



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112012028467-3 B1



(22) Data do Depósito: 05/05/2011

(45) Data de Concessão: 17/02/2021

(54) Título: VARIANTES DE SUBTILISINA, SEU MÉTODO DE PRODUÇÃO, ÁCIDO NUCLEICO, E MÉTODO DE LIMPEZA

(51) Int.Cl.: C12N 9/54; C11D 3/386; C11D 3/39.

(30) Prioridade Unionista: 06/05/2010 US 61/332,151; 06/05/2010 US 61/332,006; 12/10/2010 US 61/392,364; 12/10/2010 US 61/392,188.

(73) Titular(es): DANISCO US INC.; THE PROCTER & GAMBLE COMPANY.

(72) Inventor(es): VIKTOR YURYEVICH ALEKSEYEV; NEELAM S. AMIN; KATHERINE AUGUSTYN; LUIS GUSTAVO CASCAO-PEREIRA; KATHERINE D. COLLIER; DAVID A. ESTELL; JAMES T. KELLIS, JR.; AYROOKARAN J. POULOSE; PHILIP FRANK SOUTER; GLENN STEVEN WARD; JIAN YAO.

(86) Pedido PCT: PCT US2011035389 de 05/05/2011

(87) Publicação PCT: WO 2011/140364 de 10/11/2011

(85) Data do Início da Fase Nacional: 06/11/2012

(57) Resumo: VARIANTES DE SUBTILISINA, SEU MÉTODO DE PRODUÇÃO ÁCIDO NUCLEICO, BEM COMO COMPOSIÇÕES E MÉTODOS DE LIMPEZA. A presente invenção apresenta variantes de protease de serina produzidas a partir da invenção. Especificamente, a presente invenção fornece variantes de serina protease que possuem uma ou mais substituições em comparação a uma serina protease de referência. Além disso, a presente invenção apresenta composições que compreendem estas variantes de serina protease. Em algumas modalidades, a presente invenção apresenta composições de limpeza que compreendem pelo menos uma destas variantes de serina protease.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"VARIANTES DE SUBTILISINA, SEU MÉTODO DE PRODUÇÃO, ÁCIDO NUCLEICO, E MÉTODO DE LIMPEZA"**.

REFERÊNCIA REMISSIVA AO PEDIDO CORRELATO

[0001] Este pedido reivindica o benefício dos pedidos provisórios n°s 61/332.151, depositado em 06 de maio de 2010; 61/332.006, depositado em 06 de maio de 2010; 61/392.364, depositado em 12 de outubro de 2010, e 61/392.188, depositado em 12 de outubro de 2010, todos os quais estão aqui incorporados a título de referência nas suas totalidades.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0002] A presente invenção apresenta variantes de serina protease. Especificamente, a presente invenção fornece variantes de serina protease que possuem uma ou mais substituições em comparação a uma serina protease de referência. Além disso, a presente invenção apresenta composições que compreendem estas variantes de serina protease. Em algumas modalidades, a presente invenção apresenta composições de limpeza que compreendem pelo menos uma destas variantes de serina protease.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0003] Embora as serina proteases sejam conhecidas há muito tempo na técnica de enzimas industriais, ainda há uma necessidade por proteases manipuladas que sejam adequadas para condições e usos específicos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0004] A presente invenção apresenta variantes de serina protease. Especificamente, a presente invenção fornece variantes de serina protease que possuem uma ou mais substituições em comparação a uma serina protease de referência. Além disso, a presente invenção apresenta composições que compreendem estas variantes de serina

protease. Em algumas modalidades, a presente invenção apresenta composições de limpeza que compreendem pelo menos uma destas variantes de serina protease.

[0005] A presente invenção apresenta variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X1R, X2W, X2M, X2R, X2A, X2S, X3R, X4R, X4C, X4S, X8A, X9F, X9W, X9A, X10S, X10M, X10H, X10A, X12R, X12F, X14K, X14F, X14Q, X15R, X15F, X16S, X17R, X17M, X17F, X18R, X18K, X20F, X20R, X20K, X22Y, X22A, X22R, X22V, X22Q, X22W, X22L, X23F, X23S, X23A, X24W, X24R, X24H, X24F, X24Q, X24L, X25V, X25F, X25R, X26F, X27V, X27F, X27L, X27R, X28N, X28E, X28A, X29T, X30E, X31F, X33D, X33G, X33S, X34P, X35M, X36F, X36R, X36T, X38L, X38F, X38R, X40L, X40W, X40N, X40R, X40T, X40H, X42I, X43D, X43I, X43R, X43M, X43F, X43W, X43S, X43A, X45T, X46R, X48R, X50C, X51H, X51W, X51F, X52F, X52E, X52N, X55Y, X57R, X59R, X59A, X59F, X60A, X60Q, X60P, X62E, X62Q, X63I, X63V, X63T, X63P, X63D, X63M, X63H, X63Q, X63E, X63A, X63S, X64F, X64T, X68C, X68A, X69N, X69P, X69W, X69T, X71G, X72C, X74C, X75F, X75A, X75R, X75E, X76D, X78I, X78R, X78N, X79W, X79Q, X81R, X82V, X82T, X82F, X82M, X82R, X85M, X86L, X86I, X86W, X89P, X89T, X89V, X89G, X89W, X89H, X89F, X89L, X89I, X91N, X91F, X92F, X94N, X99G, X99F, X99M, X99T, X99P, X100I, X100S, X100N, X100Q, X101N, X101A, X101G, X101P, X101F, X101E, X101T, X101D, X102H, X102N, X102E, X102T, X102A, X103G, X103D, X103N, X104D, X104E, X104I, X104L, X105Q, X105E, X105T, X106F, X106V, X106G, X106E, X106T, X106D, X106A, X107F, X107M, X108G, X108I, X109M, X111V, X111I, X112V, X112L, X112Q, X114G, X115K, X115R, X116A, X116K,

X116L, X117F, X118I, X118R, X119C, X120F, X120A, X120R, X121E, X121F, X123G, X123E, X124S, X128F, X128H, X128I, X128L, X128Q, X128N, X128M, X128D, X129E, X132E, X132A, X138G, X144R, X147L, X148I, X158E, X158E, X159E, X159C, X160D, X166D, X166E, X167W, X175V, X177C, X181A, X182R, X183F, X183I, X183D, X183R, X183M, X185E, X185I, X185V, X186H, X186K, X188R, X188E, X188D, X192H, X192W, X194V, X194F, X194E, X197F, X198L, X198F, X203E, X203C, X208S, X209N, X209F, X209E, X209S, X209H, X209G, X209T, X209L, X210R, X210V, X210L, X211R, X211Q, X212I, X212M, X212F, X213A, X214F, X215F, X215N, X215D, X215H, X215E, X216F, X216A, X217N, X217E, X217D, X218P, X218D, X218E, X224A, X224G, X227I, X230E, X231I, X231C, X233C, X234F, X235F, X236F, X236N, X238L, X238K, X238R, X239K, X239S, X239T, X239G, X239H, X239R, X239N, X239F, X240R, X241R, X242L, X242R, X243R, X243F, X244R, X246S, X248I, X248V, X248R, X249R, X249T, X250I, X251S, X251R, X252I, X252F, X252H, X252R, X253F, X253I, X253R, X254C, X256N, X258R, X260V, X260I, X262H, X262D, X263F, X265F, X267N, X267V, X267M, X269I, X269R, X270C, X271F, X271V, X271I, X271P, X271H, X271M, X271T, X271L, X271A, X272F, X272R, X272F, X273I, X273F, e X274G, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[0006] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X16S, X18R, X20R, X22A, X24R, X43R/D, X45T, X76D, X101A, X103G, X104L, X111V, X128N, X148I,

X230E, X242R, e X249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[0007] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X1R, X230E, X271L, X115R, X20R, X249R, X235F, X27V/F/L, X75E, X82R, X18R, X269R, X43D, X43R, X76D, X45T, X212F, X242R, X24R, X78R, X9A, X22R, X121E, X244R, X28E, X30E, X4R, e X241R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[0008] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X062E-X158E, X103G-X158E, X128N-X158E, X016S-X158E, X104L-X158E, X089P-X158E, X111V-X158E, X022A-X158E, X101A-X158E, X148I-X158E, X129E-X158E, X022A-X089P, X016S-X089P, X062E-X089P, X062E-X271F, X158E-X271F, X186H-X271F, X129E-X271F, X111V-X271F, X209E-X271F, X016S-X271F, X188D-X271F, X022A-X271F, X159E-X271F, X104L-X271F, X101A-X271F, X089P-X271F, X128N-X271F, X103G-X271F, X148I-X271F, X249R-X271F, X062E-X159E, X016S-X159E, X128N-X159E, X148I-X159E, X111V-X159E, X089P-X159E, X022A-X159E, X129E-X159E, X103G-X159E, X104L-X159E, X158E-X159E, X101A-X159E, X158E-X249R, X111V-X249R, X129E-X249R, X062E-X249R,

X016S-X249R, X186H-X249R, X148I-X249R, X159E-X249R, X101A-X249R, X188D-X249R, X104L-X249R, X209E-X249R, X022A-X249R, X128N-X249R, X103G-X249R, X089P-X249R, X022A-X111V, X101A-X111V, X016S-X111V, X104L-X111V, X062E-X111V, X103G-X111V, X089P-X111V, X016S-X148I, X062E-X148I, X022A-X148I, X129E-X148I, X104L-X148I, X103G-X148I, X128N-X148I, X101A-X148I, X089P-X148I, X111V-X148I, X016S-X062E, X022A-X062E, X062E-X129E, X022A-X129E, X128N-X129E, X016S-X129E, X101A-X129E, X104L-X129E, X089P-X129E, X103G-X129E, X111V-X129E, X062E-X186H, X128N-X186H, X101A-X186H, X022A-X186H, X016S-X186H, X158E-X186H, X089P-X186H, X129E-X186H, X159E-X186H, X103G-X186H, X104L-X186H, X111V-X186H, X148I-X186H, X062E-X101A, X022A-X101A, X016S-X101A, X089P-X101A, X062E-X103G, X022A-X103G, X016S-X103G, X101A-X103G, X089P-X103G, X062E-X128N, X016S-X128N, X022A-X128N, X101A-X128N, X104L-X128N, X089P-X128N, X103G-X128N, X111V-X128N, X111V-X188D, X062E-X188D, X016S-X188D, X148I-X188D, X022A-X188D, X128N-X188D, X101A-X188D, X104L-X188D, X089P-X188D, X129E-X188D, X159E-X188D, X186H-X188D, X103G-X188D, X158E-X188D, X016S-X022A, X016S-X104L, X022A-X104L, X101A-X104L, X062E-X104L, X103G-X104L, X089P-X104L, X159E-X209E, X111V-X209E, X101A-X209E, X016S-X209E, X128N-X209E, X148I-X209E, X129E-X209E, X062E-X209E, X022A-X209E, X103G-X209E, X158E-X209E, X188D-X209E, X104L-X209E, X089P-X209E, e X186H-X209E, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[0009] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de

aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X018R-X241R, X020R-X241R, X024R-X241R, X009A-X241R, X020R-X241R, X004R-X241R, X043R-X241R, X078R-X241R, X022R-X241R, X115R-X241R, X001R-X241R, X212F-X241R, X082R-X241R, X018R-X244R, X024R-X244R, X078R-X244R, X020R-X244R, X212F-X244R, X009A-X244R, X082R-X244R, X001R-X244R, X043R-X244R, X022R-X244R, X004R-X244R, X115R-X244R, X241R-X244R, X242R-X244R, X001R-X004R, X009A-X022R, X018R-X022R, X020R-X022R, X004R-X022R, X001R-X022R, X024R-X242R, X018R-X242R, X004R-X242R, X020R-X242R, X212F-X242R, X082R-X242R, X078R-X242R, X001R-X242R, X009A-X242R, X022R-X242R, X115R-X242R, X043R-X242R, X241R-X242R, X018R-X212F, X022R-X212F, X004R-X212F, X024R-X212F, X001R-X212F, X115R-X212F, X020R-X212F, X009A-X212F, X043R-X212F, X078R-X212F, X082R-X212F, X009A-X078R, X020R-X078R, X024R-X078R, X022R-X078R, X018R-X078R, X004R-X078R, X001R-X078R, X043R-X078R, X022R-X024R, X020R-X024R, X018R-X024R, X001R-X024R, X004R-X024R, X009A-X024R, X004R-X009A, X001R-X009A, X242R-X269R, X024R-X269R, X020R-X269R, X022R-X269R, X249R-X269R, X212F-X269R, X043R-X269R, X244R-X269R, X001R-X269R, X018R-X269R, X078R-X269R, X009A-X269R, X115R-X269R, X241R-X269R, X004R-X269R, X082R-X269R, X018R-X043R, X020R-X043R, X004R-X043R, X022R-X043R, X009A-X043R, X001R-X043R, X024R-X043R, X009A-X018R, X004R-X018R, X001R-X018R, X024R-X082R, X009A-X082R, X018R-X082R, X001R-X082R, X078R-X082R, X020R-X082R, X022R-X082R, X004R-X082R, X043R-X082R, X043R-X249R, X020R-X249R, X004R-X249R, X018R-X249R, X009A-X249R, X212F-X249R, X022R-X249R, X024R-X249R, X115R-X249R, X001R-X249R, X082R-X249R, X242R-X249R, X241R-X249R, X244R-X249R, X078R-X249R, X018R-X115R, X020R-X115R, X022R-X115R, X078R-X115R, X009A-X115R,

X004R-X115R, X001R-X115R, X082R-X115R, X043R-X115R, X024R-X115R, X009A-X020R, X018R-X020R, X004R-X020R, X001R-X020R, X009A-X271L, X020R-X271L, X024R-X271L, X244R-X271L, X241R-X271L, X043R-X271L, X022R-X271L, X249R-X271L, X212F-X271L, X115R-X271L, X242R-X271L, X078R-X271L, X004R-X271L, X269R-X271L, X001R-X271L, X018R-X271L, e X082R-X271L, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00010] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X020R-X-43R, X020K-X062E, X024F-X116L, X020K-X024F, X024R-X174T, X024R-X118R, X024R-X235F, X024R-X086R, X024R-X086W, X078R-X118R, X033S-X118R, X033S-X235F, X209A-X241R, X020R-X076D, X018R-X245R, X024R-X045T, X232V-X245R, X118R-X172V, X118R-X194T, X008T-X024R, X235F-X243F, X018R-X103A, X018R-X104I, X086W-X118R, X086W-X243F, X086W-X209A, X024C-X033S, X024R-X232V, X024R-X243F, X024R-X239Q, X024R-X101G, X024R-X141G, X024R-X033S, X024R-X274I, X024R-X209A, X078R-X086W, X101G-X232V, X033S-X148F, X033S-X086W, X033S-X201S, X033S-X078R, X033S-X241R, X033S-X209A, X230E-X249R, X232V-X249R, X118R-X235F, X076D-X245R, X086W-X235F, X024R-X247H, X024R-X104A, X078R-X235F, X101G-X249R, X103A-X232V, X033S-X048T, X033S-X239T, X033S-X253A, X143A-X209A, X209A-X235F, X018R-X045T, X209A-X243F, X024R-X272P, X024R-X269C, X101G-X104I, X104I-X232V, X076D-X249R, e X024R-X076D sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de

aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00011] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X020R-X076D, X024R-X045T, X230E-X249R, X018R-X045T, X018R-X245R, X101G-X232V, X024R-X232V, X232V-X245R, X024R-X101G, X018R-X104I, X018R-X103A, X101G-X249R, X232V-X249R, X103A-X232V, X076D-X245R, X101G-X104I, X104I-X232V, X076D-X249R, X024R-X076D, X024F-X116L, X020K-X024F, X020K-X062E, X033S-X118R, X024R-X086W, X024R-X118R, X024R-X086R, X209A-X241R, X024R-X241R, X024R-X235F, X118R-X209A, X078R-X118R, X033S-X235F, X024R-X174T, X086W-X209A, X008T-X024R, X086W-X118R, X033S-X241R, X024R-X243F, X024R-X209A, X033S-X086W, X024R-X033S, X086W-X243F, X033S-X201S, X024R-X239Q, X078R-X086W, X235F-X243F, X118R-X172V, X033S-X148F, X033S-X078R, X033S-X243F, X024C-X033S, X118R-X194T, X033S-X209A, X024R-X141G, X024R-X274I, X086W-X235F, X015T-X033S, X209A-X235F, X024R-X247H, X078R-X235F, X024R-X104A, X033S-X048T, X118R-X235F, X033S-X253A, X143A-X209A, X033S-X239T, X209A-X243F, X024R-X272P, e X024R-X269C, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00012] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X004R-X009A-X020R-X242R,

X020R-X043R-X241R, X020R-X242R-X269R, X004R-X009A-X020R-X043R, X004R-X020R-X249R, X018R-X024R-X244R, X009A-X022R-X212F-X241R, X020R-X043R-X269R, X018R-X024R-X242R, X004R-X009A-X043R-X241R, X020R-X043R-X244R, X020R-X022R-X242R, X004R-X020R-X043R, X004R-X009A-X020R-X043R-X242R, X020R-X043R-X242R, X020R-X043R-X242R-X249R, X020R-X212F-X249R, X004R-X009A-X241R, X001R-X009A-X043R, X020R-X043R-X249R, X009A-X020R-X043R-X241R, X020R-X022R-X043R, X020R-X249R-X269R, X020R-X022R-X241R, X004R-X009A-X024R-X043R-X241R, X009A-X043R-X078R, X004R-X020R-X024R-X244R, X020R-X022R-X078R-X242R, X020R-X024R-X242R-X249R, X004R-X009A-X078R-X241R, X009A-X043R-X078R-X242R, X004R-X020R-X024R, X009A-X043R-X212F, X020R-X043R-X212F, X024R-X078R-X212F, X009A-X020R-X024R-X043R, X009A-X022R-X043R-X078R, X020R-X022R-X212F-X241R, X020R-X043R-X212F-X241R, X009A-X043R-X241R, X020R-X043R-X271L, X020R-X022R-X078R-X241R, X020R-X024R-X043R-X242R, X020R-X022R-X043R-X241R, X009A-X020R-X043R-X212F, X004R-X009A-X020R-X024R-X242R, X020R-X043R-X249R-X271L, X020R-X022R-X024R-X242R, X009A-X022R-X078R-X212F, X020R-X043R-X242R-X271L, X009A-X022R-X078R-X212F-X241R, X004R-X020R-X024R-X249R, X020R-X022R-X271L, X020R-X022R-X043R-X212F, X004R-X020R-X024R-X043R-X242R, X004R-X020R-X024R-X043R, X004R-X009A-X022R-X078R-X212F, X020R-X022R-X078R-X212F-X241R, e X020R-X022R-X269R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00013] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de

aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X018R-X020R-X043D-X045T-X230E, X018R-X043R-X045T-X242R-X249R, X024R-X043D-X249R, X018R-X020R-X045T, X020R -X024R-X076D-X249R, X024R-X043R-X230E-X242R, X018R-X024R-X043D-X230E, X020R-X076D, X018R-X024R-X043D-X076D-X249R, X024R-X043R-X076D-X249R, X018R-X024R-X045T-X242R, X020R-X043D-X076D-X230E-X249R, X020R-X043R-X045T-X242R, X018R-X024R-X076D-X249R, X018R-X020R-X024R-X043D-X045T-X233I-X242R, X024R-X043R-X230E, X018R-X020R-X043D, X043R-X242R-X249R, X020R-X043R-X045T-X230E, X043R-X076D-X242R-X249R, X020R-X024R-X045T-X230E-X242R, X024R-X045T-X076D-X230E-X242R-X249R, X024R-X045T, X024R-X043R-X045T-X076D-X230E-X249R, X018R-X024R-X043D-X045T-X249R, X018R-X043R-X045T-X249R, X024R-X043R-X242R, X018R-X020R-X043R-X076D-X249R, X020R-X024R-X043D-X249R, X020R-X043R-X230E-X242R, X020R-X043R -X242R, X018R-X043R-X076D-X230E, X020R-X024R-X043D-X242R, X020R -X043R-X230E, X018R-X020R-X043R-X076D-X242R-X249R, X043D-X045T-X076D-X249R, X018R-X043R-X242R-X249R, X018R-X020R-X043R-X045T-X242R, X018R-X020R-X043D-X230E-X242R, X020R-X024R-X043R-X045T-X249R, X024R-X043R-X249R, X020R-X024R-X27E-X043R-X076D-X230E, X024R-X043R-X045T-X242R, X018R-X020R-X024R-X043R-X045T-X076D-X230E, X020R-X043R-X076D-X230E-X249R, X018R-X043R-X045T-X242R, X020R-X242R-X249R, X018R-X043R-X076D-X230E-X242R-X249R, X018R -X024R-X076D, X020R-X024R-X27R-X043D-X242R-X249R, X018R-X020R-X024R-X043D-X076D-X242R, X018R-X043R-X076D-X242R-X249R, X018R -X024R-X043D-X230E-X249R, X018R-X020R-X043D-X249R, X018R-X020R -X043D-X045T-X076D-X242R, X024R-X043R-X076D-X230E-X242R, X020R-X024R-X38I-X043R-X045T-X076D-X242R-X249R, X018R-X020R-X043R,

X018R-X024R-X045T-X230E-X242R, X018R-X020R-X249R, X024R-X043R-X076D, X018R-X020R-X024R-X043R-X045T-X076D-X249R, X018R-X043D-X045T-X076D-X242R-X249R, X024R-X043D-X242R-X249R, X018R-X020R-X024R-X043D-X045T-X242R, X020R-X024R-X043R-X076D, X018R-X020R-X043D-X045T-X230E-X242R, X020R-X024R-X043R-X045T-X076D-X242R-X249R, X018R-X043R-X045T-X076D-X242R, X018R-X020R-X043R-X076D-X230E-X242R, X018R-X024R-X043D-X249R, X018R-X024R-X043R-X045T-X230E-X249R, X018R-X020R-X043R-X045T-X076D-X249R, X018R-X024R-X242R, X018R-X043R-X045T-X076D-X230E-X242R, X045T-X242R-X249R, X018R-X024R-X043D-X242R, X018R-X020R-X043D-X045T-X240P, X024R-X043R-X045T-X242R-X249R, X018R-X024R-X30S-X31S-X32I-X33Q-X34V-X35F, X018R-X020R-X043R-X076D, X020R-X043D-X045T-X076D-X242R-X249R, X018R-X024R-X043D-X230E-X242R, X018R-X024R-X043D-X242R -X249R, X024R-X043D-X045T-X242R-X249R, X043R-X230E-X249R, X024R-X043R-X076D-X230E-X249R, X020R-X024R-X043D-X076D-X249R, X024R -X045T-X242R-X273V, X020R-X024R-X045T-X076D-X242R-X249R, X018R -X024R-X043D-X076D-X242R, X018R-X043R-X076D-X230E-X249R, X018R-X020R-X043R-X045T-X249R, X018R-X043R-X045T-X230E-X242R, X020R-X024R-X043D-X045T-X230E-X242R, X018R-X043D-X230E-X249R, X018R-X043R-X076D-X242R, X018R-X020R-X076D, X018R-X020R-X043D-X076D -X242R-X249R, X020R-X024R-X043D-X076D-X242R-X249R, X043D-X242R-X249R, X018R-X020R-X024R-X043R-X076D, X018R-X020R-X043D-X045T-X076D-X249R, X018R-X020R-X043R-X045T-X076D-X230E-X249R, X018R-X076D-X242R, X020R-X043R-X249R, X018R-X076D-X242R-X249R, X018R -X024R-X045T-X230E-X249R, X230E-X249R, X018R-X045T-X249R, X020R -X043R-X076D, X043R-X045T-X249R, X018R-X043D-X076D-X242R-X249R, X043R-X076D-X249R, X018R-X045T, X020R-X076D-X230E-X242R, X020R -

X024R-X043D-X045T, X024R-X043D-X076D-X242R-X249R, X020R-X045T -X249R, X043R-X076D-X153A-X249R, X043R-X076D-X230E-X249R, X018R -X043D-X076D-X249R, e X020R-X043R-X076D-X227I, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00014] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X101G-X103A-X104I-X232V-X236H-X245R-X252K, X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X248R, X101G-X103A-X104I-X159R-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248R, X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R, e X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X248D, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00015] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X101G-X103A-X104I-X129E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X188D-

X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X159E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X148I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X159E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X129E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X148I-X158E-X232V-X245R-X248D, X016S-X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X128N-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X188D-X232V-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X128N-X188D-X232V-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X128N-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X128N-

X129E-X158E-X232V-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-
X159E-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-
X128N-X129E-X232V-X238R-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-
X104I-X129E-X159E-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-
X103A-X104I-X129E-X158E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D,
X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X188D-X232V-
X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X159E-X188D-X232V-
X245R-X248D-X249R, X022A-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-
X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-
X129E-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-
X104I-X148I-X158E-X232V-X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-
X104I-X158E-X159E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-
X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-
X101G-X103A-X104I-X129E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D,
X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X188D-X232V-
X245R-X248D-X249R, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-
X159E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-
X129E-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-
X103A-X104I-X128N-X158E-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-
X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X188D-X232V-X245R-X248D,
X022A-X101G-X103A-X104I-X129E-X159E-X232V-X238R-X245R-
X248D, X101G-X103A-X104I-X129E-X159E-X232V-X245R-X248D-
X249R, X022A-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X232V-X245R-
X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X148I-X158E-
X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-X129E-
X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-
X159E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-
X104I-X129E-X158E-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-
X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X232V-X238R-X245R-
X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X128N-X159E-X188D-X232V-

X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-X159E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X159E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-X129E-X159E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X148I-X188D-X232V-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X232V-X238R-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X148I-X158E-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-X159E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X101G-X103A-X104I-X129E-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X129E-X188D-X232V-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X159E-X232V-X238R-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X129E-X159E-X232V-X238R-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X158E-

X159E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X148I-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X238R-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-X128N-X159E-X232V-X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X158E-X232V-X238R-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128N-X158E-X159E-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X128N-X158E-X159E-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X129E-X148I-X188D-X232V-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X148I-X232V-X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-X148I-X188D-X232V-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X188D-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X158E-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X148I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X148I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X148I-X159E-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D, e X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00016] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de

aminoácido selecionada a partir de: X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X232V-X238R-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X159E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X238R-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X159E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X232V-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X148I-X232V-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X148I-X158E-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X016S-X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X159E-X232V-X238R-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X101G-X103A-X104I-X129E-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X148I-X158E-X232V-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, e X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X232V-X245R-X248D, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a

sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00017] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X104L-X128N-X158E-X186H-X249R, X128N-X158E-X188D-X249R, X062E-X128N-X158E-X159E-X271F, X062E-X158E-X188D-X249R-X271F, X062E-X158E-X186H-X249R-X271F, X128N-X158E-X188D-X209E-X271F, X062E-X159E-X188D-X249R, X016S-X062E-X158E-X186H-X249R, X062E-X158E-X159E-X249R, X101A-X128N-X158E-X209E-X249R, X128N-X158E-X186H-X271F, X062E-X158E-X188D-X249R, X062E-X158E-X186H-X271F, X062E-X158E-X186H-X249R, X062E-X101A-X186H-X249R, X062E-X101A-X158E-X186H-X271F, X062E-X104L-X158E-X188D-X249R-X271F, X062E-X159E-X186H-X249R, X062E-X159E-X249R, X128N-X158E-X186H-X249R, X128N-X158E-X188D-X271F, X062E-X158E-X249R, X062E-X186H-X188D-X249R-X271F, X128N-X158E-X209E-, X062E-X101A-X158E-X249R, X104L-X128N-X158E-X186H-X271F, X062E-X101A-X158E-X186H-X249R-X271F, X016S-X062E-X158E-X249R, X062E-X101A-X159E-X249R, X128N-X158E-X186H-X188D-X271F, X101A-X128N-X158E-X186H-X271F, X062E-X101A-X188D-X249R, X101A-X104L-X158E-X186H-X188D-X249R, X062E-X159E-X249R-X271F, X128N-X158E-X159E-X271F, X016S-X062E-X104L-X158E-X186H-X271F, X022A-X128N-X158E-X249R, X128N-X158E-X249R, X062E-X101A-X104L-X158E-X186H-X271F, X016S-X062E-X158E-X186H-X271F, X104L-X128N-X158E-X249R, X104L-X128N-X158E-X188D-X249R, X022A-X062E-X158E, X062E-X101A-X188D-X249R-X271F, X062E-X158E-X249R-X271F, X104L-X128N-X158E-X186H-X188D-X271F, X062E-X101A-X186H-X271F, X062E-

