consiste dos aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2, aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 5, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 6, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 7, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 8, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 9, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 10, aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 11, aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 12, e aminoácidos de 1 a 268 da SEQ ID NO: 13.

3. Protease de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que a protease tem uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste dos aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2, aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 5, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 6, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 7, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 8, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 9, aminoácidos de 1 a 275 da SEQ ID NO: 10, aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 11, aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 12, e aminoácidos de 1 a 268 da SEQ ID NO: 13.

4. Protease de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizada pelo fato de que está em combinação com uma lipase ou

uma amilase, para o uso como um medicamento.

5. Protease de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizada pelo fato de que está em combinação com uma lipase e uma amilase, para o uso como um medicamento.

5 6. Protease, caracterizada pelo fato de estar em combinação com uma lipase e/ou uma amilase de acordo com as reivindicações 4 ou 5, em que

(i) a lipase tem pelo menos 70 % de identidade com uma lipase tendo os aminoácidos de 1 a 269 da SEQ ID NO: 15; e

10 (iii) a amilase tem pelo menos 70 % de identidade com uma amilase selecionada do grupo que consiste de:

a) uma amilase tendo os aminoácidos de 1 a 481 da SEQ ID NO: 16,

15 b) uma amilase tendo os aminoácidos de 1 a 481 da SEQ ID NO: 17, e

c) uma amilase tendo os aminoácidos de 1 a 483 da SEQ ID NO: 18.

20 7. Protease, caracterizado pelo fato de estar em combinação com uma lipase e/ou uma amilase de acordo com as reivindicações 4 ou 5, em que

(i) a protease tem os aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2

(ii) a lipase compreende os aminoácidos de 2 a 269 da SEQ ID NO: 15; e

25 (iii) a amilase é uma amilase selecionada do grupo que consiste de:

a) uma amilase que compreende os aminoácidos de 1 a 481 da SEQ ID NO: 16,

b) uma amilase tendo os aminoácidos de 1 a 481 da SEQ ID NO: 17, e

c) uma amilase tendo os aminoácidos de 1 a 483 da SEQ ID NO: 18.

8. Uso de uma protease como definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de um medicamento para o tratamento de distúrbios digestivos, insuficiência exócrina pancreática, pancreatite, fibrose cística, diabetes tipo I e/ou diabetes tipo II.

9. Uso de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que ainda compreende o uso de uma lipase ou uma amilase.

10. Uso de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que ainda compreende o uso de uma lipase e de uma amilase.

11. Uso de acordo com as reivindicações 9 ou 10, caracterizado pelo fato de que a lipase e/ou a amilase estão de acordo com as reivindicações 6 ou 7.

12. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende uma protease como definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, junto com pelo menos um material auxiliar farmacêuticamente aceitável.

13. Composição de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que compreende ainda uma lipase ou uma amilase.

14. Composição de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que compreende ainda uma lipase e uma amilase.

15. Composição de acordo com as reivindicações 13 ou 14, caracterizada pelo fato de que a lipase e/ou amilase estão de acordo com as reivindicações 6 ou 7.

16. Método para o tratamento de doença, a dita doença sendo distúrbios digestivos, insuficiência exócrina pancreática, pancreatite, fibrose cística, diabetes tipo I e/ou diabetes tipo II, caracterizado pelo fato de ser pela administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma protease

como definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 3.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que compreende ainda administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma lipase ou de uma amilase.

5 18. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que compreende ainda administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma lipase e de uma amilase.

10 19. Método de acordo com as reivindicações 17 ou 18, caracterizado pelo fato de que a lipase e/ou amilase estão de acordo com as reivindicações 6 ou 7.

RESUMO

“PROTEASE, USO DE UMA PROTEASE, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE DOENÇA”

5 O uso farmacêutico de proteases relacionadas com os aminoácidos de 1 a 274 da SEQ ID NO: 2, a serina protease derivada de *Bacillus licheniformis*, que também é designado subtilisina Carlsberg, opcionalmente em combinação com uma lipase e/ou uma amilase. Os exemplos de indicações médicas são: Tratamento de distúrbios digestivos, insuficiência exócrina pancreática (PEI), pancreatite, fibrose cística, diabetes
10 tipo I e/ou diabetes tipo II.