X104L-X159E-X249R, X062E-X186H-X249R, X062E-X101A-X186H-X249R-X271F, X101A-X158E-X186H-X188D-X249R, X062E-X101A-X186H, X101A-X128N-X129E-X186H-X249R, X101A-X103G-X158E-X186H-X249R, X016S-X062E-X104L-X186H-X188D-X271F, X104L-X158E-X186H-X249R, X101A-X128N-X158E-X188D-X209E-X271F, X062E-X101A-X186H-X188D-X271F, X016S-X062E-X158E-X249R-X271F, X062E-X128N-X158E, X062E-X128N-X159E-X249R, X062E-X101A-X158E-X188D-X249R, X101A-X128N-X158E-X249R, X062E-X158E-X186H-X188D-X249R, X016S-X104L-X158E-X186H-X271F, X062E-X148I-X159E, X062E-X101A-X158E-X186H-X249R, X062E-X101A-X186H-X188D-X249R, X104L-X158E-X186H-X188D-X249R, X062E-X101A-X104L-X186H-X188D-X271F, X022A-X101A-X158E-X186H-X249R, X101A-X128N-X158E-X209E, X158E-X186H-X188D-X249R-X271F, X104L-X158E-X186H-X188D-X249R-X271F, X101A-X104L-X158E-X186H-X249R, X104L-X158E-X249R, X101A-X104L-X128N-X158E-X186H-X271F, X016S-X104L-X188D-X249R, X101A-X104L-X158E-X186H-X188D-X271F, X104L-X128N-X159E-X271F, X104L-X158E-X186H-X249R-X271F, X158E-X186H-X249R, X101A-X158E-X186H-X249R, X104L-X158E-X188D-X249R-X271F, X016S-X128N-X158E-X186H, X104L-X128N-X186H-X188D-X249R, X016S-X101A-X128N-X186H, X016S-X062E-X128N-X186H-X271F, X016S-X128N-X186H-X271F, X128N-X129E-X186H, X158E-X186H-X249R-X271F, X016S-X158E-X249R, X016S-X158E-X186H-X249R, X016S-X022A-X158E-X186H-X271F, X089P-X101A-X129E-X186H, X022A-X128N-X158E-X186H, X101A-X104L-X128N-X158E-X186H, X022A-X128N-X186H-X188D-, X062E-X104L-X158E-X186H-X188D-X249R, X022A-X158E-X186H-X249R-X271F, X022A-X104L-X158E-X249R, X101A-X111V-X129E, X016S-X158E-X249R-X271F, X016S-X111V-X188D-, X022A-X104L-X186H-X188D-X249R, e X104L-X148I-X188D-X249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisi-

na são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00018] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X001R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X004R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X271L, X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X004R-X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X271L, X020R-X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X024R-X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X025R-X116A-X167W, X018R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X022R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X078R-X103N-X106G-X167W-X236N, X018R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X024R-X101A-X120F-X194F-X249R, X020R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X101G-X103A-X104I-X212F-X232V-X245R, X020R-X144R-X185I-X233C-X236N, X023A-X078R-X216F-X236N-X249R, X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X101G-X103A-X104I-X115R-X232V-X245R, X052N-X078R-X103N-X148I-X213A, X018R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X024R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X024R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X025R-X089I-X116A-X239S-X270C, X024R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X148I-X213A-X252R, X024R-X025R-X183D-X192W-X239S, X046R-X194F-X212M, X104L-X217E-X224A-X249R-X252R, X023A-X091F-X121F-X192W-

X236N, X101G-X103A-X104I-X232V-X244R-X245R, X099F-X144R-X167W-X252R, X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X022W-X078R-X167W-X212M-X270C, X121F-X252R-X270C, X020R-X103N-X216F-X236N-X252R, X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X023A-X052N-X192W-X198L-X252R, X025R-X046R-X121F, X024R-X078R-X104L-X116A-X183D, X046R-X059A-X103N-X211Q-X212M, X020R-X052N-X062Q-X091F-X192W, X023A-X052N-X144R-X192W-X216F, X101G-X103A-X104I-X232V-X242R-X245R, X052N-X103N-X116A-X148I-X192W, X089I-X116A-X117F-X224A-X249R, X144R-X211Q-X238L-X239S-X249R, X043A-X062Q-X194F-X211Q, X020R-X024R-X052N-X059A-X216F, X024R-X167W-X224A-X249R, X057R-X167W-X249R, X025R-X103N-X186K-X194F-X224A, X105T-X128N-X144R-X148I-X212M, X020R-X059A-X144R-X192W-X224A, X024R-X043A-X117F-X194F-X211Q, X117F-X194F-X213A-X270C, X078R-X091F-X121F-X233C-X252R, X057R-X099F-X105T-X198L-X213A, X023A-X091F-X101A-X198L-X252R, X062Q-X103N-X121F-X144R-X249R, X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X242R-X245R, X023A-X024R-X117F-X212M-X216F, X104L-X213A-X216F, X194F-X211Q-X236N, X062Q-X103N-X117F-X194F, X024R-X062Q-X104L-X106G-X249R, X057R-X089I-X198L, X046R-X059A-X106G-X217E-X249R, X117F-X213A-X215F, X101A-X120F-X192W-X215F-X224A, X043A-X057R-X117F-X144R-X183D, X046R-X183D-X238L, X025R-X043A-X089I-X117F, X078R-X104L-X213A-X215F-X224A, X091F-X099F-X101A-X105T-X167W, X106G-X117F-X238L, X046R-X089I-X091F-X101A-X116A, X020R-X062Q-X089I-X186K-X212M, X057R-X099F-X121F-X185I-X192W, X046R-X089I-X192W-X233C-X270C, X089I-X117F-X185I-X215F-X233C, X052N-X104L-X183D-X216F-X249R, X078R-X099F-X116A-X186K-X224A, X025R-X105T-X128N-X144R-X270C, X105T-X211Q-X216F, X024R-X046R-X091F-X121F, X106G-X185I-X216F-

X236N, X062Q-X101A-X236N-X252R-X270C, X025R-X043A-X091F-X198L-X270C, X020R-X023A-X104L-X192W-X233C, X024R-X043A-X105T-X106G-X198L, X020R-X089I-X217E, X024R-X091F-X198L-X215F-X239S, X046R-X089I-X099F-X186K-X212M, X104L-X120F-X186K-X216F-X252R, X022W-X194F-X213A-X233C-X238L, X099F-X105T-X106G-X194F-X212M, X089I-X105T-X116A-X215F-X216F, X025R-X116A-X120F-X224A-X270C, X043A-X059A-X101A-X216F-X224A, X057R-X183D-X236N, X025R-X062Q-X128N-X144R-X185I, X103N-X120F-X167W-X198L-X233C, X022W-X089I-X216F, X024R-X106G-X116A-X212M-X224A, X020R-X052N-X101A-X198L-X233C, X089I-X091F-X185I-X211Q-X270C, X111I-X215F-X239S, X024R-X116A-X186K-X233C-X236N, e X023A-X103N-X106G-X212M-X215F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00019] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X020R-X022W-X078R-X101A-X103A-X104I-X116S-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X024R-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X022W-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X232V-X245R, X020R-X22W-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X232V-X245R, X018R-X104I-X232V-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X211Q-X249R, X018R-X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X018R-X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R,

X018R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R,
X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-
X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X043D-
X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X024R-X045T-
X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-
X103A-X232V-X249R, X018R-X101G-X104I-X232V-X245R, X020R-
X024R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R-X249R, X018R-
X22K-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043R-X045T-
X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X22W-X101G-
X103A-X104I-X211Q-X232V-X245R, X024R-X076D-X078R-X101G-
X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X22W-X078R-X101A-
X103A-X104I-X116A-X183D-X232V, X018R-X024R-X076D-X116A-
X215F-X249R, X018R-X043R-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-
X245R, X024R-X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R,
X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X022W-
X101G-X103A-X104I-X211Q-X232V-X245R, X020R-X022W-X078R-
X101G-X103A-X104I-X116A-X213A-X215F-X232V-X245R, X043D-
X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-
X024R-X076D-X101A-X116A-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-
X116A-X211Q-X249R, X043R-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-
X104I-X232V-X245R, X018R-X101G-X245R, X020R-X22W-X101A-
X103A-X104I-X211Q-X213A-X232V-X245R, X020R-X024R-X043D-
X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X045T-
X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X078R-
X101G-X103A-X104I-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X045T-
X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X024R-X043D-
X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X101G-X103A-
X249R, X018R-X22W-X024R-X076D-X101A-X116A-X232V-X245R,
X018R-X101G-X104I-X232V-X249R, X020R-X22W-X101A-X103A-
X104I-X215F-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X211Q-X213A-

X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X101G-X104I-X213A-X215F-X232V-X245R, X020R-X101G-X103A-X104I-X116A-X215F-X232V-X245R, X024R-X103A-X104I-X249R, X018R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X024R-X101G-X104I-X245R, X020R-X101G-X103A-X104I-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X024R-X103A-X104I-X232V-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X211Q-X215F-X249R, X018R-X245R, X024R-X103A-X245R, X024R-X103A-X104I-X245R, X020R-X078R-X101G-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X104I-X249R, X018R-X024R-X104I-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X211Q-X215F-X249R, X019H-X020R-X022W-X078R-X101G-X103A-X104I-X211Q-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X22W-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X103A-X104I-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X215F-X249R, X018R-X024R-X101G-X104I-X232V, X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X024R-X043R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X020R-X043D-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X22W-X024R-X076D-X116A-X213A-X249R, X018R-X024R-X101G-X104I, X020R-X101A-X103A-X104I-X215F-X232V-X245R, X018R-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X101G-X103A-X245R, X043R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X211Q-X215F-X232V-X245R, X020R-X22W-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X213A-X215F-X232V-X245R, X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-X215F-

X232V-X245R, X020R-X022W-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X232V-X245R, X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X22W-X101A-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X101G-X103A-X232V-X245R, X020R-X022W-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X232V-X245R, X018R-X020R-X024R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X043R-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X101G-X104I-X249R, X020R-X22W-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X232V-X245R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X198L-X211Q-X213A-X232V-X245R, X020R-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X232V-X245R, X024R-X076D-X104I-X232V-X245R, X018R-X020R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101G-X104I-X232V-X249R, X018R-X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X001T-X018R-X024R-X076D-X116A-X213A-X249R, X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X232V-X245R, X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X076D-X101G-X104I-X232V-X245R, X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-X211Q-X213A-X215F-X249R, X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X022W-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X232V-X245R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X232V-X245R, X020R-X101G-X198L-X215F-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X213A-X215F-X249R, X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X211Q-X232V-X245R, X020R-X022W-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X215F-X232V-X245R, X020R-X022W-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X232V-X245R, X024R-X232V-X245R, X018R-

X024R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X024R-X076D-X101A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X213A-X249R, X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X213A-X215F-X249R, X043D-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X020R-X022W-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X215V-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X211Q-X249R, X020R-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X22W-X101A-X103A-X104I-X211Q-X215F-X232V-X245R, X024R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X101G-X103A-X104I-X116A-X232V-X245R, X018R-X22W-X024R-X076D-X198L-X215F-X249R, X020R-X022W-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X211Q-X213A-X232V-X245R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X043R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X22W-X024R-X076D-X101A-X215F-X249R, X020R-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-X180A-X232V-X245R, X020R-X022W-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X215F-X232V-X245R, X018R-X101G-X103A-X104I, X020R-X22W-X101A-X103A-X104I-X116A-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X103A-X232V-X245R, X020R-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X211Q-X249R, X020R-X101A-X103A-X104I-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X020R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X211Q-X232V-X245R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X211Q-X215F-X232V-X245R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X211Q-

X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X232V-X249R, X018R-X024R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X076D-X245R, X024R-X104I-X245R, X101G-X232V, X020R-X22W-X101A-X103A-X104I-X116A-X211Q-X215F-X232V-X245R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X213A-X249R, X020R-X022W-X078R-X101A-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X022W-X078R-X101A-X103A-X104I-X198L-X232V-X245R, X024R-X245R-X249R, X020R-X101G-X103A-X104I-X116A-X211Q-X232V-X245R, X018R-X22W-X024R-X076D-X116A-X211Q-X249R, X024R-X101G-X104I-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X104I, X020R-X022W-X078R-X101A-X103A-X104I-X183D-X198L-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X020R-X22W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X213A-X249R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X232V-X245R, X012H-X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-X198L-X211Q-X213A-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-X211Q-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X213A-X249R, X024R-X104I-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X211Q-X249R, X018R-X076D-X103A-X104I-X249R, X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-X183D-X211Q-X213A-X232V-X245R-X271G, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X215F-X249R, X018R-X024R-X043D-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-X198L-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X213A-X215F-X249R, X020R-X043D-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X22W-X024R-X076D-X101A-X116A-X215F-X249R, X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X022W-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-

X116A-X211Q-X213A-X215F-X249R, X024R-X103A-X175L-X232V-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X213A-X249R, X020R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X024R-X043R-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X213A-X215F-X249R, X043R-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X245R, X020R-X024R-X043D-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X024R-X232V, X020R-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X232V-X245R, X024R-X076D-X101G-X232V-X245R, X018R-X076D-X101G-X103A-X104I-X249R, X018R-X024R-X076D-X198M-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X22W-X024R-X076D-X101A-X198L-X215F-X249R, X018R-X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X022W-X103A-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X020R-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X232V-X245R, X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X22W-X024R-X076D-X101A-X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X198L-X215F-X249R-X268G, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X211Q-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X211Q-X249R, X101G-X103A-X104I-X245R, X018R-X076D-X101G-X232V-X245R, X018R-X020R-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X198L-X213A-X249R, X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X020R-X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X043D-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X024R-X103A-X232V, X018R-X024R-X076D-X101A-X211Q-X249R,

X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X043R-X045T-X076D-X076T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X273T, X018R-X020R-X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X078R-X101A-X103A-X104I-X183D-X215F-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101G-X232V, X232V-X245R, X043R-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X234I-X245R, X024R-X076D-X103A-X104I-X245R, X020R-X078R-X101A-X103A-X104I-X211Q-X213A-X232V-X245R, X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R-X272V, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X249R, X018R-X103A-X104I-X232V, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X215F-X232V-X245R, X024R-X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X022W-X024R-X076D-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X211Q-X213A-X249R, X020R-X22W-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X232V-X245R, X020R-X022W-X078R-X101G-X103A-X104I-X211Q-X213A-X232V-X245R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X215F-X232V-X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X183D-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X117I-X183D-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X213A-X249R, X018R-X22W-X024R-X076D-X101A-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X198L-X232V-X245R, X018R-X043R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X024R-X076D-X116A-X198L-X209H-X213A-X249R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X232V-X245R, X024R-X076D-X101G-X175L-X232V-X245R, X018R-X043D-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X078R-X101A-X103A-

X104I-X116A-X183D-X198L-X215F-X232V-X245R, X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X024R-X076D-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X198L-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X215F-X249R, X024R-X076D-X104I-X245R, X027R-X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X024R-X076D-X116A-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X198L-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X043D-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043R-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X22W-X024R-X076D-X116A-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X211Q-X215F-X249R, X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X232V-X245R, X018R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X101G-X104I, X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X020R-X078R-X101A-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X249R, X018R-X024R-X076D-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X076D-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X211Q-X213A-X249R, X020R-X022W-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X114T-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X22W-X024R-X076D-X116A-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X249R,

X020R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X232V-X245R,
X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X211Q-X213A-X249R, X018R-
X022K-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X101G-
X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X078R-X101G-X103A-
X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X232V, X018R-X024R-
X076D-X116A-X249R, X020R-X024R-X076D-X101G-X103A-X104I-
X232V-X245R, X043D-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-
X269R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X211Q-X249R,
X018R-X022W-X024R-X076D-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-
X043D-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R,
X020R-X22W-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X215F-
X232V-X245R, X020R-X101G-X103A-X104I-X183D-X211Q-X232V-
X245R-, X018R-X024R-X076D-X101A-X198L-X213A-X249R, X018R-
X024R-X076D-X101A-X198L-X249R, X018R-X024R-X045T-X076D-
X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X024R-X076D-
X101A-X183D-X213A-X249R, X018R-X043D-X076D-X078R-X101G-
X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-
X116A-X131V-X183D-X213A-X232V-X245R, X018R-X045T-X076D-
X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-
X183D-X211Q-X249R, X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-
X249R, X024R-X101G-X245R, X024R-X076D-X101G-X245R, X076D-
X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X020R-
X024R-X076D-X101A-X183D-X211Q-X215F-X249R, X024R-X101G,
X018R-X22W-X024R-X076D-X213A-X215F-X249R, X020R-X043D-
X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X022W-X101G-X103A-
X104I-X183D-X198L-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X043D-
X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X043D-X076D-
X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X024R-X045T-X076D-
X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X022W-X101A-
X103A-X104I-X198L-X211Q-X215F-X232V-X245R, X020R-X022W-

X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X215F-X232V-X245R, X018R-X020R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X215F-X249R, X018R-X104I, X018R-X024R-X076D-X116A-X198L-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X088I-X101A-X116A-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X211Q-X213A-X249R, X043R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X076D-X101G-X104I-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X213A-X215F-X249R, X018R-X22W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X215F-X249R, X018R-X020R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R-X269R, X024R-X076D-X245R, X018R-X020R-X043R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X211Q-X215F-X249R, X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X22W-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X215F-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X043R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X043R-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X213A-X249R, X020R-X022W-X101A-X116A-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X043R-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X218S-X232V-X245R, X018R-X103A, X020R-X22W-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X215F-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X211Q-X213A-X249R, X024R-X043R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X232V-X245R, X020R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X027R-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R,

X020R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R,
X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X183D-X213A-X215F-X249R,
X018R-X024R-X076D-X104I, X101G-X103A-X104I-X232V-X249R,
X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X249R, X018R-X020R-
X024R-X076D-X116A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-
X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X198L-X211Q-
X249R, X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R-
X275S, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-
X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-
X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-
X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-
X183D-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X198L-X213A-X249R,
X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X211Q-X249R, X004M-
X018R-X024R-X076D-X116A-X198L-X211Q-X213A-X249R, X104I-
X232V-X249R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-
X211Q-X215F-X232V-X245R, X020R-X101A-X103A-X104I-X116A-
X183D-X211Q-X232V-X245R-X274I, X020R-X101A-X103A-X104I-
X213A-X232V-X245R, X020R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-
X211Q-X213A-X232V-X245R, X020R-X024R-X043D-X078R-X101G-
X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X103A-X249R,
X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X215F-
X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X249R,
X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X198L-X215F-X249R, X018R-
X024R-X076D-X101A-X211Q-X213A-X215F-X249R-X270V, X018R-
X043D-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-
X269R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X183D-X232V-X245R,
X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X213A-X249R,
X018R-X022W-X024R-X076D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-
X022W-X024R-X076D-X198L-X213A-X249R, X020R-X022W-X101G-
X103A-X104I-X116A-X183D-X232V-X245R, X018R-X22W-X024R-

X076D-X116A-X198L-X213A-X249R, X043R-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X024R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V, X101G-X249R, X024R-X076D-X101G-X103A-X104I-X175L-X249R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X232V-X245R-X269S, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X213A-X215F-X249R-X260K, X018R-X024R-X076D-X116A-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X198L-X249R, X024R-X076D-X101G-X103A-X104I-X245R, X024R-X076D-X103A-X249R, X018R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X024R-X076D-X198L-X211Q-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X213A-X249R, X020R-X024R-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X043D-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X272D, X018R-X024R-X076D-X116A-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X198L-X249R, X024R-X076D-X101G-X103A-X232V, X024R-X103A-X104I, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X215F-X249R, X024R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X020R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X232V-X245R, X024R-X043D-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X183D-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X020R-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X211Q-X215F-X249R, X020R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X215F-X232V-X245R, X018R-X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X024R-X076D-X198L-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X213A-X249R, X020R-X043D-X101G-

X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X024R-X076D-X103A-X245R,
X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X211Q-X213A-X215F-
X249R, X103A-X104I-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X211Q-
X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-
X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X198L-X211Q-X213A-X249R,
X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R,
X018R-X020R-X043D-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-
X245R-X269R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X211Q-
X213A-X215F-X249R, X016T-X043R-X045T-X076D-X101G-X103A-
X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-
X215F-X249R, X043R-X076D-X101G-X103T-X104I-X232V-X245R-
X249R-X269R, X020R-X078R-X101A-X103A-X104I-X115E-X116A-
X183D-X211Q-X213A-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X198L-
X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X249R, X020R-
X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X232V-X245R, X018R-
X024R-X076D-X101G, X076D-X101G-X232V-X245R, X018R-X076D-
X101G-X103A-X104I-X245R, X018R-X045T-X101G-X103A-X104I-
X232V-X245R-X249R, X018R-X024R-X076D-X215F-X249R, X018R-
X104I-X232V, X043D-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-
X232V-X245R, X024R-X076D-X101G-X232V-X249R, X103A-X232V-
X245R, X020R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-
X215F-X232V-X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X183D-
X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-
X198L-X211Q-X215F-X249R, X024R-X076D-X103A-X104I-X249R,
X024R-X101G-X103A-X104I, X020R-X101G-X103A-X104I-X116A-
X183D-X211Q-X215F-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-
X101A-X116A-X183D-X215F-X249R, X020R-X022W-X101G-X103A-
X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X020R-
X024R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-
X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X213A-X249R, X018R-X020R-

X024R-X076D-X131T-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X198L-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X211Q-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043R-X101G-X103A-X104I-X245R-X249R, X018R-X076D-X232V-X249R, X018K-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R-X269R, X018R-X020R-X024R-X043D-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X213A-X215F-X249R-X267I, X232V-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X211Q-X213A-X215F-X249R, X076D-X104I-X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X183D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X211Q-X213A-X249R, X024R-X101G-X103A-X232V, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X215F-X249R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X215F-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X116A-X198L-X211Q-X249R, X103A-X232V-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X249R, X018R-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X020R-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X198L-X213A-X215F-X249R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X232V-X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X198L-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-

X101A-X116A-X211Q-X249R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X232V-X245R-X274I, X024R-X103A-X245R-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X213A-X249R, X018R-X043D-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X213A-X249R, X043D-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X024R-X076D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X183D-X213A-X249R, X103A-X232V, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X249R, X018R-X043R-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X211Q-X215F-X249R, X043R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X198L-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X211Q-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X198L-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X198L-X211Q-X249R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X232V-X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X215F-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X249R, X018R-X024R-X076D-X232V, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X249R, X020R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R,

X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X232V-X245R-X263S, X024R-X076D-X101G-X104I-X232V-X249R, X043R-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X024R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X198L-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X197A-X213A-X215F-X249R, X024R-X101G-X103A, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X211Q-X215F-X249R, X043R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X024R-X104I-X232V, X018R-X024R-X076D-X183D-X211Q-X249R, X020R-X043R-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X150T-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X211Q-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X249R, X024R-X076D-X232V-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116T-X198L-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X022R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X249R, X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X183D-X211Q-X249R, X020R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X232V-X245R, X076D-X101G-X103A-X245R, X020R-X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X249R, X018R-X22W-X024R-X076D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X183D-X211Q-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-

X116A-X183D-X213A-X249R, X043R-X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X249R, X076D-X101G-X104I-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X198L-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X249R, X020R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X249R, X018R-X020R-X024R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X020R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X209H-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X198L-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X076D-X245R, X076D-X101G-X104I-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X211Q-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X211Q-X213A-X249R, X020R-X024R-X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X215F-X249R, X020R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X215F-X232V-X245R, X101G-X103A-X104I, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X204D-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X198L-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-

X211Q-X213A-X209V-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X043R-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X198L-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X211Q-X215F-X249R-X269D, X018R-X020R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X213A-X249R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X183D-X215F-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X209H-X211Q-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X249R, X076D-X232V-X245R, X043D-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X198L-X211Q-X215F-X245R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X213A-X249R, X020R-X024R-X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X215F-X249R, X020R-X090S-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X183D-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-

X211Q-X213A-X249R, X043D-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X213A-X249R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X020R-X024R-X043D-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X043D-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X076D-X103A-X104I-X232V-X245R, X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X211Q-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X043D-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X076D-X103A-X104I-X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X249R, X018R-X024R-X076D-X101G-X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X213A-X215F-X249R, X043R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X198L-X213A-X215F-X249R, X076D-X104I-X232V-X245R, X027R-X043R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X103A-X104I-X135I-X232V, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X183D-X198L-X211Q-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X249R,

X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R,
X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X249R, X005S-X018R-X022W-
X024R-X076D-X101A-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-
X116A-X183D-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X198L-
X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-
X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X249R,
X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X249R, X018R-
X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X213A-X249R,
X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X211Q-X213A-X249R,
X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X198L-X249R, X018R-X024R-
X076D-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-
X116A-X183D-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-
X198L-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X198L-
X211Q-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X249R,
X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X215F-X249R,
X018R-X020R-X043D-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-
X245R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X183D-X198L-X215F-
X232V-X245R, X076D-X101G-X103A-X104I-X249R, X018R-X020R-
X024R-X076D-X183D-X198L-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-
X024R-X076D-X101A-X183D-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-
X076D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-
X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-
X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X211Q-X243D-X249R, X018R-
X020R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R,
X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X198L-X211Q-X213A-X249R,
X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-
X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X198L-X211Q-X213A-
X215F-X249R, X024R-X076D-X101G, X018R-X020R-X024R-X076D-
X101A-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-
X116A-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-

X183D-X215F-X249R, X018R-X043D-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X213A-X245R, X020R-X024R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X020R-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X211Q-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X198L-X211Q-X215F-X249R-X269S, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X183D-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X086V-X101A-X183D-X198L-X211Q-X249R, X018R-X076D-X101G-X198T-X232V, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X249R-X248T, X018R-X076D-X104I-X245R-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X249R, X043R-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X043R-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X076D-X101G-X104I, X020R-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X043D-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X249R, X018R-X076D-X104I, X018R-X020R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-

X020R-X022W-X024R-X076D-X183D-X211Q-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X101G-X104I, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X183D-X215F-X249R-X263D, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X198L-X215F-X249R-X269H, X018R-X043D-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X183D-X198L-X213A-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X249R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X104I-X232V, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X249R, X043D-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X211Q-X249R, X018R-X020R-X043R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X024R-X043R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X043R-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X166F-X176P-X179V-X184T-X187P-

X194P, X018R-X022W-X024R-X041E-X076D-X101A-X160T-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X198L-X213A-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X183D-X211Q-X215F-X249R, X024R-X076D-X104I, X018R-X076D-X101G-X232V, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X215F-X249R, X018R-X024R-X031F-X076D-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X213A-X249R-X269S, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X215F-X249R, X018R-X043R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X114T-X198L-X211Q-X215F-X249R, X024R-X043R-X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X024R-X076D-X103A-X104I-X232V, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X215F-X249R, X101G-X104I-X232V, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X198L-X211Q-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X183D-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X211Q-X213A-X249R, X018R-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X215F-X249R-X260A, X076D-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X213A-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-

X101A-X183D-X249R, X076D-X104I-X249R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X024R-X043R-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X183D-X198L-X215F-X249R, X018R-X076D-X101G-X103A, X020R-X024R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X249R, X101G-X103A-X232V, X024R-X076D-X101G-X232V, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X211Q-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X183D-X198L-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X211Q-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X156V-X183D-X211Q-X215F-X249R-X269S, X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X249R, X018R-X076D-X101G, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X211Q-X249R, X018R-X076D-X232V, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X232V-X245R, X018R-X043D-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X211Q-X213A-X237D-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X249R-X275S, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X024R-X076D, X018R-X024R-X076D-X183D-X211Q-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X213A-X215F-X249R, X076D-X104I-X232V-X249R, X018R-X076D-

X103A-X232V, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X183D-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X175E-X183D-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R-X273E, X020R-X024R-X043D-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X005S-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X103A-X104I-X232V, X018R-X020R-X024R-X068A-X076D-X101A-X116A-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X215F-X249R-X275S, X018R-X024R-X076D-X183D-X198L-X211Q-X213A-X249R, e X043D-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00020] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X018R-X024R-X043R-X076D-X249R-X269R, X018R-X022R-X024R-X043R-X076D-X249R, X018R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X022R-X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043R-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X022R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X043R-X076D-X249R, X018R-X024R-X076D-X242R-X249R, X018R-X024R-X076D-X249R-

X269R, X018R-X022R-X024R-X076D-X249R, X018R-X024R-X076D-X078R-X249R, X018R-X024R-X043D-X076D-X249R-X269R, X018R-X022R-X024R-X043D-X076D-X249R, X018R-X024R-X043D-X076D-X078R-X249R, X020R-X101G-X103G-X104I-X232V-X245R, X020R-X101G-X103A-X104L-X232V-X245R, X020R-X101G-X103A-X104V-X232V-X245R, X020R-X101G-X103S-X104I-X232V-X245R, X020R-X101G-X103S-X104L-X232V-X245R, X020R-X101S-X103S-X104I-X232V-X245R, X020R-X101S-X103S-X104L-X232V-X245R, X020R-X101A-X103A-X104L-X232V-X245R, X020R-X101S-X103S-X104V-X232V-X245R, X020R-X101S-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X101S-X103G-X104I-X232V-X245R, X020R-X101S-X103G-X104V-X232V-X245R, X020R-X101A-X103A-X104V-X232V-X245R, X020R-X101A-X103S-X104I-X232V-X245R, X020R-X101A-X103S-X104V-X232V-X245R, X018R-X024R-X043R-X076D-X078R-X249R, X024R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X024R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X242R-X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X217E-X249R, X018R-X024R-X043R-X076D-X217E-X249R, X018R-X024R-X043D-X076D-X242R-X249R, X018R-X020R-X024R-X043R-X076D-X249R, X020R-X101A-X103G-X104V-X232V-X245R, X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X217E-X249R-X269R, e X018R-X024R-X076D-X217E-X242R-X249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00021] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de

aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X020R-X101A-X103A-X104I-X118R-X232V-X245R, X020R-X024R-X116A-X213A, X043R-X101A-X116A-X215F-X269R, X024R-X043R-X101A-X116A, X024R-X043R-X101A-X116A-X215F-X269R, X020R-X101G-X103A-X104I-X215F-X232V-X245R, X043R-X101A-X269R, X024R-X043R-X116A-X213A-X269R, X020R-X024R-X043R-X045T-X101A-X213A, X024R-X043R-X116A-X215F-X269R, X020R-X024R-X213A-X215F, X020R-X116A-X269R, X024R-X116A-X213A-X269R, X043R-X101A-X116A-X269R, X101G-X103A-X104I-X116A-X213A-X232V-X245R-X269R, X024R-X043R-X045T-X101A-X116A-X215F-X269R, X020R-X043R-X101A-X269R, X101A-X103A-X104I-X213A-X232V-X245R-X269R, X024R-X215F-X269R, X043R-X101A-X116A-X213A-X215F-X269R, X043R-X101A-X213A-X269R, X020R-X024R-X043R-X045T-X116A-X213A, X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X024R-X043R-X045T-X101A-X116A-X213A-X269R, X024R-X043R-X045T-X269R, X020R-X043R-X045T-X101A-X269R, X024R-X043R-X116A-X269R, X020R-X024R-X043R-X045T, X043R-X116A-X269R, X024R-X043R-X101A-X215F-X269R, X024R-X043R-X045T-X213A-X215F-X269R, X020R-X024R-X045T-X269R, X020R-X043R-X101A-X116A-X213A-X215F, X020R-X101G-X103A-X104I-X213A-X215F-X232V-X245R, X020R-X024R-X045T-X116A-X269R, X020R-X101A-X116A-X269R, X024R-X043R-X215F, X020R-X024R-X213A, X024R-X043R-X101A-X215F, X020R-X024R-X043R-X045T-X116A, X020R-X024R-X043R-X045T-X101A-X269R, X020R-X024R-X101A-X215F, X020R-X024R-X116A-X213A-X215F, X020R-X024R-X116A, X020R-X024R-X101A-X116A, X043R-X213A-X215F-X269R, X024R-X101A-X269R, X024R-X043R-X116A-X215F, X020R-X038A-X043R-X101A, X020R-X024R-X116A-X215F, X024R-X043R-X101A-X213A, X014L-X020R-X024R-X043R-X045T-X101A-X215F, X020R-X024R-X215F, X020R-X116A-X215F-

X269R, X020R-X045T-X116A-X269R, X020R-X024R-X043R-X045T-X215F, e X020R-X024R-X043R-X045T-X116A-X213A-X215F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00022] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X043R-X076D-X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X024R-X043R-X076D-X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F-X271F, X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X076D-X101G-X103A-X104I-X114V-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X024R-X076D-X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X024R-X043R-X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X043R-X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101A-X103A-X104I-X158E-X166D-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X076D-X101G-X103A-X104I-X128L-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, e X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X158E-X166D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00023] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas

maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X022A-X101G-X103A-X104I-X159D-X217E-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X043R-X101G-X103A-X104I-X159D-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X101G-X103A-X104I-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D-X271F, X043R-X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X043R-X076D-X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X183D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X076D-X101G-X103A-X104I-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X076D-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X076D-X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X043R-X101A-X103A-X104I-X158E-X166D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X076D-X101A-X103A-X104I-X158E-X166D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X076D-X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101A-X103A-X104I-X158E-X166D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X043R-X076D-X101A-X103A-X104I-X158E-X166D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X101G-X103A-X104I-X158E-X166D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X076D-X101A-X103A-X104I-X158E-X166D-X188D-X232V-

X245R-X248D-X249R-X271F, X101G-X103A-X104I-X158E-X183D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128L-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X076D-X101G-X103A-X104I-X158E-X166D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X043R-X076D-X101A-X103A-X104I-X158E-X166D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, e X076D-X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00024] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X017R-X022A-X076D-X101G-X103A-X104I-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X043R-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X101G-X103A-X104I-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X017R-X022A-X076D-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X076D-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X022A-X101G-X102A-X103A-X104I-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D-X271F, e X022A-X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00025] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de

aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X101S-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101S-X103G-X104V-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103S-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101A-X103A-X104L-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103G-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101S-X103G-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101S-X103S-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101S-X103S-X104V-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101A-X103S-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101A-X103S-X104I-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101S-X103A-X104I-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104L-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101A-X103A-X104L-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101A-X103S-X104L-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103S-X104L-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101S-X103A-X104L-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101A-X103G-X104V-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, e X101S-X103A-X104V-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00026] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X026F-X051W-X104L-X106E, X026F-X031F-X078N-X102A-X160D, X020K-X100S-X116L-X158E-X166D-X243F, X033S-X043W-X218D-X239G-X243F, X022L-X038F-

X048R-X062E-X100S-X186K, X101D-X103N-X116L-X144R-X215D, X104L-X105T-X213A-X217E-X256N, X043W-X101D-X212M-X243F, X026F-X048R-X105T-X213A-X218D-X224A, X024F-X101D-X118R-X215D-X250I-X272F, X121F-X185E-X224A-X239G, X022L-X031F-X102A-X128D-X224A-X243F, X062E-X078N-X102A-X116L-X144R-X250I, X022L-X038F-X121F-X160D-X272F, X026F-X078N-X159C-X186K-X243F, X024F-X048R-X118R-X166D-X217E, X023A-X038F-X078N-X100S-X212M-X215D, X100S-X116L-X158E-X213A, X078N-X104L-X118R-X128D, X102A-X103N-X105T-X194E, X022L-X078N-X128D-X213A, X027R-X100S-X118R-X160D-X188D-X243F, X024F-X102A-X186K-X213A-X217E-X243F, X033S-X105T-X188D-X216F, X023A-X100S-X194E-X212M, X048R-X128D-X185E-X239G, X020K-X024F-X033S-X129E-X194E, X020K-X027R-X129E-X166D-X239G, X022L-X023A-X027R-X101D-X104L-X216F, X033S-X118R-X129E-X194E-X239G, X022L-X078N-X116L-X129E-X256N, X027R-X101D-X103N-X105T-X272F, X048R-X078N-X116L-X185E-X217E-X239G, X023A-X024F-X027R-X062E, X024F-X103N-X104L-X118R-X188D, X026F-X104L-X256N-X272F, X024F-X043W-X104L-X121F-X129E, X062E-X078N-X116L-X224A, X023A-X024F-X051W-X158E, X027R-X038F-X102A-X116L, X062E-X078N-X144R-X212M, X031F-X116L-X256N-X272F, X022L-X033S-X104L-X116L-X160D-X186K, X024F-X118R-X129E-X186K-X213A, X043W-X105T-X213A-X215D-X216F, X031F-X105T-X186K-X188D, X026F-X194E-X213A-X256N, e X103N-X160D-X250I-X256N, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00027] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de

aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X022A-X024R-X101D-X103A-X104I-X118R-X159D-X188D-X232V-X248D-X271F, X022A-X024R-X103A-X104I-X129E-X159D-X188D-X232V-X248D-X271F, X022A-X024R-X103A-X104I-X118R-X159D-X188D-X217D-X232V-X248D, X022A-X024R-X101D-X103A-X104I-X118R-X129E-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101D-X103A-X104I-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X043R-X103A-X104I-X118R-X129E-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X043R-X103A-X104I-X118R-X128I-X129E-X159D-X188D-X232V-X248D, X022A-X043R-X101D-X103A-X104I-X118R-X129E-X159D-X188D-X232V-X248D-X271F, X022A-X024R-X043R-X101D-X103A-X104I-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X103A-X104I-X159D-X188D-X232V-X248D, X022A-X024R-X103A-X104I-X118R-X129E-X159D-X188D-X232V-X248D-X271F, X022A-X024R-X103A-X104I-X159D-X188D-X217D-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X043R-X062E-X103A-X104I-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X043R-X103A-X104I-X129E-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X103A-X104I-X159D-X188D-X217D-X232V-X248D-X271F, X022A-X103A-X104I-X118R-X159D-X188D-X217D-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101D-X103A-X104I-X118R-X128I-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X043R-X103A-X104I-X159D-X188D-X217D-X232V-X248D-X271F, X022A-X043R-X103A-X104I-X118R-X159D-X188D-X217D-X232V-X248D-X271F, X022A-X043R-X103A-X104I-X118R-X159D-X188D-X232V-X248D-X271F, X022A-X103A-X104I-X128I-X129E-X159D-X188D-X232V-X248D-X271F, X022A-X103A-X104I-X159D-X188D-X217D-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X043R-X103A-X104I-X128I-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X101D-X103A-X104I-X118R-X159D-X188D-X217D-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X103A-

X104I-X118R-X129E-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X024R-X043R-X103A-X104I-X118R-X159D-X188D-X217D-X232V-X248D, X022A-X062E-X103A-X104I-X118R-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X043R-X101D-X103A-X104I-X118R-X129E-X159D-X188D-X217D-X232V, X022A-X024R-X103A-X104I-X159D-X188D-X217D-X232V-X248D, X022A-X024R-X043R-X103A-X104I-X118R-X128I-X129E-X159D-X188D-X217D-X232V-X248D-X271F, e X022A-X103A-X104I-X118R-X159D-X188D-X217D-X232V-X245R-X248D-X271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00028] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X020K-X024F-X062E-X188D-X239G, X024F-X062E-X116L-X239G, X020K-X023A-X062E-X188D, X020K-X023A-X024F-X062E-X118R-X188D-X213A, X020K-X043W-X062E-X116L-X188D-X213A-X239G, X023A-X062E-X116L-X118R, X023A-X024F-X062E-X116L-X118R, X024F-X116L, X024F-X062E-X188D-X213A, X023A-X062E-X116L-X118R-X188D-X239G, X020K-X024F-X062E, X020K-X043W-X062E-X116L-X239G, X024F-X062E-X116L-X213A-X239G, X020K-X024F-X043W-X062E-X116L-X213A, X020K-X023A-X024F-X062E-X116L-X188D-X213A, X024F-X062E-X188D-X239G, X023A-X043W-X062E-X116L-X118R-X213A, X062E-X188D-X239G, X020K-X024F-X062E-X239G, X024F-X116L-X118R-X188D-X239G, X020K-X023A-X062E-X116L-X118R-X213A, X020K-X023A-X024F-X062E-X188D-X213A-X239G, X024F-X043W-X118R-X188D, X023A-X024F-X116L-X118R-X188D-X213A, X020K-X023A-

X043W-X116L-X188D-X213A-X239G, X023A-X024F-X116L-X188D-X239G, X023A-X043W-X116L-X118R-X188D, X023A-X024F-X118R-X188D-X239G, X023A-X024F-X043W-X062E-X116L-X118R, X020K-X043W-X188D-X213A, X024F-X062E-X118R-X239G, X023A-X043W-X188D-X213A, X020K-X024F-X043W-X062E-X116L-X118R-X188D-X239G, X020K-X116L-X188D-X239G, X020K-X043W-X062E-X118R, X020K-X043W-X116L-X188D-X213A, X020K-X024F, X023A-X043W-X116L-X239G, X023A-X024F-X043W-X116L-X118R-X188D-X239G, X020K-X023A-X043W-X213A, e X023A-X024F-X062E-X118R-X213A-X239G, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00029] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X020K-X023A-X043W-X118R-X128I-X129E-X159D-X188D, X024F-X118R-X128I-X129E-X159D, X020K-X024F-X062E-X116L-X118R-X188D, X020K-X062E-X116L-X188D, X062E-X116L-X118R-X213A, X020K-X023A-X062E-X116L-X188D, X062E-X116L-X118R-X188D, X020K-X062E-X116L-X213A, X020K-X023A-X062E-X116L, X020K-X062E-X188D-X213A, X020K-X062E, X020K-X024F-X062E-X116L-X188D, X020K-X043W-X062E-X116L-X188D, X020K-X024F-X062E-X188D-X213A, X062E-X116L-X188D-X213A, X020K-X062E-X116L, X020K-X023A-X062E-X116L-X188D-X213A, X023A-X024F-X062E-X116L-X213A, X022A-X043R-X103A-X104I-X128I-X129E-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X043R-X103A-X104I-X118R-X128I-X129E-X159D-X188D-X232V-X248D-X271F, X024F-X062E-X116L-X188D, X022A-X024R-

X103A-X104I-X118R-X128I-X129E-X159D-X188D-X232V-X248D, X023A-X062E-X116L-X188D, X043W-X062E-X116L, X020K-X023A-X116L-X188D, X043W-X062E-X116L-X188D, X024F-X062E-X116L, X062E-X116L-X188D, e X022A-X024R-X103A-X104I-X128I-X159D-X188D-X232V-X248D, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00030] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X087R-X101G-X103A-X104I-X109R-X212P-X232V-X245R-X271V, X101G-X103A-X104I-X109R-X232V-X245R, X101G-X103A-X104I-X109R-X212P-X232V-X245R-X271V, X101G-X103A-X104I-X109R-X212P-X232V-X245R, X076D-S87R-X103A-X104I-X212P-X271V, X076D-X103A-X104I-X109R, X076D-X103A-X104I-X212P-X271V, X076D-X103A-X104I-X109R-X245R, e X076D-X103A-X104I-X212P-X245L-X271V, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00031] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X024R-X086W-X118R, X024R-X078R-X086W-X243F, X024R-X033S-X086S-X087N-X209A, X033S-X118R, X024R-X078R-X086W-X118R-X270T, X024R-X033S-X086W-X118R, X078R-X086W-X243F, X033S-X078R-X086W-X118R-X209A,

X033S-X078R-X209A, X086W-X118R-X243F, X024R-X086W, X078R-X086W-X235F, X024R-X118R, X024R-X086R, X101G-X103A-X104I-X232V, X024R-X033S-X078R-X086W-X118R, X024R-X118R-X209A, X209A-X241R, X033S-X086W-X243F, X033S-X172V-X209A, X118R-X209A-X243F, X024R-X086S-X141G, X024R-X118R-X209A-X243F, X024R-X033S-X086S-X085N-X235F, X024R-X033S-X133V, X024R-X033S-X078R-X086W, X024R-X086W-X209A, X024R-X241R, X033S-X118R-X243F, X024R-X235F, X024R-X078R-X086W, X024R-X118R-X209A-X235F, X024R-X209A-X241R, X033S-X118R-X241R, X086W-X118R-X209A, X033S-X118R-X159D-X209A, X033S-X078R-X086W, X024R-X086W-X243F, X118R-X209A, X024R-X086W-X118R-X203I, X078R-X209A-X235F, X024R-X033S-X241R, X078R-X118R, X033S-X118R-X209A-X243F, X021M-X024R-X033S, X024R-X033S-X086W, X033S-X235F, X078R-X086W-X209A, X024R-X033S-X209A-X235F, X033S-X086W-X118R, X024R-X033S-X078R-X209A, X033S-X086W-X118R-X209A-X243F, X086W-X209A-X243F, X005S-X078R-X118R-X241R, X024R-X174T, X033S-X209A-X243F, X086W-X118R-X133V, X024R-X033S-X118R, X024R-X086W-X209A-X235F, X086W-X209A, X008T-X024R, X086W-X118R, X033S-X241R, X005S-X024R-X033S-X243F, X024R-X209A-X242P, X024R-X033S-X078R-X118R, X024R-X033S-X194T, X024R-X243F, X024R-X209A, X024R-X033S-X118R-X209A, X033S-X086W, X024R-X033S, X024R-X033S-X078R-X243F, X086W-X243F, X033S-X118D-X138V-X209A, X033S-X209A-X235F, X024R-X086R-X118R, X033S-X201S, X024R-X239Q, X033S-X118R-X209A-, X078R-X086W, X235F-X243F, X024R-X209A-X235F, X118R-X172V, X017Y-X024R-X033S-X086W, X033S-X148F, X024R-X118R-X235F, X033S-X078R, X033S-X243F, X024C-X033S, X118R-X194T, X033S-X209A, X118R-X209A-X235F, X024R-X033S-X209A-X243F, X024R-X033S-X235F, X024R-X033S-X118R-X235F, X024R-X141G, X024R-X274I, X024R-X033S-X209A, X086W-X235F, X024R-X209A-

X243F, X004E-X033S-X078R, X086W-X209A-X235F, X015T-X033S, X033S-X086W-X156L-X209A, X024R-X118R-X243F-X269H, X209A-X235F, X024R-X247H, X024R-X033S-X228T, X078R-X235F, X024R-X033S-X174V-X235F, X024R-X235F-X243F, X024R-X033S-X235F-X241R, X024R-X033S-X151V, X024R-X104A, X033S-X048T, X012H-X104A-X118R, X118R-X235F, X033S-X253A, X143A-X209A, X024R-X033S-X243F, X033S-X239T, X209A-X243F, X024R-X033S-X129H-X184D-X253M, X024R-X085V-X086W-X118R-X235F, X024R-X272P, e X024R-X269C, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00032] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X020R-X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X087D-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X150L-X249R, X018R-X024R-X043R-X076D-X087D-X249R, X018R-X024R-X043R-X076D-X150L-X249R, X018R-X024R-X076D-X078R-X087D-X249R, X018R-X024R-X076D-X078R-X150L-X249R, X018R-X024R-X076D-X087D-X249R-X269R, X018R-X024R-X076D-X087D-X242R-X249R, X018R-X024R-X076D-X087D-X150L-X249R, X018R-X024R-X076D-X150L-X249R, X018R-X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R, X018R-X022R-X024R-X076D-X087D-X249R, X018R-X022R-X024R-X076D-X150L-X249R, X043R-X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X043R-X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R, X024R-X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R,

X024R-X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R, X078R-X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X078R-X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R, X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R-X249R, X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R-X269R, X022R-X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X043D-X076D-X150L-X249R, X043R-X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X022R-X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R, X018R-X024R-X043D-X076D-X087D-X249R, X018R-X024R-X076D-X087D-X249R, X018R-X024R-X076D-X150L-X242R-X249R, X043R-X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R-X269R, X076D-X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R, X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X242R-X245R, X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R, X076D-X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, e X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X242R-X245R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00033] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X024R-X101G-X103A-X104I-X129Q-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X130A-X158E-X183D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129Q-X158E-X183D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X130A-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129Q-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X130A-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-

X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129Q-X130A-X158E-X183D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128L-X129Q-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129Q-X130A-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X129Q-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X129Q-X130A-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128L-X129Q-X130A-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X128L-X129Q-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, e X024R-X027R-X101G-X103A-X104I-X128L-X129Q-X130A-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00034] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X101G-X103A-X104I-X232V-X222Q-X245R, X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X222S-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X222Q-X232V-X245R-X248D-X249R, X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X222Q-X245R, X101G-X103A-X104I-X232V-X222S-X245R, X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X222S-X245R, e X076D-X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X222S-X232V-X245R-X248D-X249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00035] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas

maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X024R-X101G-X103A-X104I-X128L-X129Q-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X130A-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X128L-X129Q-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X129Q-X130A-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X130A-X158E-X183D-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128L-X129Q-X130A-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129Q-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X128L-X130A-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128L-X129Q-X158E-X183D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128L-X129Q-X130A-X158E-X183D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128L-X129Q-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271G, X101G-X103A-X104I-X129Q-X158E-X183D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X130A-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128L-X158E-X183D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X129Q-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, e X024R-X101G-X103A-X104I-X128L-X130A-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00036] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas

maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X101G-X103A-X104I, X22A-X101A-X209E, S103G-L111V-G159E, X22A-X103G-X159E, X22A-X111V-X159E, X22A-X128N-X271F-X209E, X22A-X103G-X111V, X62E-X111V-X128N, X22A-X111V-X128N, X22A-X62E-X111V, X101A-X103G-X104L-X188D, X101G-X103A-X104I-X159D, X101A-X103G-X104L-X128N, X22A-X101A-X159E, X101A-X103G-X104L, X101A-X103G-X104L-X159E, X22A-X101A-X103G-X104L, X101A-X103G-X104L-X209E, X22A-X209E-X271F, X22A-X101A-X271F, e X101A-X209E-X271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00037] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X103A-X104I-X159D-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X104I-X159D-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X159D-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X159D-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X159D-X232V-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X159D-X232V-X236H-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X159D-X232V-X236H-X245R-X252K, e X101G-X103A-X104L-X159D-X232V-X236H-X245R-X248D, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00038] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X238R, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X248R, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X253R, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X24R, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X76D, X101G-X103A-X104I-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X159E-X232V-X245R-X248D-X271F, X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X245R-X248D-X271F, X22A-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X249R, X22A-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X62E-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X249R, e X62E-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00039] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X20R-X43R-X249R, X20R-X22R-X43R, X20R-X43R-X242R, X20R-X43R-X271L, X20R-X43R-X244R, X20R-X24R-X43R-X242R, X9A-X22R-X78R-X212F-X241R, X9A-X20R-X43R-X212F, X9A-X43R-X212F, X20R-X43R-X212F, X20R-

X22R-X43R-X212F, X24R-X78R-X212F, X9A-X43R-X78R, X9A-X43R-X78R-X242R, X9A-X20R-X43R-X78R, X20R-X24R-X43R-X78R-X242R, X22R-X24R-X78R-X212F, X9A-X20R-X43R-X78R-X242R, X20R-X43R-X78R-X249R, X20R-X43R-X78R, X9A-X78R-X212F, X9A-X22R-X43R-X78R, X9A-X20R-X24R-X43R, X9A-X22R-X78R-X212F, X4R-X9A-X22R-X78R-X212F, X20R-X24R-X43R, X1R-X9A-X43R, X20R-X24R-X43R-X115R, X9A-X24R-X43R, X20R-X22R-X24R-X43R, X1R-X24R-X43R, X9A-X20R-X24R-X43R-X242R, X9A-X20R-X22R-X78R-X212F, X9A-X24R-X43R-X244R, X9A-X24R-X43R-X242R, X4R-X9A-X22R-X24R-X212F, e X22R-X24R-X43R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00040] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R, X101G-X103A-X104I-X159R-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248R, X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X248R, X101G-X103A-X104I-X159R-X232V-X245R-X248R, e X101G, X103A, X104I, X232V, X236H, X245R, e X252K, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00041] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de

aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X16S, X22A, X24R, X62E, X76D, X89P, X101A/G, X103G/A, X104L/I, X111V, X128N, X129E, X232V, X148I, X158E, X159D/E, X166D, X186H, X188D, X209E, X236H, X238R, X245R, X248D/R, X249R, X252K/R, X253R, e X271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00042] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: N062E-A158E, S103G-A158E, S128N-A158E, A016S-A158E, V104L-A158E, E089P-A158E, L111V-A158E, T022A-A158E, S101A-A158E, L148I-A158E, P129E-A158E, T022A-E089P, A016S-E089P, N062E-E089P, N062E-E271F, A158E-E271F, R186H-E271F, P129E-E271F, L111V-E271F, Y209E-E271F, A016S-E271F, S188D-E271F, T022A-E271F, G159E-E271F, V104L-E271F, S101A-E271F, E089P-E271F, S128N-E271F, S103G-E271F, L148I-E271F, H249R-E271F, N062E-G159E, A016S-G159E, S128N-G159E, L148I-G159E, L111V-G159E, E089P-G159E, T022A-G159E, P129E-G159E, S103G-G159E, V104L-G159E, A158E-G159E, S101A-G159E, A158E-H249R, L111V-H249R, P129E-H249R, N062E-H249R, A016S-H249R, R186H-H249R, L148I-H249R, G159E-H249R, S101A-H249R, S188D-H249R, V104L-H249R, Y209E-H249R, T022A-H249R, S128N-H249R, S103G-H249R, E089P-H249R, T022A-L111V, S101A-L111V, A016S-L111V, V104L-L111V, N062E-L111V, S103G-L111V, E089P-L111V, A016S-L148I, N062E-L148I, T022A-L148I, P129E-L148I, V104L-L148I, S103G-L148I, S128N-L148I, S101A-L148I, E089P-L148I, L111V-L148I, A016S-N062E, T022A-N062E, N062E-

P129E, T022A-P129E, S128N-P129E, A016S-P129E, S101A-P129E, V104L-P129E, E089P-P129E, S103G-P129E, L111V-P129E, N062E-R186H, S128N-R186H, S101A-R186H, T022A-R186H, A016S-R186H, A158E-R186H, E089P-R186H, P129E-R186H, G159E-R186H, S103G-R186H, V104L-R186H, L111V-R186H, L148I-R186H, N062E-S101A, T022A-S101A, A016S-S101A, E089P-S101A, N062E-S103G, T022A-S103G, A016S-S103G, S101A-S103G, E089P-S103G, N062E-S128N, A016S-S128N, T022A-S128N, S101A-S128N, V104L-S128N, E089P-S128N, S103G-S128N, L111V-S128N, L111V-S188D, N062E-S188D, A016S-S188D, L148I-S188D, T022A-S188D, S128N-S188D, S101A-S188D, V104L-S188D, E089P-S188D, P129E-S188D, G159E-S188D, R186H-S188D, S103G-S188D, A158E-S188D, A016S-T022A, A016S-V104L, T022A-V104L, S101A-V104L, N062E-V104L, S103G-V104L, E089P-V104L, G159E-Y209E, L111V-Y209E, S101A-Y209E, A016S-Y209E, S128N-Y209E, L148I-Y209E, P129E-Y209E, N062E-Y209E, T022A-Y209E, S103G-Y209E, A158E-Y209E, S188D-Y209E, V104L-Y209E, E089P-Y209E, e R186H-Y209E, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00043] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: N018R-W241R, G020R-W241R, S024R-W241R, S009A-W241R, G020R-W241R, V004R-W241R, N043R-W241R, S078R-W241R, T022R-W241R, G115R-W241R, A001R-W241R, S212F-W241R, L082R-W241R, N018R-V244R, S024R-V244R, S078R-V244R, G020R-V244R, S212F-V244R, S009A-V244R, L082R-V244R, A001R-V244R, N043R-V244R, T022R-V244R,

V004R-V244R, G115R-V244R, W241R-V244R, S242R-V244R, A001R-V004R, S009A-T022R, N018R-T022R, G020R-T022R, V004R-T022R, A001R-T022R, S024R-S242R, N018R-S242R, V004R-S242R, G020R-S242R, S212F-S242R, L082R-S242R, S078R-S242R, A001R-S242R, S009A-S242R, T022R-S242R, G115R-S242R, N043R-S242R, W241R-S242R, N018R-S212F, T022R-S212F, V004R-S212F, S024R-S212F, A001R-S212F, G115R-S212F, G020R-S212F, S009A-S212F, N043R-S212F, S078R-S212F, L082R-S212F, S009A-S078R, G020R-S078R, S024R-S078R, T022R-S078R, N018R-S078R, V004R-S078R, A001R-S078R, N043R-S078R, T022R-S024R, G020R-S024R, N018R-S024R, A001R-S024R, V004R-S024R, S009A-S024R, V004R-S009A, A001R-S009A, S242R-N269R, S024R-N269R, G020R-N269R, T022R-N269R, H249R-N269R, S212F-N269R, N043R-N269R, V244R-N269R, A001R-N269R, N018R-N269R, S078R-N269R, S009A-N269R, G115R-N269R, W241R-N269R, V004R-N269R, L082R-N269R, N018R-N043R, G020R-N043R, V004R-N043R, T022R-N043R, S009A-N043R, A001R-N043R, S024R-N043R, S009A-N018R, V004R-N018R, A001R-N018R, S024R-L082R, S009A-L082R, N018R-L082R, A001R-L082R, S078R-L082R, G020R-L082R, T022R-L082R, V004R-L082R, N043R-L082R, N043R-H249R, G020R-H249R, V004R-H249R, N018R-H249R, S009A-H249R, S212F-H249R, T022R-H249R, S024R-H249R, G115R-H249R, A001R-H249R, L082R-H249R, S242R-H249R, W241R-H249R, V244R-H249R, S078R-H249R, N018R-G115R, G020R-G115R, T022R-G115R, S078R-G115R, S009A-G115R, V004R-G115R, A001R-G115R, L082R-G115R, N043R-G115R, S024R-G115R, S009A-G020R, N018R-G020R, V004R-G020R, A001R-G020R, S009A-E271L, G020R-E271L, S024R-E271L, V244R-E271L, W241R-E271L, N043R-E271L, T022R-E271L, H249R-E271L, S212F-E271L, G115R-E271L, S242R-E271L, S078R-E271L, V004R-E271L, N269R-E271L, A001R-E271L, N018R-E271L, e L082R-E271L,

sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00044] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que a dita variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020R-N043R, N062E-A158E, S103G-A158E, S128N-A158E, A016S-A158E, V104L-A158E, E089P-A158E, L111V-A158E, T022A-A158E, S101A-A158E, L148I-A158E, P129E-A158E, T022A-E089P, A016S-E089P, N062E-E089P, N062E-E271F, A158E-E271F, R186H-E271F, P129E-E271F, L111V-E271F, Y209E-E271F, A016S-E271F, S188D-E271F, T022A-E271F, G159E-E271F, V104L-E271F, S101A-E271F, E089P-E271F, S128N-E271F, S103G-E271F, L148I-E271F, H249R-E271F, N062E-G159E, A016S-G159E, S128N-G159E, L148I-G159E, L111V-G159E, E089P-G159E, T022A-G159E, P129E-G159E, S103G-G159E, V104L-G159E, A158E-G159E, S101A-G159E, A158E-H249R, L111V-H249R, P129E-H249R, N062E-H249R, A016S-H249R, R186H-H249R, L148I-H249R, G159E-H249R, S101A-H249R, S188D-H249R, V104L-H249R, Y209E-H249R, T022A-H249R, S128N-H249R, S103G-H249R, E089P-H249R, T022A-L111V, S101A-L111V, A016S-L111V, V104L-L111V, N062E-L111V, S103G-L111V, E089P-L111V, A016S-L148I, N062E-L148I, T022A-L148I, P129E-L148I, V104L-L148I, S103G-L148I, S128N-L148I, S101A-L148I, E089P-L148I, L111V-L148I, A016S-N062E, T022A-N062E, N062E-P129E, T022A-P129E, S128N-P129E, A016S-P129E, S101A-P129E, V104L-P129E, E089P-P129E, S103G-P129E, L111V-P129E, N062E-R186H, S128N-R186H, S101A-R186H, T022A-R186H, A016S-R186H, A158E-R186H, E089P-R186H, P129E-R186H,

G159E-R186H, S103G-R186H, V104L-R186H, L111V-R186H, L148I-R186H, N062E-S101A, T022A-S101A, A016S-S101A, E089P-S101A, N062E-S103G, T022A-S103G, A016S-S103G, S101A-S103G, E089P-S103G, N062E-S128N, A016S-S128N, T022A-S128N, S101A-S128N, V104L-S128N, E089P-S128N, S103G-S128N, L111V-S128N, L111V-S188D, N062E-S188D, A016S-S188D, L148I-S188D, T022A-S188D, S128N-S188D, S101A-S188D, V104L-S188D, E089P-S188D, P129E-S188D, G159E-S188D, R186H-S188D, S103G-S188D, A158E-S188D, A016S-T022A, A016S-V104L, T022A-V104L, S101A-V104L, N062E-V104L, S103G-V104L, E089P-V104L, G159E-Y209E, L111V-Y209E, S101A-Y209E, A016S-Y209E, S128N-Y209E, L148I-Y209E, P129E-Y209E, N062E-Y209E, T022A-Y209E, S103G-Y209E, A158E-Y209E, S188D-Y209E, V104L-Y209E, E089P-Y209E, R186H-Y209E, N018R-W241R, G020R-W241R, S024R-W241R, S009A-W241R, G020R-W241R, V004R-W241R, N043R-W241R, S078R-W241R, T022R-W241R, G115R-W241R, A001R-W241R, S212F-W241R, L082R-W241R, N018R-V244R, S024R-V244R, S078R-V244R, G020R-V244R, S212F-V244R, S009A-V244R, L082R-V244R, A001R-V244R, N043R-V244R, T022R-V244R, V004R-V244R, G115R-V244R, W241R-V244R, S242R-V244R, A001R-V004R, S009A-T022R, N018R-T022R, G020R-T022R, V004R-T022R, A001R-T022R, S024R-S242R, N018R-S242R, V004R-S242R, G020R-S242R, S212F-S242R, L082R-S242R, S078R-S242R, A001R-S242R, S009A-S242R, T022R-S242R, G115R-S242R, N043R-S242R, W241R-S242R, N018R-S212F, T022R-S212F, V004R-S212F, S024R-S212F, A001R-S212F, G115R-S212F, G020R-S212F, S009A-S212F, N043R-S212F, S078R-S212F, L082R-S212F, S009A-S078R, G020R-S078R, S024R-S078R, T022R-S078R, N018R-S078R, V004R-S078R, A001R-S078R, N043R-S078R, T022R-S024R, G020R-S024R, N018R-S024R, A001R-S024R, V004R-S024R, S009A-S024R, V004R-S009A, A001R-S009A, S242R-N269R,

S024R-N269R, G020R-N269R, T022R-N269R, H249R-N269R, S212F-N269R, N043R-N269R, V244R-N269R, A001R-N269R, N018R-N269R, S078R-N269R, S009A-N269R, G115R-N269R, W241R-N269R, V004R-N269R, L082R-N269R, N018R-N043R, G020R-N043R, V004R-N043R, T022R-N043R, S009A-N043R, A001R-N043R, S024R-N043R, S009A-N018R, V004R-N018R, A001R-N018R, S024R-L082R, S009A-L082R, N018R-L082R, A001R-L082R, S078R-L082R, G020R-L082R, T022R-L082R, V004R-L082R, N043R-L082R, N043R-H249R, G020R-H249R, V004R-H249R, N018R-H249R, S009A-H249R, S212F-H249R, T022R-H249R, S024R-H249R, G115R-H249R, A001R-H249R, L082R-H249R, S242R-H249R, W241R-H249R, V244R-H249R, S078R-H249R, N018R-G115R, G020R-G115R, T022R-G115R, S078R-G115R, S009A-G115R, V004R-G115R, A001R-G115R, L082R-G115R, N043R-G115R, S024R-G115R, S009A-G020R, N018R-G020R, V004R-G020R, A001R-G020R, S009A-E271L, G020R-E271L, S024R-E271L, V244R-E271L, W241R-E271L, N043R-E271L, T022R-E271L, H249R-E271L, S212F-E271L, G115R-E271L, S242R-E271L, S078R-E271L, V004R-E271L, N269R-E271L, A001R-E271L, N018R-E271L, e L082R-E271L, e sendo que a carga líquida total da variante é 0, +1, +2, +3, +4, +5, -1, -2, -3, -4, ou -5 em relação à carga líquida total da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, e sendo que a carga líquida total é obtida por uma ou mais substituições selecionadas a partir de: N43D, R45T, N62E, N76D, S101D, P129E, A158E, G159D, G159E, S166D, S188D, A230E, N18R, G20K, G20R, T22R, S24R, N43R, G118R, Q245R, H249R, N269R, E271F, e E271L, e sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1.

[00045] Em um aspecto, a dita variante de protease compreende:

a) duas ou mais das seguintes mutações: X1R, X2S, V4R, V4S, X9A, X10S, X14K, X16S, X22A, X22R, X24R, X25V, X26F, X42I, X52F, X52E, X52N, X62E, X62Q, X68A, X68C, X71G, X72C, X74C, X75A, X75F, X78R, X89P, X89T, X89G, X89H, X89W, X91N, X94N, X100S, X101A, X101N, X101G, X101D, X103G, X103N, X104L, X104I, X108I, X111V, X112V, X115K, X117F, X121F, X128D, X128F, X128L, X128N, X129E, X148I, X158E, X159E, X160D, X166D, X185E, X186H, X188E, X188D, X203E, X209S, X209N, X209F, X209T, X209E, X209H, X209G, X210R, X212I, X212F, X214F, X215N, X215D, X215E, X217E, X217N, X224A, X230E, X231I, X236F, X238R, X238K, X239K, X239G, X239R, X248V, X249R, X250I, X262D, X263F, X265F, X267V, X267N, X269I, X269R, X271F, X271I, X271H e X272F; e/ou

b) um ou mais dos seguintes conjuntos de mutações: X062E-X129E, X062E-X159E, X016S-X148I, X158E-X249R, X016S-X062E, X111V-X188D, X022A-X062E, X062E-X148I, X022A-X129E, X062E-X271F, X062E-X158E, X016S-X159E, X062E-X186H, X128N-X159E, X062E-X188D, X062E-X128N, X148I-X159E, X103G-X158E, X111V-X159E, X158E-X271F, X016S-X188D, X022A-X111V, X128N-X158E, X016S-X158E, X104L-X158E, X128N-X186H, X159E-X209E, X062E-X101A, X111V-X209E, X148I-X188D, X101A-X209E, X022A-X188D, X016S-X022A, X128N-X129E, X016S-X209E, X016S-X128N, X022A-X089P, X128N-X209E, X089P-X158E, X062E-X103G, X186H-X271F, X016S-X129E, X089P-X159E, X111V-X249R, X101A-X129E, X148I-X209E, X022A-X159E, X129E-X249R, X129E-X209E, X104L-X129E, X128N-X188D, X111V-X158E, X022A-X158E, X062E-X209E, X062E-X249R, X101A-X186H, X089P-X129E, X129E-X271F, X22A-X111V-X159E, X101A-X103G-X104L-X209E, X101A-X103G-X104L-X159E, X101A-X103G-X104L-X188D, X101G-X103A-X104I-X159D, X22A-X103G-X159E, X22A-X128N-X271F-X209E, X22A-X209E-

X271F, X22A-X101A-X209E, X101A-X209E-X271F, X22A-X111V-X128N, X22A-X101A-X159E, X101A-X103G-X104L, X22A-X101A-X103G-X104L, X101A-X103G-X104L, X101G-X103A-X104I, X101A-X103G-X104L-X128N, X103A-X104I-X159D-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X104I-X159D-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X159D-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X159D-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X159D-X232V-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X159D-X232V-X236H-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X159D-X232V-X236H-X245R-X248D, X62E-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X62E-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X249R, X22A-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X24R, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X253R, X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X22A-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X101G-X103A-X104I-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X238R, X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X245R-X248D-X271F, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X76D e X101G-X103A-X104I-X159E-X232V-X245R-X248D-X271F; a dita variante tendo uma carga líquida total de 0, -1, -2, -3, -4 ou -5, de preferência 0, -1, -2 ou -3, em relação à protease subtilisina GG36 de *B. lentus* que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:1. Estas variantes de protease podem ser particularmente preferenciais em um líquido aquoso para lavagem com baixa força iônica ou baixas concentrações de detergente.

[00046] Em um aspecto, a dita variante de protease compreende:

a) duas ou mais das seguintes mutações: X4R, X17R, X18R, X20R, X22R, X24R, X24W, X25R, X43R, X43A, X46R, X52F, X52N, X57R, X59A, X62Q, X71G, X75R, X76D, X78R, X82R, X86W, X89P, X89W, X89T, X89I, X89H, X89V, X104L, X106V, X106G, X115R, X118I, X121F, X144R, X185I, X197F, X209N, X209S, X217E, X231I, X239R, X239S, X241R, X242R, X242L, X243R, X244R, X248I, X249R, X252R, X253R, X271T, X271V, X271L, X271H, X271F, X271P, X1R, X9A, X212F e X269R; e/ou

b) um ou mais dos seguintes conjuntos de mutações: X022R-X024R, X009A-X271L, X018R-X241R, X018R-X115R, X043R-X249R, X020R-X249R, X004R-X249R, X020R-X024R, X018R-X249R, X009A-X020R, X020R-X241R, X009A-X078R, X020R-X115R, X018R-X024R, X024R-X242R, X022R-X115R, X018R-X043R, X020R-X043R, X018R-X242R, X242R-X269R, X018R-X244R, X024R-X269R, X020R-X271L, X024R-X271L, X004R-X009A, X020R-X269R, X001R-X024R, X244R-X271L, X009A-X018R, X241R-X271L, X004R-X024R, X009A-X249R, X009A-X022R, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X245R-X248D-X271F, X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X24R, X101G-X103A-X104L-X159D-X232V-X236H-X245R-X252K, X101G-X103A-X104L-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K; a dita variante de protease tendo uma carga líquida total de 0, +1, +2, +3, +4 ou +5, de preferência, tendo uma carga líquida total positiva, com a máxima preferência +1, +2 ou +3, em relação à protease subtilisina GG36 de *B. lentinus* que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:1. Estas variantes de protease podem ser particularmente preferenciais em um líquido aquoso para lavagem com alta força iônica ou altas concentrações de detergente.

[00047] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020R-N043R, G020K-N062E, S024F-N116L, G020K-S024F, S024R-A174T, S024R-G118R, S024R-K235F, S024R-P086R, S024R-P086W, S078R-G118R, T033S-G118R, T033S-K235F, Y209A-W241R, G020R-N076D, N018R-Q245R, S024R-R045T, A232V-Q245R, G118R-A172V, G118R-A194T, I008T-S024R, K235F-N243F, N018R-S103A, N018R-V104I, P086W-G118R, P086W-N243F, P086W-Y209A, S024C-T033S, S024R-A232V, S024R-N243F, S024R-P239Q, S024R-S101G, S024R-S141G, S024R-T033S, S024R-T274I, S024R-Y209A, S078R-P086W, S101G-A232V, T033S-L148F, T033S-P086W, T033S-P201S, T033S-S078R, T033S-W241R, T033S-Y209A, A230E-H249R, A232V-H249R, G118R-K235F, N076D-Q245R, P086W-K235F, S024R-R247H, S024R-V104A, S078R-K235F, S101G-H249R, S103A-A232V, T033S-A048T, T033S-P239T, T033S-T253A, T143A-Y209A, Y209A-K235F, N018R-R045T, Y209A-N243F, S024R-A272P, S024R-R269C, S101G-V104I, V104I-A232V, N076D-H249R, e S024R-N076D sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00048] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020R-N076D, S024R-R045T, A230E-H249R, N018R-R045T, N018R-Q245R, S101G-A232V, S024R-A232V, A232V-Q245R, S024R-S101G, N018R-V104I, N018R-S103A,

S101G-H249R, A232V-H249R, S103A-A232V, N076D-Q245R, S101G-V104I, V104I-A232V, N076D-H249R, S024R-N076D, S024F-N116L, G020K-S024F, G020K-N062E, T033S-G118R, S024R-P086W, S024R-G118R, S024R-P086R, Y209A-W241R, S024R-W241R, S024R-K235F, G118R-Y209A, S078R-G118R, T033S-K235F, S024R-A174T, P086W-Y209A, I008T-S024R, P086W-G118R, T033S-W241R, S024R-N243F, S024R-Y209A, T033S-P086W, S024R-T033S, P086W-N243F, T033S-P201S, S024R-P239Q, S078R-P086W, K235F-N243F, G118R-A172V, T033S-L148F, T033S-S078R, T033S-N243F, S024C-T033S, G118R-A194T, T033S-Y209A, S024R-S141G, S024R-T274I, P086W-K235F, A015T-T033S, Y209A-K235F, S024R-R247H, S078R-K235F, S024R-V104A, T033S-A048T, G118R-K235F, T033S-T253A, T143A-Y209A, T033S-P239T, Y209A-N243F, S024R-A272P, e S024R-R269C, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00049] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: V004R-S009A-G020R-S242R, G020R-N043R-W241R, G020R-S242R-N269R, V004R-S009A-G020R-N043R, V004R-G020R-H249R, N018R-S024R-V244R, S009A-T022R-S212F-W241R, G020R-N043R-N269R, N018R-S024R-S242R, V004R-S009A-N043R-W241R, G020R-N043R-V244R, G020R-T022R-S242R, V004R-G020R-N043R, V004R-S009A-G020R-N043R-S242R, G020R-N043R-S242R, G020R-N043R-S242R-H249R, G020R-S212F-H249R, V004R-S009A-W241R, A001R-S009A-N043R, G020R-N043R-H249R, S009A-G020R-N043R-W241R, G020R-T022R-N043R, G020R-H249R-

N269R, G020R-T022R-W241R, V004R-S009A-S024R-N043R-W241R, S009A-N043R-S078R, V004R-G020R-S024R-V244R, G020R-T022R-S078R-S242R, G020R-S024R-S242R-H249R, V004R-S009A-S078R-W241R, S009A-N043R-S078R-S242R, V004R-G020R-S024R, S009A-N043R-S212F, G020R-N043R-S212F, S024R-S078R-S212F, S009A-G020R-S024R-N043R, S009A-T022R-N043R-S078R, G020R-T022R-S212F-W241R, G020R-N043R-S212F-W241R, S009A-N043R-W241R, G020R-N043R-E271L, G020R-T022R-S078R-W241R, G020R-S024R-N043R-S242R, G020R-T022R-N043R-W241R, S009A-G020R-N043R-S212F, V004R-S009A-G020R-S024R-S242R, G020R-N043R-H249R-E271L, G020R-T022R-S024R-S242R, S009A-T022R-S078R-S212F, G020R-N043R-S242R-E271L, S009A-T022R-S078R-S212F-W241R, V004R-G020R-S024R-H249R, G020R-T022R-E271L, G020R-T022R-N043R-S212F, V004R-G020R-S024R-N043R-S242R, V004R-G020R-S024R-N043R, V004R-S009A-T022R-S078R-S212F, G020R-T022R-S078R-S212F-W241R, e G020R-T022R-N269R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00050] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: N018R-G020R-N043D-R045T-A230E, N018R-N043R-R045T-S242R-H249R, S024R-N043D-H249R, N018R-G020R-R045T, G020R-S024R-N076D-H249R, S024R-N043R-A230E-S242R, N018R-S024R-N043D-A230E, G020R-N076D, N018R-S024R-N043D-N076D-H249R, S024R-N043R-N076D-H249R, N018R-S024R-R045T-S242R, G020R-N043D-N076D-A230E-H249R, G020R-N043R-R045T-S242R, N018R-S024R-N076D-H249R, N018R-G020R-

S024R-N043D-R045T-L233I-S242R, S024R-N043R-A230E, N018R-G020R-N043D, N043R-S242R-H249R, G020R-N043R-R045T-A230E, N043R-N076D-S242R-H249R, G020R-S024R-R045T-A230E-S242R, S024R-R045T-N076D-A230E-S242R-H249R, S024R-R045T, S024R-N043R-R045T-N076D-A230E-H249R, N018R-S024R-N043D-R045T-H249R, N018R-N043R-R045T-H249R, S024R-N043R-S242R, N018R-G020R-N043R-N076D-H249R, G020R-S024R-N043D-H249R, G020R-N043R-A230E-S242R, G020R-N043R-S242R, N018R-N043R-N076D-A230E, G020R-S024R-N043D-S242R, G020R-N043R-A230E, N018R-G020R-N043R-N076D-S242R-H249R, N043D-R045T-N076D-H249R, N018R-N043R-S242R-H249R, N018R-G020R-N043R-R045T-S242R, N018R-G020R-N043D-A230E-S242R, G020R-S024R-N043R-R045T-H249R, S024R-N043R-H249R, G020R-S024R-K27E-N043R-N076D-A230E, S024R-N043R-R045T-S242R, N018R-G020R-S024R-N043R-R045T-N076D-A230E, G020R-N043R-N076D-A230E-H249R, N018R-N043R-R045T-S242R, G020R-S242R-H249R, N018R-N043R-N076D-A230E-S242R-H249R, N018R-S024R-N076D, G020R-S024R-K27R-N043D-S242R-H249R, N018R-G020R-S024R-N043D-N076D-S242R, N018R-N043R-N076D-S242R-H249R, N018R-S024R-N043D-A230E-H249R, N018R-G020R-N043D-H249R, N018R-G020R-N043D-R045T-N076D-S242R, S024R-N043R-N076D-A230E-S242R, G020R-S024R-T38I-N043R-R045T-N076D-S242R-H249R, N018R-G020R-N043R, N018R-S024R-R045T-A230E-S242R, N018R-G020R-H249R, S024R-N043R-N076D, N018R-G020R-S024R-N043R-R045T-N076D-H249R, N018R-N043D-R045T-N076D-S242R-H249R, S024R-N043D-S242R-H249R, N018R-G020R-S024R-N043D-R045T-S242R, G020R-S024R-N043R-N076D, N018R-G020R-N043D-R045T-A230E-S242R, G020R-S024R-N043R-R045T-N076D-S242R-H249R, N018R-N043R-R045T-N076D-S242R, N018R-G020R-N043R-N076D-A230E-S242R, N018R-S024R-N043D-H249R, N018R-S024R-N043R-R045T-A230E-H249R,

N018R-G020R-N043R-R045T-N076D-H249R, N018R-S024R-S242R, N018R-N043R-R045T-N076D-A230E-S242R, R045T-S242R-H249R, N018R-S024R-N043D-S242R, N018R-G020R-N043D-R045T-S240P, S024R-N043R-R045T-S242R-H249R, N018R-S024R-V30S-L31S-D32I-T33Q-G34V-I35F, N018R-G020R-N043R-N076D, G020R-N043D-R045T-N076D-S242R-H249R, N018R-S024R-N043D-A230E-S242R, N018R-S024R-N043D-S242R-H249R, S024R-N043D-R045T-S242R-H249R, N043R-A230E-H249R, S024R-N043R-N076D-A230E-H249R, G020R-S024R-N043D-N076D-H249R, S024R-R045T-S242R-A273V, G020R-S024R-R045T-N076D-S242R-H249R, N018R-S024R-N043D-N076D-S242R, N018R-N043R-N076D-A230E-H249R, N018R-G020R-N043R-R045T-H249R, N018R-N043R-R045T-A230E-S242R, G020R-S024R-N043D-R045T-A230E-S242R, N018R-N043D-A230E-H249R, N018R-N043R-N076D-S242R, N018R-G020R-N076D, N018R-G020R-N043D-N076D-S242R-H249R, G020R-S024R-N043D-N076D-S242R-H249R, N043D-S242R-H249R, N018R-G020R-S024R-N043R-N076D, N018R-G020R-N043D-R045T-N076D-H249R, N018R-G020R-N043R-R045T-N076D-A230E-H249R, N018R-N076D-S242R, G020R-N043R-H249R, N018R-N076D-S242R-H249R, N018R-S024R-R045T-A230E-H249R, A230E-H249R, N018R-R045T-H249R, G020R-N043R-N076D, N043R-R045T-H249R, N018R-N043D-N076D-S242R-H249R, N043R-N076D-H249R, N018R-R045T, G020R-N076D-A230E-S242R, G020R-S024R-N043D-R045T, S024R-N043D-N076D-S242R-H249R, G020R-R045T-H249R, N043R-N076D-S153A-H249R, N043R-N076D-A230E-H249R, N018R-N043D-N076D-H249R, e G020R-N043R-N076D-V227I, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00051] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de

subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S101G-S103A-V104I-A232V-Q236H-Q245R-N252K, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248R, S101G-S103A-V104I-G159R-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R, e S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248D, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00052] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-

A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D, A016S-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-

A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-

S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D,
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-
N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-
N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-
A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-S188D-
A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-
A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-
V104I-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-
P129E-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-
S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-S188D-A232V-
Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-
N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S188D-
A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-
G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-
A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-
P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-
P129E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-
S128N-P129E-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-A158E-
S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-
P129E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129E-
G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-A158E-
G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-
V104I-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-
V104I-P129E-L148I-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-
S103A-V104I-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-
V104I-S128N-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-
S103A-V104I-S128N-G159E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-
S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D,
S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D-

H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024K-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-L148I-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-L148I-G159E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, e S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00053] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-

S103A-V104I-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, A016S-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, e S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00054] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: V104L-S128N-A158E-R186H-H249R, S128N-A158E-S188D-H249R, N062E-S128N-A158E-G159E-

E271F, N062E-A158E-S188D-H249R-E271F, N062E-A158E-R186H-H249R-E271F, S128N-A158E-S188D-Y209E-E271F, N062E-G159E-S188D-H249R, A016S-N062E-A158E-R186H-H249R, N062E-A158E-G159E-H249R, S101A-S128N-A158E-Y209E-H249R, S128N-A158E-R186H-E271F, N062E-A158E-S188D-H249R, N062E-A158E-R186H-E271F, N062E-A158E-R186H-H249R, N062E-S101A-R186H-H249R, N062E-S101A-A158E-R186H-E271F, N062E-V104L-A158E-S188D-H249R-E271F, N062E-G159E-R186H-H249R, N062E-G159E-H249R, S128N-A158E-R186H-H249R, S128N-A158E-S188D-E271F, N062E-A158E-H249R, N062E-R186H-S188D-H249R-E271F, S128N-A158E-Y209E-, N062E-S101A-A158E-H249R, V104L-S128N-A158E-R186H-E271F, N062E-S101A-A158E-R186H-H249R-E271F, A016S-N062E-A158E-H249R, N062E-S101A-G159E-H249R, S128N-A158E-R186H-S188D-E271F, S101A-S128N-A158E-R186H-E271F, N062E-S101A-S188D-H249R, S101A-V104L-A158E-R186H-S188D-H249R, N062E-G159E-H249R-E271F, S128N-A158E-G159E-E271F, A016S-N062E-V104L-A158E-R186H-E271F, T022A-S128N-A158E-H249R, S128N-A158E-H249R, N062E-S101A-V104L-A158E-R186H-E271F, A016S-N062E-A158E-R186H-E271F, V104L-S128N-A158E-H249R, V104L-S128N-A158E-S188D-H249R, T022A-N062E-A158E, N062E-S101A-S188D-H249R-E271F, N062E-A158E-H249R-E271F, V104L-S128N-A158E-R186H-S188D-E271F, N062E-S101A-R186H-E271F, N062E-V104L-G159E-H249R, N062E-R186H-H249R, N062E-S101A-R186H-H249R-E271F, S101A-A158E-R186H-S188D-H249R, N062E-S101A-R186H, S101A-S128N-P129E-R186H-H249R, S101A-S103G-A158E-R186H-H249R, A016S-N062E-V104L-R186H-S188D-E271F, V104L-A158E-R186H-H249R, S101A-S128N-A158E-S188D-Y209E-E271F, N062E-S101A-R186H-S188D-E271F, A016S-N062E-A158E-H249R-E271F, N062E-S128N-A158E, N062E-S128N-G159E-H249R, N062E-S101A-A158E-S188D-H249R, S101A-S128N-A158E-H249R, N062E-

A158E-R186H-S188D-H249R, A016S-V104L-A158E-R186H-E271F, N062E-L148I-G159E, N062E-S101A-A158E-R186H-H249R, N062E-S101A-R186H-S188D-H249R, V104L-A158E-R186H-S188D-H249R, N062E-S101A-V104L-R186H-S188D-E271F, T022A-S101A-A158E-R186H-H249R, S101A-S128N-A158E-Y209E, A158E-R186H-S188D-H249R-E271F, V104L-A158E-R186H-S188D-H249R-E271F, S101A-V104L-A158E-R186H-H249R, V104L-A158E-H249R, S101A-V104L-S128N-A158E-R186H-E271F, A016S-V104L-S188D-H249R, S101A-V104L-A158E-R186H-S188D-E271F, V104L-S128N-G159E-E271F, V104L-A158E-R186H-H249R-E271F, A158E-R186H-H249R, S101A-A158E-R186H-H249R, V104L-A158E-S188D-H249R-E271F, A016S-S128N-A158E-R186H, V104L-S128N-R186H-S188D-H249R, A016S-S101A-S128N-R186H, A016S-N062E-S128N-R186H-E271F, A016S-S128N-R186H-E271F, S128N-P129E-R186H, A158E-R186H-H249R-E271F, A016S-A158E-H249R, A016S-A158E-R186H-H249R, A016S-T022A-A158E-R186H-E271F, E089P-S101A-P129E-R186H, T022A-S128N-A158E-R186H, S101A-V104L-S128N-A158E-R186H, T022A-S128N-R186H-S188D-, N062E-V104L-A158E-R186H-S188D-H249R, T022A-A158E-R186H-H249R-E271F, T022A-V104L-A158E-H249R, S101A-L111V-P129E, A016S-A158E-H249R-E271F, A016S-L111V-S188D-, T022A-V104L-R186H-S188D-H249R, e V104L-L148I-S188D-H249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00055] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: A001R-S101G-S103A-V104I-

A232V-Q245R, V004R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-E271L, S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, V004R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-E271L, G020R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-G025R-N116A-Y167W, N018R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, T022R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S078R-S103N-S106G-Y167W-Q236N, N018R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-S101A-H120F-A194F-H249R, G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S101G-S103A-V104I-S212F-A232V-Q245R, G020R-S144R-N185I-L233C-Q236N, G023A-S078R-S216F-Q236N-H249R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S101G-S103A-V104I-G115R-A232V-Q245R, P052N-S078R-S103N-L148I-T213A, N018R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G025R-E089I-N116A-P239S-A270C, S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, L148I-T213A-N252R, S024R-G025R-N183D-Y192W-P239S, G046R-A194F-S212M, V104L-L217E-T224A-H249R-N252R, G023A-Y091F-V121F-Y192W-Q236N, S101G-S103A-V104I-A232V-V244R-Q245R, S099F-S144R-Y167W-N252R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, T022W-S078R-Y167W-S212M-A270C, V121F-N252R-A270C, G020R-S103N-S216F-Q236N-N252R, N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, G023A-P052N-Y192W-I198L-N252R, G025R-G046R-V121F, S024R-S078R-V104L-N116A-N183D, G046R-Q059A-S103N-G211Q-S212M, G020R-P052N-N062Q-Y091F-Y192W, G023A-P052N-S144R-Y192W-S216F, S101G-

S103A-V104I-A232V-S242R-Q245R, P052N-S103N-N116A-L148I-Y192W, E089I-N116A-N117F-T224A-H249R, S144R-G211Q-N238L-P239S-H249R, N043A-N062Q-A194F-G211Q, G020R-S024R-P052N-Q059A-S216F, S024R-Y167W-T224A-H249R, T057R-Y167W-H249R, G025R-S103N-R186K-A194F-T224A, S105T-S128N-S144R-L148I-S212M, G020R-Q059A-S144R-Y192W-T224A, S024R-N043A-N117F-A194F-G211Q, N117F-A194F-T213A-A270C, S078R-Y091F-V121F-L233C-N252R, T057R-S099F-S105T-I198L-T213A, G023A-Y091F-S101A-I198L-N252R, N062Q-S103N-V121F-S144R-H249R, N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-S242R-Q245R, G023A-S024R-N117F-S212M-S216F, V104L-T213A-S216F, A194F-G211Q-Q236N, N062Q-S103N-N117F-A194F, S024R-N062Q-V104L-S106G-H249R, T057R-E089I-I198L, G046R-Q059A-S106G-L217E-H249R, N117F-T213A-A215F, S101A-H120F-Y192W-A215F-T224A, N043A-T057R-N117F-S144R-N183D, G046R-N183D-N238L, G025R-N043A-E089I-N117F, S078R-V104L-T213A-A215F-T224A, Y091F-S099F-S101A-S105T-Y167W, S106G-N117F-N238L, G046R-E089I-Y091F-S101A-N116A, G020R-N062Q-E089I-R186K-S212M, T057R-S099F-V121F-N185I-Y192W, G046R-E089I-Y192W-L233C-A270C, E089I-N117F-N185I-A215F-L233C, P052N-V104L-N183D-S216F-H249R, S078R-S099F-N116A-R186K-T224A, G025R-S105T-S128N-S144R-A270C, S105T-G211Q-S216F, S024R-G046R-Y091F-V121F, S106G-N185I-S216F-Q236N, N062Q-S101A-Q236N-N252R-A270C, G025R-N043A-Y091F-I198L-A270C, G020R-G023A-V104L-Y192W-L233C, S024R-N043A-S105T-S106G-I198L, G020R-E089I-L217E, S024R-Y091F-I198L-A215F-P239S, G046R-E089I-S099F-R186K-S212M, V104L-H120F-R186K-S216F-N252R, T022W-A194F-T213A-L233C-N238L, S099F-S105T-S106G-A194F-S212M, E089I-S105T-N116A-A215F-S216F, G025R-N116A-H120F-T224A-A270C, N043A-Q059A-S101A-S216F-T224A, T057R-N183D-Q236N, G025R-N062Q-S128N-S144R-N185I,

S103N-H120F-Y167W-I198L-L233C, T022W-E089I-S216F, S024R-S106G-N116A-S212M-T224A, G020R-P052N-S101A-I198L-L233C, E089I-Y091F-N185I-G211Q-A270C, L111I-A215F-P239S, S024R-N116A-R186K-L233C-Q236N, e G023A-S103N-S106G-S212M-A215F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00056] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116S-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-A232V-Q245R, G020R-T22W-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-A232V-Q245R, N018R-V104I-A232V-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-H249R, N018R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N018R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S103A-A232V-H249R, N018R-S101G-V104I-A232V-Q245R, G020R-S024R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R-H249R, N018R-T22K-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-R045T-

S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T22W-S101G-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R, S024R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T22W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V, N018R-S024R-N076D-N116A-A215F-H249R, N018R-N043R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-T213A-A215F-A232V-Q245R, N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-G211Q-H249R, N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S101G-Q245R, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-S024R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S101G-S103A-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-N116A-A232V-Q245R, N018R-S101G-V104I-A232V-H249R, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-V104I-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-A215F-A232V-Q245R, S024R-S103A-V104I-H249R, N018R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R,

S024R-S101G-V104I-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, S024R-S103A-V104I-A232V-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-G211Q-A215F-H249R, N018R-Q245R, S024R-S103A-Q245R, S024R-S103A-V104I-Q245R, G020R-S078R-S101G-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-V104I-H249R, N018R-S024R-V104I-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-G211Q-A215F-H249R, R019H-G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T22W-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S103A-V104I-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-S101G-V104I-A232V, S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R, N018R-S024R-S101G-V104I, G020R-S101A-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R, N018R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S101G-S103A-Q245R, N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-T22W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S101G-V104I-H249R, G020R-T22W-

S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-I198L-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, S024R-N076D-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101G-V104I-A232V-H249R, N018R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, A001T-N018R-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R, N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-A232V-Q245R, N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N076D-S101G-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-A215F-H249R, R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-S101G-I198L-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-T213A-A215F-H249R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-G211Q-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, S024R-A232V-Q245R, N018R-S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-T213A-A215F-H249R, N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-

I198L-G211Q-A215V-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-H249R, G020R-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-G211Q-A215F-A232V-Q245R, S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-A232V-Q245R, N018R-T22W-S024R-N076D-I198L-A215F-H249R, G020R-T022W-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R, G020R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-T180A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, N018R-S101G-S103A-V104I, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S103A-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-G211Q-H249R, G020R-S101A-S103A-V104I-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-A232V-H249R, N018R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-N076D-Q245R, S024R-V104I-Q245R, S101G-A232V, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-A215F-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-I198L-A232V-Q245R, S024R-Q245R-H249R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-G211Q-A232V-

Q245R, N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-G211Q-H249R, S024R-S101G-V104I-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-V104I, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N183D-I198L-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-G020R-T22W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-A232V-Q245R, Q012H-G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-I198L-G211Q-T213A-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-T213A-H249R, S024R-V104I-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-G211Q-H249R, N018R-N076D-S103A-V104I-H249R, N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R-E271G, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R, G020R-N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-N116A-A215F-H249R, N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, S024R-S103A-M175L-A232V-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R, G020R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, S024R-N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, N043R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-Q245R, G020R-S024R-

N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R,
S024R-A232V, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-
G211Q-A232V-Q245R, S024R-N076D-S101G-A232V-Q245R, N018R-
N076D-S101G-S103A-V104I-H249R, N018R-S024R-N076D-I198M-
G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-
I198L-A215F-H249R, N018R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-
A232V-Q245R-N269R, G020R-T022W-S103A-G211Q-T213A-A215F-
A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-
G211Q-T213A-A232V-Q245R, R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-
A232V-Q245R-N269R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-G211Q-
T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-A215F-H249R-
V268G, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-H249R, N018R-
T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-H249R, S101G-
S103A-V104I-Q245R, N018R-N076D-S101G-A232V-Q245R, N018R-
G020R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-
S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-
N076D-N116A-I198L-T213A-H249R, S078R-S101G-S103A-V104I-
A232V-Q245R-H249R, N018R-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-
A232V-Q245R, G020R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-
Q245R-N269R, N018R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-
Q245R-H249R, R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R,
S024R-S103A-A232V, N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-H249R,
N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-N043R-
R045T-N076D-S076T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-A273T,
N018R-G020R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R,
G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N183D-A215F-A232V-Q245R,
N018R-S024R-N076D-S101G-A232V, A232V-Q245R, N043R-R045T-
N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-V234I-Q245R, S024R-
N076D-S103A-V104I-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-
G211Q-T213A-A232V-Q245R, N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-

A232V-Q245R-N269R-A272V, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-S103A-V104I-A232V, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, S024R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-T022W-S024R-N076D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R, G020R-T22W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-M117I-N183D-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-A232V-Q245R, N018R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-Y209H-T213A-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R, S024R-N076D-S101G-M175L-A232V-Q245R, N018R-N043D-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-A215F-A232V-Q245R, N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-A215F-H249R, S024R-N076D-V104I-Q245R, K027R-N043R-

S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-A215F-H249R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, N018R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S101G-V104I, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-N076D-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-H249R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-A114T-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-H249R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022K-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V, N018R-S024R-N076D-N116A-H249R, G020R-S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-H249R,

N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T22W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N183D-G211Q-A232V-Q245R-, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-H249R, N018R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-H249R, N018R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-A131V-N183D-T213A-A232V-Q245R, N018R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-H249R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S024R-S101G-Q245R, S024R-N076D-S101G-Q245R, N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-A215F-H249R, S024R-S101G, N018R-T22W-S024R-N076D-T213A-A215F-H249R, G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N183D-I198L-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-N043D-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-I198L-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, N018R-G020R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R, N018R-V104I, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-L088I-S101A-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-H249R, N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-N076D-S101G-V104I-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-

T213A-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R-N269R, S024R-N076D-Q245R, N018R-G020R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-A215F-H249R, N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T22W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-T213A-H249R, G020R-T022W-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-N218S-A232V-Q245R, N018R-S103A, G020R-T22W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-G211Q-T213A-H249R, S024R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, K027R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-V104I, S101G-S103A-V104I-A232V-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-G211Q-H249R, N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R-R275S, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-

G211Q-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-
G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-
N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-
N076D-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-
H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-H249R,
V004M-N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R,
V104I-A232V-H249R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-
N183D-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104I-
N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R-T274I, G020R-S101A-S103A-
V104I-T213A-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-
N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-S024R-N043D-S078R-
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S103A-
H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-
A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-
H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-A215F-H249R,
N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-A215F-H249R-A270V,
N018R-N043D-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-
Q245R-N269R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N183D-A232V-
Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-
H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-G211Q-A215F-H249R,
N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-T213A-H249R, G020R-T022W-
S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, N018R-T22W-
S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-H249R, N043R-R045T-S078R-
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-
S101G-S103A-V104I-A232V, S101G-H249R, S024R-N076D-S101G-
S103A-V104I-M175L-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-
N116A-N183D-A232V-Q245R-N269S, N018R-S024R-N076D-S101A-
N116A-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-H249R,
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-A215F-H249R,
N018R-S024R-N076D-T213A-A215F-H249R-T260K, N018R-S024R-

N076D-N116A-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-H249R, S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-Q245R, S024R-N076D-S103A-H249R, N018R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-H249R, G020R-S024R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-A272D, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-H249R, S024R-N076D-S101G-S103A-A232V, S024R-S103A-V104I, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, S024R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, N018R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-H249R, G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-N076D-S103A-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, S103A-V104I-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-

G211Q-T213A-A215F-H249R, A016T-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-A215F-H249R, N043R-N076D-S101G-S103T-V104I-A232V-Q245R-H249R-N269R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-G115E-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-H249R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101G, N076D-S101G-A232V-Q245R, N018R-N076D-S101G-S103A-V104I-Q245R, N018R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-A215F-H249R, N018R-V104I-A232V, N043D-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-N076D-S101G-A232V-H249R, S103A-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-A215F-H249R, S024R-N076D-S103A-V104I-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A215F-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-A215F-H249R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-A131T-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-S101G-S103A-V104I-Q245R-H249R, N018R-N076D-A232V-H249R, N018K-N076D-S078R-S101G-S103A-

V104I-L217E-A232V-Q245R-N269R, N018R-G020R-S024R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R-L267I, A232V-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, N076D-V104I-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-H249R, S024R-S101G-S103A-A232V, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-H249R, S103A-A232V-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R, N018R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-G020R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-I198L-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R-T274I, S024R-S103A-Q245R-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-A215F-

H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-H249R, N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-H249R, S103A-A232V, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-H249R, N018R-N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-A232V, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-H249R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R-N263S, S024R-N076D-S101G-V104I-A232V-H249R, N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-V197A-T213A-A215F-H249R, S024R-S101G-S103A, N018R-S024R-N076D-

S101A-N116A-G211Q-A215F-H249R, N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, S024R-V104I-A232V, N018R-S024R-N076D-N183D-G211Q-H249R, G020R-N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-A150T-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-H249R, S024R-N076D-A232V-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116T-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R, R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-H249R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, N076D-S101G-S103A-Q245R, G020R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-H249R, N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N076D-S101G-V104I-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-H249R,

G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-Y209H-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N076D-Q245R, N076D-S101G-V104I-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-H249R, G020R-S024R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N204D-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A209V-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-T213A-

H249R, N018R-N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-I198L-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-G211Q-A215F-H249R-N269D, N018R-G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-H249R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N183D-A215F-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-Y209H-G211Q-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R, N076D-A232V-Q245R, N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-A215F-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-T213A-H249R, G020R-S024R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R, G020R-A090S-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-

H249R, N018R-G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N076D-S103A-V104I-A232V-Q245R, R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N076D-S103A-V104I-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-S101G-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, N076D-V104I-A232V-Q245R, K027R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S103A-V104I-L135I-A232V, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-H249R, P005S-N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-

H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N183D-I198L-A215F-A232V-Q245R, N076D-S101G-S103A-V104I-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-N243D-H249R, N018R-G020R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, S024R-N076D-S101G, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-A215F-H249R, N018R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-Q245R, G020R-S024R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R-N269S, N018R-G020R-T022W-S024R-

N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-A086V-S101A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-N076D-S101G-I198T-A232V, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-H249R-A248T, N018R-N076D-V104I-Q245R-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N043R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-N076D-S101G-V104I, G020R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-N076D-V104I, N018R-G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, S101G-V104I, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R-N263D, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-A215F-

H249R-R269H, N018R-N043D-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-H249R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, V104I-A232V, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-H249R, N043D-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-N043R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, S024R-N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-Y166F-A176P-A179V-N184T-A187P-A194P, N018R-T022W-S024R-D041E-N076D-S101A-S160T-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-I198L-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-G211Q-A215F-H249R, S024R-N076D-

V104I, N018R-N076D-S101G-A232V, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R, N018R-S024R-L031F-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R-N269S, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-A215F-H249R, N018R-N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N114T-I198L-G211Q-A215F-H249R, S024R-N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, S024R-N076D-S103A-V104I-A232V, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-A215F-H249R, S101G-V104I-A232V, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-H249R, N018R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R-T260A, N076D-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-H249R, N076D-V104I-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, S024R-N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-N076D-S101G-S103A, G020R-S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R, S101G-S103A-A232V, S024R-N076D-S101G-A232V, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-

I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-
I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-
I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-
I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-A156V-
N183D-G211Q-A215F-H249R-N269S, R045T-N076D-S101G-S103A-
V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-
N183D-I198L-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-I198L-
G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-
N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-
N076D-N116A-H249R, N018R-N076D-S101G, N018R-S024R-N076D-
N116A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-
S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-
S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-
N076D-A232V, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-A232V-Q245R,
N018R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R,
N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-
S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-N237D-H249R, N018R-
G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R-R275S,
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-
T213A-A215F-H249R, S024R-N076D, N018R-S024R-N076D-N183D-
G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-
I198L-T213A-A215F-H249R, N076D-V104I-A232V-H249R, N018R-
N076D-S103A-A232V, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-
N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-
S101A-N183D-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-
D175E-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-N043D-S078R-
S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R-A273E, G020R-S024R-
N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, P005S-
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S103A-V104I-A232V,
N018R-G020R-S024R-V068A-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-

H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R-R275S, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, e N043D-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00057] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: N018R-S024R-N043R-N076D-H249R-N269R, N018R-T022R-S024R-N043R-N076D-H249R, N018R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, T022R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, T022R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N043R-N076D-H249R, N018R-S024R-N076D-S242R-H249R, N018R-S024R-N076D-H249R-N269R, N018R-T022R-S024R-N076D-H249R, N018R-S024R-N076D-S078R-H249R, N018R-S024R-N043D-N076D-H249R-N269R, N018R-T022R-S024R-N043D-N076D-H249R, N018R-S024R-N043D-N076D-S078R-H249R, G020R-S101G-S103G-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104L-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104V-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103S-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103S-V104L-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103S-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103S-V104L-A232V-Q245R, G020R-

S101A-S103A-V104L-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103S-V104V-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103A-V104V-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103G-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103G-V104V-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104V-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103S-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103S-V104V-A232V-Q245R, N018R-S024R-N043R-N076D-S078R-H249R, S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-S242R-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-L217E-H249R, N018R-S024R-N043R-N076D-L217E-H249R, N018R-S024R-N043D-N076D-S242R-H249R, N018R-G020R-S024R-N043R-N076D-H249R, G020R-S101A-S103G-V104V-A232V-Q245R, N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-L217E-H249R-N269R, e N018R-S024R-N076D-L217E-S242R-H249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00058] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020R-S101A-S103A-V104I-G118R-A232V-Q245R, G020R-S024R-N116A-T213A, N043R-S101A-N116A-A215F-N269R, S024R-N043R-S101A-N116A, S024R-N043R-S101A-N116A-A215F-N269R, G020R-S101G-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R, N043R-S101A-N269R, S024R-N043R-N116A-T213A-N269R, G020R-S024R-N043R-R045T-S101A-T213A, S024R-N043R-N116A-A215F-N269R, G020R-S024R-T213A-A215F, G020R-N116A-

N269R, S024R-N116A-T213A-N269R, N043R-S101A-N116A-N269R, S101G-S103A-V104I-N116A-T213A-A232V-Q245R-N269R, S024R-N043R-R045T-S101A-N116A-A215F-N269R, G020R-N043R-S101A-N269R, S101A-S103A-V104I-T213A-A232V-Q245R-N269R, S024R-A215F-N269R, N043R-S101A-N116A-T213A-A215F-N269R, N043R-S101A-T213A-N269R, G020R-S024R-N043R-R045T-N116A-T213A, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-N043R-R045T-S101A-N116A-T213A-N269R, S024R-N043R-R045T-N269R, G020R-N043R-R045T-S101A-N269R, S024R-N043R-N116A-N269R, G020R-S024R-N043R-R045T, N043R-N116A-N269R, S024R-N043R-S101A-A215F-N269R, S024R-N043R-R045T-T213A-A215F-N269R, G020R-S024R-R045T-N269R, G020R-N043R-S101A-N116A-T213A-A215F, G020R-S101G-S103A-V104I-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S024R-R045T-N116A-N269R, G020R-S101A-N116A-N269R, S024R-N043R-A215F, G020R-S024R-T213A, S024R-N043R-S101A-A215F, G020R-S024R-N043R-R045T-N116A, G020R-S024R-N043R-R045T-S101A-N269R, G020R-S024R-S101A-A215F, G020R-S024R-N116A-T213A-A215F, G020R-S024R-N116A, G020R-S024R-S101A-N116A, N043R-T213A-A215F-N269R, S024R-S101A-N269R, S024R-N043R-N116A-A215F, G020R-T038A-N043R-S101A, G020R-S024R-N116A-A215F, S024R-N043R-S101A-T213A, P014L-G020R-S024R-N043R-R045T-S101A-A215F, G020R-S024R-A215F, G020R-N116A-A215F-N269R, G020R-R045T-N116A-N269R, G020R-S024R-N043R-R045T-A215F, e G020R-S024R-N043R-R045T-N116A-T213A-A215F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00059] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de

aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S024R-N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F-E271F, S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N076D-S101G-S103A-V104I-A114V-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S024R-N043R-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-N043R-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, N076D-S101G-S103A-V104I-S128L-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, e N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00060] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-L217E-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, N043R-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-

S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N043R-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S101G-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S101G-S103A-V104I-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, N076D-S101G-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, e N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por

correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00061] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: H017R-T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, H017R-T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, T022A-S101G-G102A-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, e T022A-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00062] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S101S-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103G-V104V-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103S-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103A-V104L-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103G-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103G-V104I-A158E-

S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103S-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103S-V104V-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103S-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103S-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104L-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103A-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103S-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103S-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103A-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103G-V104V-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, e S101S-S103A-V104V-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00063] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: V026F-V051W-V104L-S106E, V026F-L031F-S078N-G102A-S160D, G020K-G100S-N116L-A158E-S166D-N243F, T033S-N043W-N218D-P239G-N243F, T022L-T038F-A048R-N062E-G100S-R186K, S101D-S103N-N116L-S144R-A215D, V104L-S105T-T213A-L217E-S256N, N043W-S101D-S212M-N243F, V026F-A048R-S105T-T213A-N218D-T224A, S024F-S101D-G118R-A215D-L250I-A272F, V121F-N185E-T224A-P239G, T022L-L031F-G102A-S128D-T224A-N243F, N062E-S078N-G102A-N116L-S144R-L250I, T022L-T038F-V121F-S160D-A272F, V026F-S078N-G159C-R186K-N243F, S024F-A048R-G118R-S166D-L217E, G023A-T038F-S078N-G100S-S212M-A215D, G100S-N116L-A158E-T213A, S078N-

V104L-G118R-S128D, G102A-S103N-S105T-A194E, T022L-S078N-S128D-T213A, K027R-G100S-G118R-S160D-S188D-N243F, S024F-G102A-R186K-T213A-L217E-N243F, T033S-S105T-S188D-S216F, G023A-G100S-A194E-S212M, A048R-S128D-N185E-P239G, G020K-S024F-T033S-P129E-A194E, G020K-K027R-P129E-S166D-P239G, T022L-G023A-K027R-S101D-V104L-S216F, T033S-G118R-P129E-A194E-P239G, T022L-S078N-N116L-P129E-S256N, K027R-S101D-S103N-S105T-A272F, A048R-S078N-N116L-N185E-L217E-P239G, G023A-S024F-K027R-N062E, S024F-S103N-V104L-G118R-S188D, V026F-V104L-S256N-A272F, S024F-N043W-V104L-V121F-P129E, N062E-S078N-N116L-T224A, G023A-S024F-V051W-A158E, K027R-T038F-G102A-N116L, N062E-S078N-S144R-S212M, L031F-N116L-S256N-A272F, T022L-T033S-V104L-N116L-S160D-R186K, S024F-G118R-P129E-R186K-T213A, N043W-S105T-T213A-A215D-S216F, L031F-S105T-R186K-S188D, V026F-A194E-T213A-S256N, e S103N-S160D-L250I-S256N, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00064] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S024R-S103A-V104I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D, T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-

P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D, T022A-N043R-S101D-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S024R-N043R-S101D-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-N248D, T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S024R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-N062E-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-S103A-V104I-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F, T022A-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-S128I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-N043R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S103A-V104I-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-S103A-V104I-S128I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101D-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S024R-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D, T022A-N062E-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-N043R-S101D-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-L217D-A232V, T022A-S024R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D, T022A-S024R-N043R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F, e T022A-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-

Q245R-N248D-E271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00065] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020K-S024F-N062E-S188D-P239G, S024F-N062E-N116L-P239G, G020K-G023A-N062E-S188D, G020K-G023A-S024F-N062E-G118R-S188D-T213A, G020K-N043W-N062E-N116L-S188D-T213A-P239G, G023A-N062E-N116L-G118R, G023A-S024F-N062E-N116L-G118R, S024F-N116L, S024F-N062E-S188D-T213A, G023A-N062E-N116L-G118R-S188D-P239G, G020K-S024F-N062E, G020K-N043W-N062E-N116L-P239G, S024F-N062E-N116L-T213A-P239G, G020K-S024F-N043W-N062E-N116L-T213A, G020K-G023A-S024F-N062E-N116L-S188D-T213A, S024F-N062E-S188D-P239G, G023A-N043W-N062E-N116L-G118R-T213A, N062E-S188D-P239G, G020K-S024F-N062E-P239G, S024F-N116L-G118R-S188D-P239G, G020K-G023A-N062E-N116L-G118R-T213A, G020K-G023A-S024F-N062E-S188D-T213A-P239G, S024F-N043W-G118R-S188D, G023A-S024F-N116L-G118R-S188D-T213A, G020K-G023A-N043W-N116L-S188D-T213A-P239G, G023A-S024F-N116L-S188D-P239G, G023A-N043W-N116L-G118R-S188D, G023A-S024F-G118R-S188D-P239G, G023A-S024F-N043W-N062E-N116L-G118R, G020K-N043W-S188D-T213A, S024F-N062E-G118R-P239G, G023A-N043W-S188D-T213A, G020K-S024F-N043W-N062E-N116L-G118R-S188D-P239G, G020K-N116L-S188D-P239G, G020K-N043W-N062E-G118R, G020K-N043W-N116L-S188D-T213A, G020K-S024F, G023A-N043W-N116L-P239G, G023A-S024F-N043W-N116L-G118R-S188D-P239G,

G020K-G023A-N043W-T213A, e G023A-S024F-N062E-G118R-T213A-P239G, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00066] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020K-G023A-N043W-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D, S024F-G118R-S128I-P129E-G159D, G020K-S024F-N062E-N116L-G118R-S188D, G020K-N062E-N116L-S188D, N062E-N116L-G118R-T213A, G020K-G023A-N062E-N116L-S188D, N062E-N116L-G118R-S188D, G020K-N062E-N116L-T213A, G020K-G023A-N062E-N116L, G020K-N062E-S188D-T213A, G020K-N062E, G020K-S024F-N062E-N116L-S188D, G020K-N043W-N062E-N116L-S188D, G020K-S024F-N062E-S188D-T213A, N062E-N116L-S188D-T213A, G020K-N062E-N116L, G020K-G023A-N062E-N116L-S188D-T213A, G023A-S024F-N062E-N116L-T213A, T022A-N043R-S103A-V104I-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, S024F-N062E-N116L-S188D, T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D, G023A-N062E-N116L-S188D, N043W-N062E-N116L, G020K-G023A-N116L-S188D, N043W-N062E-N116L-S188D, S024F-N062E-N116L, N062E-N116L-S188D, e T022A-S024R-S103A-V104I-S128I-G159D-S188D-A232V-N248D, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00067] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S087R-S101G-S103A-V104I-Q109R-S212P-A232V-Q245R-E271V, S101G-S103A-V104I-Q109R-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-Q109R-S212P-A232V-Q245R-E271V, S101G-S103A-V104I-Q109R-S212P-A232V-Q245R, N076D-S87R-S103A-V104I-S212P-E271V, N076D-S103A-V104I-Q109R, N076D-S103A-V104I-S212P-E271V, N076D-S103A-V104I-Q109R-Q245R, e N076D-S103A-V104I-S212P-Q245L-E271V, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00068] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S024R-P086W-G118R, S024R-S078R-P086W-N243F, S024R-T033S-P086S-S087N-Y209A, T033S-G118R, S024R-S078R-P086W-G118R-A270T, S024R-T033S-P086W-G118R, S078R-P086W-N243F, T033S-S078R-P086W-G118R-Y209A, T033S-S078R-Y209A, P086W-G118R-N243F, S024R-P086W, S078R-P086W-K235F, S024R-G118R, S024R-P086R, S101G-S103A-V104I-A232V, S024R-T033S-S078R-P086W-G118R, S024R-G118R-Y209A, Y209A-W241R, T033S-P086W-N243F, T033S-A172V-Y209A, G118R-Y209A-N243F, S024R-P086S-S141G, S024R-G118R-Y209A-N243F, S024R-T033S-P086S-S085N-K235F, S024R-T033S-A133V, S024R-T033S-S078R-P086W, S024R-P086W-Y209A, S024R-W241R, T033S-G118R-N243F, S024R-K235F, S024R-S078R-P086W, S024R-G118R-

Y209A-K235F, S024R-Y209A-W241R, T033S-G118R-W241R, P086W-G118R-Y209A, T033S-G118R-G159D-Y209A, T033S-S078R-P086W, S024R-P086W-N243F, G118R-Y209A, S024R-P086W-G118R-V203I, S078R-Y209A-K235F, S024R-T033S-W241R, S078R-G118R, T033S-G118R-Y209A-N243F, L021M-S024R-T033S, S024R-T033S-P086W, T033S-K235F, S078R-P086W-Y209A, S024R-T033S-Y209A-K235F, T033S-P086W-G118R, S024R-T033S-S078R-Y209A, T033S-P086W-G118R-Y209A-N243F, P086W-Y209A-N243F, P005S-S078R-G118R-W241R, S024R-A174T, T033S-Y209A-N243F, P086W-G118R-A133V, S024R-T033S-G118R, S024R-P086W-Y209A-K235F, P086W-Y209A, I008T-S024R, P086W-G118R, T033S-W241R, P005S-S024R-T033S-N243F, S024R-Y209A-S242P, S024R-T033S-S078R-G118R, S024R-T033S-A194T, S024R-N243F, S024R-Y209A, S024R-T033S-G118R-Y209A, T033S-P086W, S024R-T033S, S024R-T033S-S078R-N243F, P086W-N243F, T033S-G118D-A138V-Y209A, T033S-Y209A-K235F, S024R-P086R-G118R, T033S-P201S, S024R-P239Q, T033S-G118R-Y209A-, S078R-P086W, K235F-N243F, S024R-Y209A-K235F, G118R-A172V, H017Y-S024R-T033S-P086W, T033S-L148F, S024R-G118R-K235F, T033S-S078R, T033S-N243F, S024C-T033S, G118R-A194T, T033S-Y209A, G118R-Y209A-K235F, S024R-T033S-Y209A-N243F, S024R-T033S-K235F, S024R-T033S-G118R-K235F, S024R-S141G, S024R-T274I, S024R-T033S-Y209A, P086W-K235F, S024R-Y209A-N243F, V004E-T033S-S078R, P086W-Y209A-K235F, A015T-T033S, T033S-P086W-S156L-Y209A, S024R-G118R-N243F-R269H, Y209A-K235F, S024R-R247H, S024R-T033S-A228T, S078R-K235F, S024R-T033S-A174V-K235F, S024R-K235F-N243F, S024R-T033S-K235F-W241R, S024R-T033S-A151V, S024R-V104A, T033S-A048T, Q012H-V104A-G118R, G118R-K235F, T033S-T253A, T143A-Y209A, S024R-T033S-N243F, T033S-P239T, Y209A-N243F, S024R-T033S-P129H-N184D-T253M, S024R-A085V-P086W-G118R-K235F,

S024R-A272P, e S024R-R269C, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00069] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-S087D-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-V150L-H249R, N018R-S024R-N043R-N076D-S087D-H249R, N018R-S024R-N043R-N076D-V150L-H249R, N018R-S024R-N076D-S078R-S087D-H249R, N018R-S024R-N076D-S078R-V150L-H249R, N018R-S024R-N076D-S087D-H249R-N269R, N018R-S024R-N076D-S087D-S242R-H249R, N018R-S024R-N076D-S087D-V150L-H249R, N018R-S024R-N076D-V150L-H249R, N018R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, N018R-T022R-S024R-N076D-S087D-H249R, N018R-T022R-S024R-N076D-V150L-H249R, N043R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, S024R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, S078R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S078R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R-H249R, S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R-N269R, T022R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N043D-N076D-V150L-H249R, N043R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, T022R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, N018R-S024R-N043D-

N076D-S087D-H249R, N018R-S024R-N076D-S087D-H249R, N018R-S024R-N076D-V150L-S242R-H249R, N043R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R-N269R, N076D-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-S242R-Q245R, S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, N076D-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, e S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-S242R-Q245R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00070] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-S130A-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R,

S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, e S024R-K027R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00071] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S101G-S103A-V104I-A232V-M222Q-Q245R, S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-M222S-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-M222Q-A232V-Q245R-N248D-H249R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-M222Q-Q245R, S101G-S103A-V104I-A232V-M222S-Q245R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-M222S-Q245R, e N076D-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-M222S-A232V-Q245R-N248D-H249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00072] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129Q-S130A-A158E-

S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-N183D-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S128L-S130A-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-S130A-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271G, S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, e S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00073] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S101G-S103A-V104I, T22A-S101A-Y209E, S103G-L111V-G159E, T22A-S103G-G159E, T22A-L111V-G159E, T22A-S128N-E271F-Y209E, T22A-S103G-L111V, N62E-L111V-S128N, T22A-L111V-S128N, T22A-N62E-L111V, S101A-S103G-V104L-S188D, S101G-S103A-V104I-G159D, S101A-S103G-V104L-S128N, T22A-S101A-G159E, S101A-S103G-V104L, S101A-

S103G-V104L-G159E, T22A-S101A-S103G-V104L, S101A-S103G-V104L-Y209E, T22A-Y209E-E271F, T22A-S101A-E271F, e S101A-Y209E-E271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00074] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S103A-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N252K, e S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00075] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N238R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N248R,

S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-T253R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-S24R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N76D, S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-E271F, T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R, e N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00076] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: A1R, A230E, E271L, G115R, G20R, H249R, K235F, K27V/F/L, L75E, L82R, N18R, N269R, N43D, N43R, N76D, R45T, S212F, S242R, S24R, S78R, S9A, T22R, V121E, V244R, V28E, V30E, V4R, W241R, G20R-N43R-H249R, G20R-T22R-N43R, G20R-N43R-S242R, G20R-N43R-E271L, G20R-N43R-V244R, G20R-S24R-N43R-S242R, S9A-T22R-S78R-S212F-W241R, S9A-G20R-N43R-S212F, S9A-N43R-S212F, G20R-N43R-S212F, G20R-T22R-N43R-S212F, S24R-S78R-S212F, S9A-N43R-S78R, S9A-N43R-S78R-S242R, S9A-G20R-N43R-S78R, G20R-S24R-N43R-S78R-S242R, T22R-S24R-S78R-S212F, S9A-G20R-N43R-S78R-S242R, G20R-N43R-S78R-H249R, G20R-N43R-S78R, S9A-S78R-S212F, S9A-T22R-N43R-S78R, S9A-G20R-S24R-N43R, S9A-T22R-S78R-

S212F, V4R-S9A-T22R-S78R-S212F, G20R-S24R-N43R, A1R-S9A-N43R, G20R-S24R-N43R-G115R, S9A-S24R-N43R, G20R-T22R-S24R-N43R, A1R-S24R-N43R, S9A-G20R-S24R-N43R-S242R, S9A-G20R-T22R-S78R-S212F, S9A-S24R-N43R-V244R, S9A-S24R-N43R-S242R, V4R-S9A-T22R-S24R-S212F, e T22R-S24R-N43R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00077] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-G159R-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248R, S101G-S103A-V104I-G159R-A232V-Q245R-N248R, S101G, S103A, V104I, A232V, Q236H, e Q245R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00078] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: A16S, T22A, S24R, N62E, N76D, E89P, S101A/G, S103G/A, V104L/I, L111V, S128N, P129E, A232V, L148I, A158E, G159D/E, R186H, S188D, Y209E, Q236H, Q245R, N248D/R, H249R, N252K/R, T253R, e E271F sendo que as posições

de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00079] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: A1R, Q2S, Q2M, Q2A, Q2R, Q2W, S3R, V4R, V4S, V4C, I8A, S9A, S9F, S9W, R10S, R10A, R10H, R10M, Q12F, Q12R, P14K, P14F, P14Q, A15R, A15F, A16S, H17R, H17M, H17F, N18R, N18K, G20F, G20K, G20R, T22A, T22R, T22Y, T22V, T22Q, T22L, T22W, G23A, G23S, G23F, S24R, S24F, S24W, S24Q, S24H, S24L, G25V, G25F, G25R, V26F, K27L, K27F, K27R, K27V, V28A, V28N, V28E, A29T, V30E, L31F, T33S, T33G, T33D, G34P, I35M, S36T, S36F, S36R, T38L, T38F, T38R, P40N, P40L, P40T, P40W, P40H, P40R, L42I, N43A, N43F, N43I, N43S, N43R, N43M, N43W, N43D, R45T, G46R, A48R, F50C, V51W, V51F, V51H, P52F, P52E, P52N, P55Y, T57R, Q59A, Q59F, Q59R, D60P, D60Q, D60A, N62E, N62Q, G63V, G63M, G63T, G63I, G63A, G63S, G63H, G63Q, G63D, G63E, G63P, H64F, H64T, V68A, V68C, A69N, A69T, A69P, A69W, T71G, T71G, I72C, A74C, L75A, L75F, L75E, L75R, N76D, S78R, S78N, S78I, S78R, I79W, I79Q, V81R, L82F, L82T, L82V, L82R, L82M, A85M, P86W, P86L, P86I, E89P, E89T, E89G, E89H, E89W, E89L, E89V, E89W, E89F, E89I, Y91N, Y91F, A92F, K94N, S99F, S99T, S99P, S99G, S99M, G100S, G100N, G100Q, G100I, S101A, S101N, S101G, S101D, S101T, S101D, S101E, S101P, S101F, G102A, G102T, G102N, G102H, G102E, S103G, S103N, S103D, S103A, V104L, V104I, V104E, V104D, S105T, S105E, S105Q, S106G, S106T, S106E, S106D, S106A, S106V, S106F, I107M, I107F, A108I, A108G, Q109M, L111V, L111I, E112V, E112L,

E112Q, A114G, G115K, G115R, N116K, N116A, N116L, N117F, G118R, G118I, M119C, H120A, H120F, H120R, V121F, V121F, V121E, N123G, N123E, L124S, S128D, S128F, S128L, S128N, S128H, S128M, S128I, S128Q, P129E, S132A, S132E, A138G, S144R, V147L, L148I, A158E, G159D, G159E, G159C, S160D, S166D, S166E, Y167W, M175V, V177C, D181A, Q182R, N183I, N183D, N183M, N183R, N183F, N183R, N185E, N185V, N185I, R186H, R186K, S188E, S188D, S188R, Y192H, Y192W, A194E, A194V, A194F, D197F, D197F, I198L, I198F, V203E, V203C, T208S, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, Y209L, P210R, P210V, P210L, G211Q, G211R, S212I, S212M, S212F, T213A, Y214F, A215N, A215D, A215E, A215H, A215F, S216F, S216A, L217E, L217N, L217D, N218D, N218P, N218E, T224A, T224G, V227I, A230E, A231I, A231C, A232V, L233C, V234F, K235F, Q236F, Q236N, Q236H, N238R, N238K, N238L, P239K, P239G, P239R, P239R, P239H, P239T, P239N, P239S, P239F, S240R, W241R, S242L, S242R, N243F, N243R, V244R, Q245R, I246S, N248D, N248V, N248I, N248R, H249R, H249T, L250I, K251R, K251S, N252I, N252F, N252R, N252K, N252H, T253I, T253R, T253F, A254C, S256N, G258R, T260V, T260I, L262D, L262H, Y263F, S265F, L267V, L267N, L267M, N269I, N269R, A270C, E271I, E271H, E271V, E271H, E271M, E271L, E271P, E271A, E271F, E271T, A272F, A272F, A272R, A273F, A273I, e T274G, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[00080] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de protease da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, sendo que a protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* compreende a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:2, sendo que a variante de

protease compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou 25 mutações nas posições de aminoácido selecionadas a partir do aminoácido 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 38, 40, 42, 43, 45, 46, 48, 50, 51, 52, 55, 57, 59, 60, 62, 63, 64, 68, 69, 71, 72, 74, 75, 76, 78, 79, 81, 82, 85, 86, 89, 91, 92, 94, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 111, 112, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 123, 124, 128, 129, 132, 138, 44, 147, 148, 158, 159, 160, 166, 167, 175, 177, 181, 182, 183, 185, 186, 188, 192, 194, 197, 198, 203, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 224, 227, 230, 231, 233, 234, 235, 236, 236, 238, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 246, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 256, 258, 260, 262, 263, 265, 267, 269, 270, 271, 272, 273, e 274, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1, sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1 como determinado por alinhamento da sequência de aminoácidos da protease variante com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[00081] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de protease de protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, sendo que a protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* compreende a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:2, sendo que a variante de protease compreende uma sequência de aminoácidos que difere da

sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2, em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou 25 mutações selecionadas do grupo de A1R, Q2S, Q2M, Q2A, Q2R, Q2W, S3R, V4R, V4S, V4C, I8A, S9A, S9F, S9W, R10S, R10A, R10H, R10M, Q12F, Q12R, P14K, P14F, P14Q, A15R, A15F, A16S, H17R, H17M, H17F, N18R, N18K, G20F, G20K, G20R, T22A, T22R, T22Y, T22V, T22Q, T22L, T22W, G23A, G23S, G23F, S24R, S24F, S24W, S24Q, S24H, S24L, G25V, G25F, G25R, V26F, K27L, K27F, K27R, K27V, V28A, V28N, V28E, A29T, V30E, L31F, T33S, T33G, T33D, G34P, I35M, S36T, S36F, S36R, T38L, T38F, T38R, P40N, P40L, P40T, P40W, P40H, P40R, L42I, N43A, N43F, N43I, N43S, N43R, N43M, N43W, N43D, R45T, G46R, A48R, F50C, V51W, V51F, V51H, P52F, P52E, P52N, P55Y, T57R, Q59A, Q59F, Q59R, D60P, D60Q, D60A, N62E, N62Q, G63V, G63M, G63T, G63I, G63A, G63S, G63H, G63Q, G63D, G63E, G63P, H64F, H64T, V68A, V68C, A69N, A69T, A69P, A69W, T71G, T71G, I72C, A74C, L75A, L75F, L75E, L75R, N76D, S78R, S78N, S78I, S78R, I79W, I79Q, V81R, L82F, L82T, L82V, L82R, L82M, A85M, P86W, P86L, P86I, E89P, E89T, E89G, E89H, E89W, E89L, E89V, E89W, E89F, E89I, Y91N, Y91F, A92F, K94N, S99F, S99T, S99P, S99G, S99M, G100S, G100N, G100Q, G100I, S101A, S101N, S101G, S101D, S101T, S101D, S101E, S101P, S101F, G102A, G102T, G102N, G102H, G102E, S103G, S103N, S103D, S103A, V104L, V104I, V104E, V104D, S105T, S105E, S105Q, S106G, S106T, S106E, S106D, S106A, S106V, S106F, I107M, I107F, A108I, A108G, Q109M, L111V, L111I, E112V, E112L, E112Q, A114G, G115K, G115R, N116K, N116A, N116L, N117F, G118R, G118I, M119C, H120A, H120F, H120R, V121F, V121F, V121E, N123G, N123E, L124S, S128D, S128F, S128L, S128N, S128H, S128M, S128I, S128Q, P129E, S132A, S132E, A138G, S144R, V147L, L148I, A158E, G159D, G159E,

G159C, S160D, S166D, S166E, Y167W, M175V, V177C, D181A, Q182R, N183I, N183D, N183M, N183R, N183F, N183R, N185E, N185V, N185I, R186H, R186K, S188E, S188D, S188R, Y192H, Y192W, A194E, A194V, A194F, D197F, D197F, I198L, I198F, V203E, V203C, T208S, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, Y209L, P210R, P210V, P210L, G211Q, G211R, S212I, S212M, S212F, T213A, Y214F, A215N, A215D, A215E, A215H, A215F, S216F, S216A, L217E, L217N, L217D, N218D, N218P, N218E, T224A, T224G, V227I, A230E, A231I, A231C, A232V, L233C, V234F, K235F, Q236F, Q236N, Q236H, N238R, N238K, N238L, P239K, P239G, P239R, P239R, P239H, P239T, P239N, P239S, P239F, S240R, W241R, S242L, S242R, N243F, N243R, V244R, Q245R, I246S, N248D, N248V, N248I, N248R, H249R, H249T, L250I, K251R, K251S, N252I, N252F, N252R, N252K, N252H, T253I, T253R, T253F, A254C, S256N, G258R, T260V, T260I, L262D, L262H, Y263F, S265F, L267V, L267N, L267M, N269I, N269R, A270C, E271I, E271H, E271V, E271H, E271M, E271L, E271P, E271A, E271F, E271T, A272F, A272F, A272R, A273F, A273I, e T274G, sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1 como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[00082] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de protease de protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, sendo que a protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* compreende a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:2, sendo que a variante de protease compreende uma sequência de aminoácidos que difere da

sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou 25 mutações selecionadas do grupo de A1R, Q2S, V4R, V4S, S9A, R10S, P14K, A16S, H17R, N18R, G20R, T22A, T22R, S24R, S24W, G25R, G25V, V26F, L42I, N43R, N43A, G46R, P52F, P52E, P52N, T57R, Q59A, N62E, N62Q, V68A, V68C, T71G, I72C, A74C. L75A, L75F, L75R, N76D, S78R, L82R, P86W, E89P, E89T, E89G, E89H, E89I, E89V, E89W, Y91N, K94N, G100S, S101A, S101N, S101G, S101D, S103G, S103N, V104L, V104I, S106V, S106G, A108I, L111V, E112V, G115K, G115R, N117F, G118I, V121F, S128D, S128F, S128L, S128N, P129E, S144R, L148I, A158E, G159E, S160D, S166D, N185E, N185I, R186H, S188E, S188D, D197F, V203E, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, P210R, S212I, S212F, Y214F, A215N, A215D, A215E, L217E, L217N, T224A, A230E, A231I, Q236F, N238R, N238K, P239K, P239G, P239R, P239S, W241R, S242R, S242L, N243R, V244R, N248I, N248V, H249R, L250I, N252R, T253R, L262D, Y263F, S265F, L267V, L267N. N269I, N269R, E271F, E271I, E271H, E271P, E271T, E271V, E271L e A272F, e compreende, opcionalmente, pelo menos uma mutação selecionada a partir do grupo de S103A, G159D, Q236H, Q245R, N248D e N252K, sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[00083] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de protease de protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, sendo que a protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* compreende a sequência

de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:2, sendo que a variante de protease compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou 25 mutações selecionadas do grupo de A16S, T22A, S24R, N62E, N76D, E89P, S101A/G, S103G/A, V104L/I, L111V, S128N, P129E, A232V, L148I, A158E, G159D/E, R186H, S188D, Y209E, Q236H, Q245R, N248D/R, H249R, N252K/R, T253R, e E271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[00084] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de protease de protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, sendo que a protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* compreende a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:2, sendo que a variante de protease compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou 25 mutações selecionadas do grupo de G20K, G20R, G23A, S24F, S24R, N43R, N43W, R45T, N62E, N76D, S101A, N116A, N116L, G118R, S128I, P129E, S166D, S188D, T213A, A215F, L217E, P239G, e N269R, sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequên-

cia de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[00085] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de protease de protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, sendo que a protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* compreende a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:2, sendo que a variante de protease compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou 25 mutações selecionadas do grupo de A1R, A230E, E271L, G115R, G20R, H249R, K235F, K27V/F/L, L75E, L82R, N18R, N269R, N43D, N43R, N76D, R45T, S212F, S242R, S24R, S78R, S9A, T22R, V121E, V244R, V28E, V30E, V4R, e W241R, sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[00086] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de protease de protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, sendo que a protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* compreende a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:2, sendo que a variante de protease compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou 25 mutações selecionadas do grupo de A1R, A230E, E271L, G115R, G20R, H249R, K235F, K27V/F/L, L75E, L82R, N18R, N269R, N43D, N43R, N76D, R45T, S212F, S242R,

S24R, S78R, S9A, T22R, V121E, V244R, V28E, V30E, V4R, e W241R, e compreende, opcionalmente, pelo menos uma mutação selecionada a partir do grupo de S103A, G159D, Q236H, Q245R, N248D e N252K, sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[00087] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de protease que compreendem uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2, e sendo que a carga líquida total da variante de protease é 0, +1, +2, +3, +4, +5, -1, -2, -3, -4, ou -5 em relação à carga líquida total da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, e sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*. Em alguns casos, a carga líquida total da variante de protease é 0 em relação à carga líquida total da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*. Em alguns casos, a carga líquida total da variante de protease é -5 em relação à carga líquida total da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*. Em alguns casos, a carga líquida total da variante de protease é -4 em relação à carga líquida total da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*. Em alguns casos, a carga líquida total da variante de protease é -3 em relação à carga líquida total da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*. Em

alguns casos, a carga líquida total da variante de protease é -2 em relação à carga líquida total da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*. Em alguns casos, a carga líquida total da variante de protease é -1 em relação à carga líquida total da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*. Em alguns casos, a carga líquida total da variante de protease é +1 em relação à carga líquida total da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*. Em alguns casos, a carga líquida total da variante de protease é +2 em relação à carga líquida total da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*. Em alguns casos, a carga líquida total da variante de protease é +3 em relação à carga líquida total da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*. Em alguns casos, a carga líquida total da variante de protease é +4 em relação à carga líquida total da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*. Em alguns casos, a carga líquida total da variante de protease é +5 em relação à carga líquida total da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*. Em alguns casos, a carga líquida total da variante de protease é diferente de 0 (isto é, a carga líquida total da protease não é neutra).

[00088] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de protease que têm uma ou mais das seguintes características: a) um índice de desempenho no método de teste 2 de pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de 1,1 a cerca de 10, de 1,1 a cerca de 8, ou mesmo de 1,1 a cerca de 5; b) um índice de desempenho no método de teste 3 de pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de 1,1 a cerca de 10, de 1,1 a cerca de 8, ou mesmo de 1,1 a cerca de 5; c) um índice de desempenho no método de teste 4 de pelo menos 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo

menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de 1,0 a cerca de 10, de 1,0 a cerca de 8, ou mesmo de 1,0 a cerca de 5; e/ou d) um índice de desempenho no método de teste 6 de pelo menos 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de 1,0 a cerca de 10, de 1,0 a cerca de 8, ou mesmo de 1,0 a cerca de 5.

[00089] A presente invenção fornece, adicionalmente, ácidos nucleicos isolados que compreendem sequências de polinucleotídeos que codificam as variantes de subtilisina aqui fornecidas. A presente invenção fornece, adicionalmente, vetores de expressão compreendendo as sequências de ácidos nucleicos que codificam as variantes de subtilisina aqui fornecidas. Em algumas modalidades adicionais, o ácido nucleico no vetor de expressão está ligado operacionalmente a um promotor. A presente invenção fornece, adicionalmente, células hospedeiras que compreendem os vetores de expressão aqui fornecidos. Em algumas modalidades, as células hospedeiras são células hospedeiras de *Bacillus*. Em algumas modalidades adicionais, as células hospedeiras são células hospedeiras de *B. subtilis*.

[00090] A presente invenção fornece, adicionalmente, métodos para produzir pelo menos uma variante de subtilisina, que compreendem: transformar uma célula hospedeira com um vetor de expressão que compreende pelo menos um ácido nucleico que codifica pelo menos uma variante de subtilisina aqui fornecida para produzir uma célula hospedeira transformada; e cultivar a célula hospedeira transformada sob condições adequadas para a produção de pelo menos uma variante de subtilisina, para produzir pelo menos uma variante de subtilisina. Em algumas modalidades, os métodos compreendem, adicionalmente, coletar a variante de subtilisina produzida. Em algumas modalidades adicionais, o ácido nucleico no vetor de expressão está ligado operaci-

onalmente a um promotor. Em algumas modalidades adicionais, o ácido nucleico no vetor de expressão está ligado operacionalmente a um promotor. A presente invenção fornece, adicionalmente, células hospedeiras que compreendem os vetores de expressão aqui fornecidos. Em algumas modalidades, as células hospedeiras são células hospedeiras de *Bacillus*. Em algumas modalidades adicionais, as células hospedeiras são células hospedeiras de *B. subtilis*.

[00091] As variantes de protease da presente invenção podem também ser usadas em produtos para cuidados com tecidos e com a casa que compreendem pelo menos uma variante de subtilisina aqui fornecida. Em algumas modalidades, o produto para cuidados de tecidos e da casa é uma composição de limpeza. Em algumas modalidades adicionais, a composição de limpeza é uma composição granular, em pó, sólida, em barra, líquida, em tablete, gel, ou pasta. Em algumas modalidades adicionais, a composição de limpeza é uma composição detergente. Em algumas modalidades ainda adicionais, a composição de limpeza é uma composição detergente para água fria, uma composição detergente com baixo pH, ou uma composição detergente compacta. Em algumas modalidades adicionais, a composição de limpeza é uma composição detergente para lavagem de roupas, uma composição detergente para lavagem de pratos e/ou uma composição de limpeza para superfícies duras. Em algumas modalidades, a composição detergente para lavagem de pratos é uma composição detergente para lavagem de louças à mão ou uma composição detergente para lavagem de louças automática. Em algumas modalidades adicionais, o produto para cuidados de tecidos e da casa compreende adicionalmente pelo menos um agente de alvejamento. Em algumas modalidades ainda adicionais, a composição de limpeza é isenta de fosfato, enquanto em outras modalidades, a composição de limpeza contém fosfato. Em algumas modalidades adicionais, o produto para cuidados de

tecidos e da casa compreende adicionalmente pelo menos uma enzima adicional. Em ainda algumas modalidades adicionais, a pelo menos uma enzima adicional é selecionada a partir de hemicelulases, celulasas, peroxidases, proteases, metaloproteases, xilanases, lipases, fosfolipases, esterases, peridrolases, cutinases, pectinases, pectatolases, mananases, queratinases, redutases, oxidases, fenoloxidasas, lipoxigenases, ligninases, pululanases, tanases, pentosanases, malanases, β -glucanases, arabinosidasas, hialuronidasas, condroitinasas, lacases, e amilases, ou qualquer combinação das mesmas. Em algumas modalidades, os produtos para cuidados com tecidos e com a casa compreendem pelo menos uma variante de subtilisina que não é uma protease para água fria.

[00092] A presente invenção fornece, adicionalmente, composições de limpeza que compreendem pelo menos uma variante de subtilisina. Em algumas modalidades, as composições de limpeza são composições granulares, em pó, sólidas, em barra, líquidas, em tablete, gel, ou pasta. Em algumas modalidades adicionais, as composições de limpeza são composições detergentes. Em ainda algumas modalidades adicionais, as composições de limpeza são composições detergentes para água fria, composições detergentes de baixo pH, e/ou composições detergentes compactas. Em algumas modalidades adicionais, as composições de limpeza são composições detergentes para lavagem de roupas, composições detergentes para lavagem de pratos, e/ou composições para limpeza de superfícies duras. Em algumas modalidades adicionais, os detergentes para lavagem de prato são composições detergentes para lavagem de pratos à mão ou composições detergentes para lavagem de louças automática. Em algumas modalidades adicionais, as composições de limpeza são composições detergentes para lavagem de roupas. Em ainda algumas modalidades adicionais, as composições de limpeza compreendem adicionalmente pelo menos

um agente de alvejamento. Em algumas modalidades adicionais, as composições de limpeza são isentas de fosfato, enquanto em outras modalidades, as composições de limpeza contêm fosfato. Em algumas modalidades adicionais, as composições de limpeza compreendem adicionalmente pelo menos uma enzima adicional. Em ainda algumas modalidades adicionais, a pelo menos uma enzima adicional é selecionada a partir de hemicelulases, celulases, peroxidases, proteases, metaloproteases, xilanases, lipases, fosfolipases, esterases, peridrolases, cutinases, pectinases, pectato liases, mananases, queratinases, redutases, oxidases, fenoloxidasas, lipoxigenases, ligninases, pululanases, tanases, pentosanases, malanases, β -glucanases, arabinosidases, hialuronidasas, condroitinases, lacases, e amilases, ou qualquer combinação das mesmas. Em algumas modalidades, as composições de limpeza compreendem pelo menos uma variante de subtilisina que não é uma protease para água fria. Tal composição pode ser um produto para cuidados de tecidos e da casa ou tal composição pode não ser um produto para cuidados de tecidos e da casa.

[00093] A presente invenção fornece, adicionalmente, métodos de limpeza, que compreendem colocar uma superfície ou um item em contato com uma composição de limpeza que compreende pelo menos uma variante de subtilisina aqui fornecida. Em algumas modalidades, os métodos de limpeza compreendem colocar uma superfície ou um item em contato com pelo menos uma composição de limpeza aqui fornecida. Em algumas modalidades, os métodos compreendem adicionalmente enxaguar a superfície ou item após o contato da superfície ou item, respectivamente, com a composição de limpeza. Em algumas modalidades, o item é louça, enquanto em outras modalidades, o item é tecido. Em algumas modalidades, os métodos compreendem adicionalmente a etapa de enxaguar a superfície ou item após o contato da superfície ou item com a composição de limpeza. Em algumas modali-

dades adicionais, os métodos compreendem adicionalmente a etapa de secar uma superfície ou item após enxaguar a superfície ou item. Em algumas modalidades, as composições de limpeza compreendem pelo menos uma variante de subtilisina que não é uma protease para água fria.

[00094] A presente invenção apresenta métodos de limpeza de uma superfície ou item, que compreendem: fornecer a composição de limpeza aqui fornecida e uma superfície ou item que precisa ser limpa; e colocar a composição de limpeza em contato com a superfície ou item em necessidade de limpeza sob condições adequadas para a limpeza da superfície ou item, para produzir uma superfície ou item limpo. Em algumas modalidades, os métodos da presente invenção compreendem adicionalmente a etapa de enxaguar uma superfície ou item limpo para produzir uma superfície ou item enxaguado. Em algumas modalidades adicionais, os métodos compreendem adicionalmente a etapa de secar a superfície ou item enxaguado. Em algumas modalidades, as composições de limpeza compreendem pelo menos uma variante de subtilisina que não é uma protease para água fria.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[00095] A figura 1 fornece um alinhamento das proteases de referência maduras incluindo: BPN' (SEQ ID NO:1) e GG36 (SEQ ID NO:2). Cada posição de aminoácido de cada variante de protease aqui descrita, incluindo cada variante de protease para água fria, é numerada de acordo com a numeração da posição de aminoácido correspondente na sequência de aminoácidos de BPN' da protease subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* (SEQ ID NO: 1), conforme mostrado na figura 1, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos de BPN' da protease subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. Desta forma, exceto onde especificado em contrário, as posições da substitui-

ção são dadas em relação à BPN'.

[00096] A figura 2 fornece um mapa de pHPLT-GG36.

[00097] A figura 3 fornece um mapa de pRA68.

[00098] A figura 4 fornece um mapa de pRA96.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[00099] A presente invenção apresenta variantes de serina protease. Especificamente, a presente invenção fornece variantes de serina protease que possuem uma ou mais substituições em comparação a uma serina protease de referência. Além disso, a presente invenção apresenta composições que compreendem estas variantes de serina protease. Em algumas modalidades, a presente invenção apresenta composições de limpeza que compreendem pelo menos uma destas variantes de serina protease.

Definições

[000100] Exceto onde indicado em contrário, a prática da presente invenção envolve técnicas convencionais comumente usadas em biologia molecular, manipulação de proteínas, microbiologia e DNA recombinante, que estão dentro da perícia na técnica. Estas técnicas são conhecidas daqueles versados na técnica e são descritas em vários textos e trabalhos de referência bem conhecidos daqueles versados na técnica. Todas as patentes, pedidos de patente, artigos e publicações aqui mencionadas, tanto *anteriormente* quanto mais adiante neste documento, estão aqui expressamente incorporadas, a título de referência.

[000101] A menos que definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos usados na presente invenção têm o mesmo significado, conforme comumente compreendido pelo versado na técnica a qual a invenção pertence. Muitos dicionários técnicos são conhecidos daqueles versados na técnica. Embora quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes aos descritos aqui possam ser usados na

prática da presente invenção, alguns métodos e materiais adequados são descritos aqui. Consequentemente, os termos definidos imediatamente abaixo são mais completamente descritos por referência ao relatório descritivo como um todo. Além disso, para uso na presente invenção, os termos singulares "um", "uma", "o" e "a" incluem a referência ao plural, a menos que o contexto claramente indique de outro modo. Os intervalos numéricos incluem os números que definem o intervalo. Exceto onde indicado em contrário, os ácidos nucleicos são escritos da esquerda para a direita na orientação 5' para 3'; as sequências de aminoácido são escritas da esquerda para a direita na orientação amino para carbóxi, respectivamente. Deve ser compreendido que esta invenção não é limitada à metodologia, aos protocolos, e reagentes particulares descritos, uma vez que estes podem variar dependendo do contexto em que eles são usados pelos versados na técnica.

[000102] A prática da presente invenção emprega, exceto onde indicado em contrário, técnicas convencionais de purificação de proteínas, biologia molecular, microbiologia, técnicas de DNA recombinante e sequenciamento de proteínas, que estão no âmbito do conhecimento dos versados na técnica.

[000103] Além disso, os cabeçalhos aqui fornecidos não são limitações dos vários aspectos ou modalidades da invenção que podem ser tidos por referência ao relatório descritivo como um todo. Consequentemente, os termos definidos imediatamente abaixo são mais completamente definidos por referência ao relatório descritivo como um todo. Contudo, de modo a facilitar o entendimento da invenção, inúmeros termos são definidos abaixo.

[000104] Para uso na presente invenção, os termos "protease" e "proteinase" referem-se a uma proteína enzimática que tem a capacidade de decompor outras proteínas. Uma protease tem a capacidade de conduzir "proteólise", que começa o catabolismo proteico por hidró-

lise das ligações peptídicas que unem os aminoácidos em uma cadeia peptídica ou polipeptídica que forma a proteína. Esta atividade de uma protease como uma enzima que digere proteínas é chamada de "atividade proteolítica". Existem muitos procedimentos bem conhecidos para medir a atividade proteolítica (*vide, por exemplo*, Kalisz, "Microbial Proteinases," *In*: Fiechter (ed.), Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, (1988)). Por exemplo, a atividade proteolítica pode ser confirmada por testes comparativos que analisam a capacidade da respectiva protease de hidrolisar um substrato comercial. Exemplos de substratos úteis na análise da atividade de protease ou proteolítica, incluem, mas não se limitam a, dimetil caseína (Sigma C-9801), colágeno bovino (Sigma C-9879), elastina bovina (Sigma E-1625), e queratina bovina (ICN Biomedical 902111). Testes colorimétricos que usam estes substratos são bem conhecidos na técnica (*vide, por exemplo*, WO 99/34011 e patente US nº 6.376.450, ambos dos quais estão aqui incorporados a título de referência). O teste de pNA (*vide, por exemplo*, Del Mar *et al.*, Anal. Biochem. 99:316-320 [1979]) também é usado ao determinar a concentração de enzimas ativas para frações coletadas durante a eluição gradiente. Este teste mede a taxa na qual a p-nitroanilina é liberada conforme a enzima hidrolisa o substrato sintético solúvel, succinil-alanina-alanina-prolina-fenilalanina-p-nitroanilida (suc-AAPF-pNA). A taxa de produção da cor amarela a partir da reação de hidrólise é medida a 410 nm em um espectrofotômetro e é proporcional à concentração de enzimas ativas. Além disso, as medições de absorbância a 280 nanômetros (nm) podem ser usadas para determinar a concentração total de proteínas. A razão enzimas ativas/proteínas totais indica a pureza da enzima.

[000105] Para uso na presente invenção, o termo "subtilisina" se refere a qualquer membro da família de serina proteases S8, conforme descrito em MEROPS - The Peptidase Data base (*vide*, Rawlings *et*

al., MEROPS: the peptidase database, Nucl. Acids Res., número da base de dados 34, D270-272 [2006]). Conforme descrito neste documento, a família de peptidases S8 contém a subtilisina de serina endopeptidase e seus homólogos (Rawlings e Barrett, Biochem. J., 290:205-218, [1993]). A família S8, também conhecida como a família da subtilase, é a segunda maior família de serina peptidases. As estruturas terciárias para vários membros da família S8 foram agora determinadas. Uma estrutura de proteína S8 típica consiste em três camadas com uma folha β com sete fitas entre duas camadas de hélices. A subtilisina (S08.001) é a estrutura tipo para o clã SB (SB). Apesar da estrutura diferente, os sítios ativos da subtilisina e quimotripsina (S01.001) podem ser sobrepostos, o que sugere que a similaridade é o resultado de evolução convergente e não divergente.

[000106] Para uso na presente invenção, os termos "variante de protease", "protease variante", "serina protease variante", "variante de serina protease", "variante de subtilisina", "protease mutante", são usados com relação a proteases que são similares a uma protease de referência (que pode ser uma protease subtilisina selvagem), particularmente, na sua função, mas tendo mutações na sua sequência de aminoácidos que as torna diferentes em sequência da protease selvagem ou de qualquer protease de referência inicial (*isto é*, protease "original") a partir da qual a protease variante é derivada. Em algumas modalidades, a presente invenção apresenta "variantes de GG36", (ou "variantes de subtilisina GG36") em que as mutações estão presentes na sequência madura de GG36 apresentada na SEQ ID NO:2. Entretanto, a protease de referência não se limita a qualquer sequência de aminoácidos particular. Além disso, pretende-se que o termo abranja variantes de uma protease original, em que a sequência da protease original é pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% idêntica à

sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

[000107] Para uso na presente invenção, o termo "variante de protease para água fria" significa uma variante de protease de uma protease original, em que a protease subtilisina GG36 de *B. lentus* tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2, sendo que a dita variante de protease tem uma ou mais das seguintes características: a) um índice de desempenho no método de teste 2 de pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de 1,1 a cerca de 10, de 1,1 a cerca de 8, ou mesmo de 1,1 a cerca de 5; b) um índice de desempenho no método de teste 3 de pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de 1,1 a cerca de 10, de 1,1 a cerca de 8, ou mesmo de 1,1 a cerca de 5; c) um índice de desempenho no método de teste 4 de pelo menos 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de 1,0 a cerca de 10, de 1,0 a cerca de 8, ou mesmo de 1,0 a cerca de 5; e/ou d) um índice de desempenho no método de teste 6 de pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de 1,0 a cerca de 10, de 1,0 a cerca de 8, ou mesmo de 1,0 a cerca de 5. O método de teste 2, o método de teste 3, o método de teste 4 e o método de teste 6 são explicitamente descritos abaixo na seção do Exemplo 1 intitulada "Métodos de teste". Além disso, pretende-se que o termo abranja variantes de uma protease original, em que a sequência da protease original é pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% idêntica à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

[000108] Em algumas modalidades da presente invenção, a protease original (*isto é*, protease "de referência" ou "inicial") é uma protease disponível para comercialização, incluindo, mas não se limitando às proteases vendidas sob as marcas registradas SAVINASE®, POLARZYME®, KANNASE®, LIQUINASE®, LIQUINASE ULTRA®, SAVINASE ULTRA®, OVOZYME®, (por Novozymes A/S); MAXACAL®, PROPERASE®, PURAFECT®, FN3®, FN4® e PURAFECT OXP®, PURAFAST™, PURAFECT® PRIME, PURAMAX® (por Danisco US, Genencor Division); e as disponíveis junto à Henkel/ Kemira, especificamente BLAP (sequência mostrada na figura 29 de US 5.352.604 com as seguintes mutações: S99D + S101 R + S103A + V104I + G159S, deste ponto em diante no presente documento chamadas de BLAP) e BLAP X (BLAP com S3T + V4I + V205I).

[000109] Para uso na presente invenção, o termo "polipeptídeo variante" se refere a um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácidos que difere em pelo menos um resíduo de aminoácidos da sequência de aminoácidos de um polipeptídeo original ou de referência (incluindo, mas não se limitando a, polipeptídeos selvagens).

[000110] Para uso na presente invenção, "o gênero *Bacillus*" inclui todas as espécies do gênero "*Bacillus*", conforme é de conhecimento dos versados na técnica, incluindo, mas não se limitando a *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. clausii*, *B. halodurans*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus*, e *B. thuringiensis*. É reconhecido que o gênero *Bacillus* continua a sofrer reorganização taxonômica. Desta forma, pretende-se que o gênero inclua espécie que foram reclassificadas, incluindo, mas não se limitando a organismos tais como *B. stearothermophilus*, que agora é chamado "*Geobacillus stearothermophilus*". A produção de endosporos resistentes na presença de oxigênio é considerada a característica que define o gênero

Bacillus, embora esta característica também se aplique aos recentemente nomeados *Alicyclobacillus*, *Amphibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Anoxybacillus*, *Brevibacillus*, *Filobacillus*, *Gracilibacillus*, *Halobacillus*, *Paenibacillus*, *Salibacillus*, *Thermobacillus*, *Ureibacillus*, e *Virgibacillus*. [000111] Os termos "polinucleotídeo" e "ácido nucleico", que são usados de maneira intercambiável na presente invenção, referem-se a um polímero com qualquer comprimento de monômeros de nucleotídeo ligados de modo covalente em uma cadeia. O DNA (ácido desoxirribonucleico), um polinucleotídeo que compreende desoxirribonucleotídeos, e RNA (ácido ribonucleico), um polímero de ribonucleotídeos, são exemplos de polinucleotídeos ou ácidos nucleicos que possuem função biológica distinta. Os polinucleotídeos ou ácidos nucleicos incluem, mas não se limitam a, DNA de fita simples, dupla, ou tripla, DNA genômico, cDNA, RNA, híbrido de DNA-RNA, ou um polímero que compreende bases purina e pirimidina, ou outras bases de nucleotídeo naturais, modificadas quimicamente, bioquimicamente, não-naturais ou derivatizadas. Os seguintes são alguns exemplos não limitadores de polinucleotídeos: genes, fragmentos de gene, fragmentos cromossômicos, sinalizador(es) de sequência expresso(s) (EST(s)), éxons, íntrons, RNA mensageiro (mRNA), RNA de transferência (tRNA), RNA ribossomal (rRNA), ribozimas, DNA complementar (cDNA), polinucleotídeos recombinantes, polinucleotídeos ramificados, plasmídios, vetores, DNA isolado de qualquer sequência, RNA isolado de qualquer sequência, sondas de ácido nucleico, e iniciadores. Em algumas modalidades, os polinucleotídeos compreendem nucleotídeos modificados, como, por exemplo, nucleotídeos metilados e análogos de nucleotídeo, uracila, outros açúcares e grupos de ligação como fluororibose e tioato, e ramificações de nucleotídeo. Em uma modalidade particular, uma sequência de nucleotídeos é interrompida por componentes não nucleotídeo.

[000112] Para uso na presente invenção, o termo "mutação" se refere a alterações feitas em uma sequência de aminoácidos ou ácido nucleico inicial. Pretende-se que o termo abranja substituições, inserções e deleções.

[000113] Para uso na presente invenção, o termo "vetor" refere-se a um construto de ácido nucleico ou construto de polinucleotídeo usado para introduzir ou transferir ácido nucleico(s) ou polinucleotídeo(s) para dentro de uma célula ou tecido alvo. Um vetor é usado tipicamente para introduzir DNA estranho em outra célula ou tecido. Um vetor compreende geralmente uma sequência de DNA que é um transgene e uma sequência de polinucleotídeo maior que serve como a "cadeia principal" do vetor. O vetor serve tipicamente para transferir informações genéticas, como, por exemplo, o transgene inserido, até uma célula ou tecido alvo de modo a isolar, multiplicar ou expressar o inserto na célula ou tecido alvo. Os vetores incluem plasmídios, vetores de clonagem, bacteriófagos, vírus (*por exemplo*, vetor viral), cosmídios, vetores de expressão, vetores de transporte, cassetes, e similares. Um vetor inclui tipicamente uma origem de replicação, um sítio de multiclonagem, e um marcador selecionável. O processo de inserção de um vetor em uma célula alvo é chamado tipicamente de transformação. A transfecção de uma célula com um vetor viral é tipicamente chamado de transdução. A presente invenção inclui, em algumas modalidades, um vetor que compreende uma sequência de DNA que codifica uma protease variante (*por exemplo*, protease variante precursora ou madura) que é operacionalmente ligada a uma pró-sequência adequada (*por exemplo*, sequência secretória, de peptídeo de sinal, etc.) capaz de efetuar a expressão da sequência de DNA em um hospedeiro adequado.

[000114] Para uso na presente invenção, o termo "cassete de expressão", "plasmídio de expressão" ou "vetor de expressão" se refere

a um construto ou vetor de ácido nucleico gerado de forma recombinante ou sinteticamente para a expressão de um ácido nucleico de interesse (*por exemplo*, um ácido nucleico estranho ou transgene) em uma célula alvo. O ácido nucleico de interesse expressa tipicamente uma proteína de interesse. Um vetor de expressão ou cassete de expressão compreende tipicamente uma sequência de nucleotídeos promotora que direciona ou promove a expressão do ácido nucleico estranho. O vetor ou cassete de expressão também inclui tipicamente quaisquer outros elementos de ácido nucleico especificados que permitem a transcrição de um ácido nucleico particular em uma célula alvo. Um cassete de expressão recombinante pode ser incorporado em um plasmídeo, cromossomo, DNA mitocondrial, DNA de plastídio, vírus, ou fragmento de ácido nucleico. Alguns vetores de expressão possuem a capacidade de incorporar e expressar fragmentos de DNA heterólogo em uma célula hospedeira. Muitos vetores de expressão procarióticos e eucarióticos estão comercialmente disponíveis. A seleção dos vetores de expressão adequados está dentro do conhecimento dos versados na técnica. A seleção de vetores de expressão adequados para expressão de uma proteína a partir de uma sequência de ácidos nucleicos incorporada no vetor de expressão está dentro do conhecimento daqueles versados na técnica.

[000115] Um construto de DNA é um segmento de ácido nucleico construído artificialmente que pode ser introduzido em uma célula ou tecido alvo. Um construto de DNA compreende tipicamente um inserto de DNA que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica uma proteína de interesse que foi subclonada em um vetor. O vetor pode conter genes de resistência bacteriana para crescimento em bactérias e um promotor para expressão da proteína de interesse em um organismo. O DNA pode ser gerado *in vitro* por PCR ou qualquer outra técnica adequada conhecida dos versados na técnica. Em algumas

modalidades, o construto de DNA compreende uma sequência de ácidos nucleicos de interesse. Em algumas modalidades, a sequência é operacionalmente ligada a elementos adicionais como, por exemplo, elementos de controle (*por exemplo*, promotores, etc.). O construto de DNA pode compreender, adicionalmente, um marcador selecionável e pode compreender, adicionalmente, uma sequência de entrada flanqueada por seções de homologia. O construto pode compreender outras sequências não homólogas adicionadas às extremidades (*por exemplo*, sequências "stuffer" ou flanqueadoras). Em algumas modalidades, as extremidades da sequência são fechadas para que o construto de DNA forme um círculo fechado. A sequência de ácidos nucleicos de interesse, que é incorporada ao construto de DNA com o uso de métodos bem conhecidos na técnica pode ser um ácido nucleico selvagem, mutante, ou modificado. Em algumas modalidades, o construto de DNA compreende uma ou mais sequências de ácidos nucleicos homólogas ao cromossomo da célula hospedeira. Em outras modalidades, o construto de DNA compreende uma ou mais sequências de nucleotídeos não homólogas. Uma vez que o construto de DNA for montado *in vitro*, ele pode ser usado, por exemplo, para: 1) inserir sequências heterólogas em uma sequência alvo desejada de uma célula hospedeira; e/ou 2) mutagenizar uma região do cromossomo da célula hospedeira (isto é, substituir uma sequência endógena por uma sequência heteróloga); 3) deletar genes alvo; e/ou 4) introduzir um plasmídio de replicação no hospedeiro. O "construto de DNA" é usado de maneira intercambiável na presente invenção com "cassete de expressão."

[000116] Para uso na presente invenção, um "plasmídio" refere-se a uma molécula de DNA extracromossômica que é capaz de se replicar independentemente do DNA cromossômico. Um plasmídio tem fita dupla (ds - "double stranded"), pode ser circular e é usado tipicamente

como um vetor de clonagem.

[000117] Para uso na presente invenção no contexto de introduzir uma sequência de ácidos nucleicos em uma célula, o termo "introduzido" refere-se a qualquer método adequado para transferir a sequência de ácidos nucleicos para dentro da célula. Tais métodos para a introdução incluem, mas não se limitam a fusão de protoplasto, transfecção, transformação, eletroporação, conjugação, e transdução (*vide, por exemplo*, Ferrari *et al.*, "Genetics", em Hardwood *et al.* (eds.), Bacillus, Plenum Publishing Corp., pp. 57-72 [1989]).

[000118] A transformação refere-se à alteração genética de uma célula que resulta da absorção, incorporação genômica, e expressão de material genético (*por exemplo*, DNA).

[000119] Para uso na presente invenção, um ácido nucleico é "operacionalmente ligado" a outra sequência de ácidos nucleicos quando ela é colocada em uma relação funcional com outra sequência de ácidos nucleicos. Por exemplo, um promotor ou intensificador é operacionalmente ligado a uma sequência de nucleotídeos codificante caso o promotor afete a transcrição da sequência codificante. Um sítio de ligação ao ribossoma é ligado operacionalmente a uma sequência codificante se ele estiver posicionado de modo a facilitar a tradução da sequência codificante. Tipicamente, sequências de DNA "operacionalmente ligadas" são contíguas. Entretanto, intensificadores não precisam ser contíguos. A ligação é feita por ligação a sítios de restrição convenientes. Se estes sítios não existirem, adaptadores ou ligantes de oligonucleotídeo sintéticos podem ser usados de acordo com a prática convencional.

[000120] Para uso na presente invenção o termo "gene" se refere a um polinucleotídeo (*por exemplo*, um segmento de DNA), que codifica um polipeptídeo e inclui regiões localizadas antes e depois das regiões codificantes assim como sequências intervenientes (íntrons) entre

segmentos codificantes individuais (éxons).

[000121] Para uso na presente invenção, "recombinante" quando usado com relação a uma célula, indica tipicamente que a célula foi modificada pela introdução de uma sequência de ácidos nucleicos heteróloga ou que a célula é derivada de uma célula assim modificada. Por exemplo, uma célula recombinante pode compreender um gene não encontrado de forma idêntica dentro da forma nativa (não recombinante) da célula, ou uma célula recombinante pode compreender um gene nativo (encontrado sob a forma nativa na célula), mas que foi modificado e reintroduzido na célula. Uma célula recombinante pode compreender um ácido nucleico endógeno à célula, que foi modificado sem remover o ácido nucleico da célula; tais modificações incluem aquelas obtidas por reposição gênica, mutação sítio-específica, e técnicas relacionadas conhecidas dos versados na técnica. A tecnologia de DNA recombinante inclui técnicas para a produção de DNA recombinante *in vitro* e transferência do DNA recombinante para dentro de células onde ele pode ser expresso ou propagado, produzindo, assim, um polipeptídeo recombinante. "Recombinação", "recombinar", e "recombinado" com relação a polinucleotídeos ou ácidos nucleicos, se refere, geralmente, ao agrupamento ou combinação de duas ou mais fitas ou fragmentos de ácidos nucleicos ou polinucleotídeos para gerar um novo polinucleotídeo ou ácido nucleico. O polinucleotídeo ou ácido nucleico recombinante é algumas vezes chamado de quimera. Um ácido nucleico ou polipeptídeo é "recombinante" quando ele é artificial ou manipulado, ou derivado de uma proteína ou um ácido nucleico artificial ou manipulado.

[000122] Para uso na presente invenção, o termo "amplificação" de ácido nucleico ou gene refere-se a um processo pelo qual sequências de DNA específicas são replicadas desproporcionalmente para que tal ácido nucleico ou gene amplificado fique presente em número de có-

pias mais elevado do que o inicialmente presente no genoma. Em algumas modalidades, a seleção de células por cultivo na presença de um fármaco (*por exemplo*, um inibidor de uma enzima inibível) resulta na amplificação de gene endógeno que codifica o produto gênico necessário para o crescimento na presença do fármaco ou por amplificação de sequências exógenas (*isto é*, inseridas) que codificam este ácido nucleico ou produto gênico ou ambos.

[000123] "Amplificação" é um caso especial de replicação de ácidos nucleicos envolvendo a especificidade do molde. Isto deve ser contrastado com a replicação de molde inespecífico (*isto é*, replicação que é dependente do molde, mas independente de um molde específico). A especificidade do molde é diferenciada aqui da fidelidade de replicação (*isto é*, síntese da sequência de polinucleotídeos apropriada) e especificidade do (ribo- ou desoxiribo-) nucleotídeo. A especificidade do molde é frequentemente descrita em termos de especificidade "alvo". As sequências alvo são "alvos" no sentido em que elas são selecionadas a partir de outros ácidos nucleicos. Técnicas de amplificação foram feitas principalmente para esta seleção.

[000124] Para uso na presente invenção, o termo "iniciador" refere-se a um oligonucleotídeo (um polímero de resíduos de nucleotídeo), que pode ocorrer naturalmente, tal como em um digesto de restrição purificado ou produzido sinteticamente, que é capaz de agir como um ponto de início da síntese quando colocado sob condições nas quais a síntese de um produto de extensão do iniciador que é complementar a uma fita de ácido nucleico é induzida (*isto é*, na presença de nucleotídeos e um agente indutor como, por exemplo, DNA polimerase e a temperatura e pH adequados). Um iniciador é, de preferência, de fita simples para máxima eficiência na amplificação, mas pode ser alternativamente de fita dupla. Se for fita dupla, o iniciador é primeiro tratado para separar suas fitas antes de ser usado para preparar os produtos

de extensão. Em algumas modalidades, o iniciador é um oligodesoxirribonucleotídeo. O iniciador precisa ser suficientemente longo para iniciar a síntese de produtos de extensão na presença do agente indutor. O comprimento exato de um iniciador depende de uma variedade de fatores, incluindo a temperatura, fonte do iniciador, e do uso do método.

[000125] Para uso na presente invenção, o termo "sonda" refere-se a um oligonucleotídeo, que ocorre naturalmente tal como em um digesto de restrição purificado ou é produzido sinteticamente, de forma recombinante ou por amplificação por PCR, que é tipicamente capaz de hibridizar a outro oligonucleotídeo de interesse. Uma sonda pode ser fita-simples ou dupla fita. As sondas são úteis na detecção, identificação e isolamento de sequências gênicas específicas. Contempla-se que qualquer sonda usada na presente invenção será marcada com qualquer "molécula repórter", para que ela seja detectável em qualquer sistema de detecção, incluindo, mas não se limitando a sistemas enzimáticos (*por exemplo*, ELISA, assim como testes histoquímicos à base de enzimas), fluorescentes, radioativos, e luminescentes. Não se pretende que a presente invenção seja limitada a um sistema de detecção ou marcador específico.

[000126] Para uso na presente invenção, o termo "alvo", quando usado em relação à reação em cadeia de polimerase, se refere à região do ácido nucleico delimitada pelos iniciadores usados para a reação em cadeia de polimerase. Desta forma, o "alvo" é selecionado a partir das outras sequências de ácidos nucleicos. Um "segmento" de nucleotídeo é uma região de um ácido nucleico dentro da sequência de ácidos nucleicos alvo.

[000127] Para uso na presente invenção, o termo "reação em cadeia de polimerase" (PCR) refere-se aos métodos das patentes US nº 4.683.195; 4.683.202 e 4.965.188, aqui incorporados por referência,

que incluem métodos para aumentar a concentração de um segmento de uma sequência alvo em uma mistura de DNA genômico sem clonagem ou purificação. Este processo para amplificar a sequência alvo é bem conhecido na técnica.

[000128] Para uso na presente invenção, o termo "reagentes de amplificação" refere-se aos reagentes (*por exemplo*, trifosfatos de desoxirribonucleotídeo, tampão, etc.) necessários para a amplificação, exceto iniciadores, molde de ácido nucleico, e a enzima de amplificação. Tipicamente, reagentes de amplificação junto com outros componentes de reação são colocados e contidos em um vaso de reação (tubo de ensaio, micropoço, etc.).

[000129] Para uso na presente invenção, o termo "endonuclease de restrição" ou "enzima de restrição" refere-se a uma enzima (*por exemplo*, enzima bacteriana) que é capaz de cortar DNA dupla fita ou fita-simples em uma sequência de nucleotídeos específica conhecida como um sítio de restrição, ou próximo dela. A sequência de nucleotídeos que compreende o sítio de restrição é reconhecida e clivada por uma dada endonuclease de restrição ou enzima de restrição e é frequentemente o sítio para inserção de fragmentos de DNA. Um sítio de restrição pode ser manipulado em um vetor de expressão ou construto de DNA.

[000130] "Recombinação homóloga" se refere à troca de fragmentos de DNA entre duas moléculas de DNA ou cromossomos pareados no local de sequências de nucleotídeos idênticas ou quase idênticas. Em algumas modalidades, a integração cromossômica é uma recombinação homóloga.

[000131] Um ácido nucleico ou polinucleotídeo é dito "codificar" um polipeptídeo se, no seu estado original ou quando manipulado por métodos conhecidos daqueles versados na técnica, ele puder ser transcrito e/ou traduzido para produzir o polipeptídeo ou um fragmento do

mesmo. Diz-se que a fita antissenso de tal ácido nucleico também codifica a sequência.

[000132] Tal como é conhecido na técnica, uma sequência de DNA pode ser transcrita por uma RNA polimerase para produzir uma sequência de RNA, mas uma sequência de RNA pode ser transcrita de modo reverso pela transcriptase reversa para produzir uma sequência de DNA.

[000133] "Cepa hospedeira" ou "célula hospedeira" refere-se a um hospedeiro adequado para um vetor de expressão que compreende uma sequência de DNA de interesse. A sequência de DNA de interesse pode expressar uma proteína de interesse na cepa hospedeira ou célula hospedeira.

[000134] Uma "proteína" ou "polipeptídeo" compreende uma sequência polimérica de resíduos de aminoácido. Os termos "proteína" e "polipeptídeo" são usados de maneira intercambiável na presente invenção. O código de uma e de 3 letras para aminoácidos, conforme definido de acordo com a nomenclatura da IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN), é usado em toda esta descrição. A letra X refere-se a qualquer um dos vinte aminoácidos. Também deve ser compreendido que um polipeptídeo pode ser codificado por mais de uma sequência de nucleotídeos devido à degeneração do código genético. As mutações são designadas pelo código de uma letra para o aminoácido original, seguido pelo número da posição com três ou dois dígitos e, então, o código de uma letra para o aminoácido variante. Por exemplo, a mutação de glycine (G) na posição 87 para serina (S) é representada como "G087S" ou "G87S". Várias mutações são indicadas pela inserção de um "-" entre as mutações. Mutações nas posições 87 e 90 são representadas como "G087S-A090Y" ou "G87S-A90Y" ou "G87S + A90Y" ou "G087S + A090Y". Para deleções, o código de uma letra "Z" é usado. Para uma inserção em relação à se-

quência original, o código de uma letra "Z" está no lado esquerdo do número da posição. Para uma deleção, o código de uma letra "Z" está do lado direito do número da posição. Para inserções, o número da posição é o número da posição antes do(s) aminoácido(s) inserido(s), mais 0,01 para cada aminoácido. Por exemplo, uma inserção de três aminoácidos alanina (A), serina (S) e tirosina (Y) entre a posição 87 e 88 é mostrada como "Z087.01A-Z087.02S-Z087.03Y". Desta forma, a combinação de todas as mutações acima mais uma deleção na posição 100 é: "G087S- Z087.01A-Z087.02S-Z087.03Y-A090Y-A100Z."

[000135] Uma "pré-sequência" ou "sequência de pró-peptídeo" refere-se a uma sequência de aminoácidos entre a sequência do peptídeo de sinal e a sequência de protease madura que é necessária para a secreção da protease. A clivagem da pró-sequência ou sequência de pró-peptídeo resulta em uma protease ativa madura.

[000136] O termo "sequência de sinal" ou "peptídeo de sinal" refere-se a uma sequência de resíduos de aminoácido que pode participar na secreção ou transporte direto da forma madura ou precursora de uma proteína. A sequência de sinal está localizada tipicamente em posição N-terminal à sequência de proteína precursora ou madura. A sequência de sinal pode ser endógena ou exógena. Uma sequência de sinal exógena exemplificadora compreende os primeiros sete resíduos de aminoácido da sequência de sinal da subtilisina de *Bacillus subtilis* fundidas ao restante da sequência de sinal da subtilisina de *Bacillus lentus* (ATCC 21536). Uma sequência de sinal está normalmente ausente da proteína madura. Uma sequência de sinal é tipicamente clivada a partir da proteína por uma peptidase sinal após a proteína ser transportada.

[000137] O termo "sequência de sinal híbrida" refere-se a sequências de sinal nas quais parte da sequência é obtida a partir do hospedeiro de expressão fundido à sequência de sinal do gene a ser expresso.

Em algumas modalidades, sequências sintéticas são utilizadas.

[000138] O termo forma "madura" de uma proteína, polipeptídeo, ou peptídeo refere-se à forma funcional da proteína, polipeptídeo, ou peptídeo sem a sequência do peptídeo de sinal e a sequência do pró-peptídeo.

[000139] O termo forma "precursora" de uma proteína ou peptídeo refere-se à forma madura da proteína que tem uma pró-sequência operacionalmente ligada à terminação amino ou carbonila da proteína. O precursor pode, também, ter uma sequência de "sinal" operacionalmente ligada à terminação amino da pró-sequência. O precursor pode, também, ter polinucleotídeos adicionais que estão envolvidos na atividade pós-traducional (*por exemplo*, polinucleotídeos clivados deles para deixar a forma madura de uma proteína ou peptídeo).

[000140] O termo "selvagem" com relação a uma sequência de aminoácidos ou sequência de ácidos nucleicos indica que a sequência de aminoácidos ou sequência de ácidos nucleicos é uma sequência nativa ou de ocorrência natural. Para uso na presente invenção, o termo "que ocorre naturalmente" refere-se a tudo (*por exemplo*, proteínas, aminoácidos, ou sequências de ácidos nucleicos) que é encontrado na natureza (*isto é*, que não foi manipulado através de métodos recombinantes).

[000141] Para uso na presente invenção, o termo "que não tem ocorrência natural" refere-se a tudo que não é encontrado na natureza (*por exemplo*, ácidos nucleicos recombinantes produzidos no laboratório).

[000142] Para uso na presente invenção com relação a posições de resíduos de aminoácidos, "correspondendo a" ou "corresponde a" ou "corresponde" se refere a um resíduo de aminoácido na posição citada em uma proteína ou peptídeo, ou um resíduo de aminoácido que é análogo, homólogo, ou equivalente a um resíduo citado em uma proteína ou peptídeo. Para uso na presente invenção, "região correspon-

dente" se refere, geralmente, a uma posição análoga entre proteínas relacionadas ou uma proteína de referência.

[000143] Os termos "derivado de" e "obtido a partir de" se referem não apenas a uma protease produzida ou que pode ser produzida por uma cepa do organismo em questão, mas também uma protease codificada por uma sequência de DNA isolada de tal cepa e produzida em um organismo hospedeiro contendo tal sequência de DNA. Adicionalmente, o termo se refere a uma protease que é codificada por uma sequência de DNA de origem sintética e/ou de cDNA e que tem as características identificadoras da protease em questão. Para exemplificar, "proteases derivadas de *Bacillus*" se refere às enzimas que possuem atividade proteolítica, que são produzidas naturalmente por *Bacillus*, assim como a serina proteases como aquelas produzidas por fontes de *Bacillus*, mas que, através do uso de técnicas de engenharia genética, são produzidas por organismos não-*Bacillus* transformados com um ácido nucleico que codifica as serina proteases.

[000144] O termo "idêntico" no contexto de duas sequências de ácidos nucleicos ou polipeptídeos se refere aos resíduos nas duas sequências que são iguais quando elas são alinhadas para correspondência máxima, conforme medido com o uso de um dos algoritmos a seguir de comparação ou análise de sequência.

[000145] Para uso na presente invenção, o termo "genes homólogos" se refere a um par de genes de espécies diferentes, mas geralmente relacionadas, que correspondem um ao outro e que são idênticos ou muito similares. O termo abrange genes que são separados por especiação (isto é, o desenvolvimento de novas espécies) (*por exemplo*, genes ortólogos), assim como genes que foram separados por duplicação genética (*por exemplo*, genes parálogos).

[000146] Para uso na presente invenção, "homologia" refere-se a uma similaridade ou identidade de sequência, com identidade sendo

preferencial. A homologia pode ser determinada com o uso de técnicas padrão conhecidas na arte (*vide, por exemplo*, Smith e Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 [1981]; Needleman e Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 [1970; Pearson e Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 [1988]; programas de software como, por exemplo, GAP, BESTFIT, FASTA, e TFASTA no pacote de programas Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group, Madison, WI, EUA); e Devereux *et al.*, Nucl. Acid Res. 12:387-395 [1984]). Um exemplo de um algoritmo útil é o PILEUP. O PILEUP cria um alinhamento de múltiplas sequências a partir de um grupo de sequências relacionadas usando alinhamentos progressivos aos pares. Ele também pode plotar uma árvore mostrando as relações de agrupamento usadas para criar o alinhamento. O PILEUP usa uma simplificação do método de alinhamento progressivo de Feng e Doolittle (*vide* Feng e Doolittle, J. Mol. Evol. 35:351-360 [1987]). O método é similar ao descrito por Higgins e Sharp (*consulte*, Higgins e Sharp, CABIOS 5:151-153 [1989]). Parâmetros de PILEUP úteis, incluindo um peso para lacuna padrão de 3,00, um peso para o comprimento de lacuna padrão de 0,10, e lacunas de extremidade ponderadas. Outro exemplo de um algoritmo útil é o algoritmo BLAST, descrito por Altschul *et al.*, (*consulte* Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410 [1990]; e Karlin e Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 [1993]). Um programa BLAST particularmente útil é o programa WU-BLAST-2 (*vide*, Altschul *et al.*, Meth. Enzymol. 266:460-480 [1996]). O WU-BLAST-2 usa vários parâmetros de busca, a maioria destes são ajustados para os valores padrão. Os parâmetros ajustáveis são configurados com os seguintes valores: distância da sobreposição =1, fração de sobreposição = 0,125, limite da palavra (T) = 11. Os parâmetros HSP S e HSP S2 são valores dinâmicos e são estabelecidos pelo programa em si dependendo da composição da sequência particular e da composição da base de dados particular con-

tra a qual a sequência de interesse está sendo pesquisada. Entretanto, os valores podem ser ajustados para aumentar a sensibilidade.

[000147] O percentual de identidade de sequência entre uma sequência de referência e uma sequência de teste de interesse pode ser facilmente determinado pelo versado na técnica. O percentual de identidade compartilhado por sequências de polipeptídeos ou polipeptídeos é determinado por comparação direta das informações da sequência entre as moléculas por alinhamento das sequências e determinação da identidade por métodos conhecidos na técnica. Um exemplo de um algoritmo que é adequado para determinar a similaridade de sequência é o algoritmo BLAST (*consulte* Altschul, *et al.*, J. Mol. Biol., 215:403-410 [1990]). Um programa para fazer as análises BLAST está disponível ao público através do National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo envolve primeiro identificar pares de sequência de alta semelhança (HSPs) pela identificação de pequenas palavras de comprimento W na sequência pesquisada que pareiam ou satisfazem algum limite de pontuação de valor positivo T quando alinhada com uma palavra com o mesmo comprimento em uma sequência da base de dados. Estes acertos iniciais de palavras vizinhas agem como pontos de partida para encontrar HSPs mais longos que as contenham. Os acertos da palavra são estendidos em ambas as direções das duas sequências que estão sendo comparadas até o ponto em que a pontuação do alinhamento cumulativo pode ser aumentada. A extensão da palavra é interrompida quando: a pontuação de alinhamento cumulativo declina em uma quantidade X a partir de um valor máximo alcançado; a pontuação cumulativa chega a zero ou abaixo de zero; ou a extremidade de cada sequência é alcançada. Os parâmetros W, T, e X do algoritmo BLAST determinam a sensibilidade e a velocidade do alinhamento. O programa BLAST usa como padrões um tamanho de palavra (W) de 11, a matriz de pontuação BLOSUM62

(consulte Henikoff e Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 [1992]) alinhamentos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M'5, N'-4, e uma comparação entre ambas as fitas.

[000148] O algoritmo BLAST faz então uma análise estatística da similaridade entre as duas sequências (*consulte, por exemplo, Karlin e Altschul, supra*). Uma medição de similaridade fornecida pelo algoritmo BLAST é a probabilidade da menor soma ($P(N)$), que fornece uma indicação da probabilidade pela qual um pareamento entre duas sequências de nucleotídeo ou aminoácido poderia ocorrer ao acaso. Por exemplo, um ácido nucleico é considerado similar a um ácido nucleico de serina protease desta invenção caso a probabilidade da menor soma em uma comparação entre o ácido nucleico de teste e o ácido nucleico da serina protease seja menor que cerca de 0,1, com mais preferência, menor que cerca de 0,01 e, com a máxima preferência, menor que cerca de 0,001. Quando o ácido nucleico de teste codifica um polipeptídeo de serina protease, ele é considerado similar a um ácido nucleico de serina protease especificado se os resultados da comparação em uma probabilidade da menor soma forem menores que cerca de 0,5, e com mais preferência, menores que cerca de 0,2.

[000149] O percentual "idêntico" ou "de identidade" no contexto de duas ou mais sequências de ácidos nucleicos ou polipeptídeos se refere a duas ou mais sequências que são iguais ou possuem uma porcentagem especificada de resíduos de ácidos nucleicos ou resíduos de aminoácidos, respectivamente, que são iguais, quando comparadas e alinhadas para máxima similaridade, como determinado com o uso de um algoritmo de comparação de sequência ou por inspeção visual. O "percentual de identidade de sequência" ou "% de identidade" ou "% de identidade de sequência" de uma sequência de aminoácidos em questão a uma sequência de aminoácidos de referência (*isto é, pesquisada*) significa que a sequência de aminoácidos em questão é idên-

tica (*isto é*, com base em uma análise aminoácido-por-aminoácido) por uma porcentagem especificada à sequência de aminoácidos pesquisada ao longo de um comprimento de comparação quando as sequências são otimamente alinhadas. Desta forma, 80% de identidade de sequência de aminoácidos ou 80% de identidade com relação a duas sequências de aminoácidos significa que 80% dos resíduos de aminoácidos em duas sequências de aminoácidos otimamente alinhadas são idênticos.

[000150] "Percentual de identidade de sequência" ou "% de identidade" ou "% de identidade de sequência ou "% de identidade de sequência de nucleotídeos" de uma sequência de ácidos nucleicos em questão a uma sequência de ácidos nucleicos de referência (*isto é*, pesquisada) significa que a sequência de ácidos nucleicos em questão é idêntica (*isto é*, com base em uma análise nucleotídeo-por-nucleotídeo para uma sequência de polinucleotídeos) por uma porcentagem especificada à sequência pesquisada ao longo de um comprimento de comparação quando as sequências são otimamente alinhadas. Desta forma, 80% de identidade de sequência de nucleotídeos ou 80% de identidade com relação a duas sequências de ácidos nucleicos significa que 80% dos resíduos de nucleotídeos em duas sequências de ácidos nucleicos otimamente alinhadas são idênticos.

[000151] Em algumas modalidades, o "percentual de identidade de sequência" ou "% de identidade de sequência" ou "% de identidade" de uma sequência em questão a uma sequência pesquisada pode ser calculado através do alinhamento ótimo das duas sequências e comparação das duas sequências otimamente alinhadas ao longo do comprimento de comparação. O número de posições no alinhamento ótimo nas quais resíduos idênticos ocorrem em ambas as sequências é determinado, fornecendo, assim, o número de posições pareadas, e o número de posições pareadas é então dividido pelo número total de

posições do comprimento de comparação (que, exceto onde especificado em contrário, é o comprimento da sequência pesquisada). O número resultante é multiplicado por 100 para produzir o percentual de identidade de sequência da sequência em questão à sequência pesquisada.

[000152] "Alinhamento ótimo" ou "otimamente alinhado" refere-se ao alinhamento de duas (ou mais) sequências dando a pontuação de percentual de identidade mais elevada. Por exemplo, o alinhamento ótimo de duas sequências de proteína pode ser alcançado através do alinhamento manual das sequências para que o número máximo de resíduos de aminoácido idênticos em cada sequência seja alinhado juntos ou pelo uso de programas de software ou procedimentos aqui descritos ou conhecidos na técnica. O alinhamento ótimo de duas sequências de ácidos nucleicos pode ser alcançado através do alinhamento manual das sequências para que o número máximo de resíduos de nucleotídeo idênticos em cada sequência sejam alinhados juntos ou pelo uso de programas de software ou procedimentos aqui descritos ou conhecidos na técnica.

[000153] Em algumas modalidades, duas sequências de polipeptídeos são consideradas "otimamente alinhadas" quando elas são alinhadas com o uso de parâmetros definidos, como, por exemplo, uma matriz de substituição de aminoácido definida, penalidade por existência de lacuna (também chamada penalidade por abertura de lacuna), e penalidade por extensão da lacuna, de modo obter a pontuação de identidade mais elevada possível para aquele par de sequências. A matriz de pontuação BLOSUM62 (*vide*, Henikoff e Henikoff, *supra*) é frequentemente usada como uma matriz de substituição de pontuação padrão em algoritmos de alinhamento de sequências de polipeptídeo (*por exemplo*, BLASTP). A penalidade por existência de lacuna é imposta para a introdução de uma única lacuna de aminoácido em uma

das sequências alinhadas, e a penalidade por extensão da lacuna é imposta para cada posição de resíduo na lacuna. Os parâmetros de alinhamento exemplificadores empregados são: BLOSUM62, penalidade por existência de lacuna =11, e penalidade por extensão da lacuna=1. A pontuação do alinhamento é definida pelas posições de aminoácido de cada sequência na qual o alinhamento começa e termina (por exemplo, a janela de alinhamento) e, opcionalmente, pela inserção de uma lacuna ou várias lacunas em uma ou ambas as sequências, de modo a obter a pontuação de similaridade mais alta possível.

[000154] O alinhamento ótimo entre duas ou mais sequências pode ser determinado manualmente por inspeção visual ou usando um computador, como, por exemplo, mas não se limitando a, o programa BLASTP para sequências de aminoácidos e o programa BLASTN para sequência de ácidos nucleicos (*vide, por exemplo, Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402 (1997); consulte também, o site web do National Center for Biotechnology Information (NCBI)*).

[000155] Um polipeptídeo de interesse pode ser dito "substancialmente idêntico" a um polipeptídeo de referência se o polipeptídeo de interesse compreender uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 91%, pelo menos cerca de 92%, pelo menos cerca de 93%, pelo menos cerca de 94%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99%, ou pelo menos cerca de 99,5% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos do polipeptídeo de referência. O percentual de identidade entre dois polipeptídeos pode ser determinado manualmente por inspeção das duas sequências de polipeptídeo otimamente alinhadas ou pelo uso de pro-

gramas de software ou algoritmos (*por exemplo*, BLAST, ALIGN, CLUSTAL) com o uso de parâmetros padrão. Um indício de que dois polipeptídeos são substancialmente idênticos é que o primeiro polipeptídeo faz reação imunológica cruzada com o segundo polipeptídeo. Tipicamente, os polipeptídeos que diferem por substituições de aminoácido conservativas são imunologicamente reativos de forma cruzada. Desta forma, um polipeptídeo é substancialmente idêntico a um segundo polipeptídeo, por exemplo, quando os dois peptídeos diferem apenas por uma substituição de aminoácido conservativa ou uma ou mais substituições de aminoácido conservativas.

[000156] Um ácido nucleico de interesse pode ser dito "substancialmente idêntico" a um ácido nucleico de referência se o ácido nucleico de interesse compreender uma sequência de nucleotídeos que tem pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 91%, pelo menos cerca de 92%, pelo menos cerca de 93%, pelo menos cerca de 94%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99%, ou pelo menos cerca de 99,5% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeos do ácido nucleico de referência. O percentual de identidade entre dois ácidos nucleicos pode ser determinado manualmente por inspeção das duas sequências de ácido nucleico otimamente alinhadas ou pelo uso de programas de software ou algoritmos (*por exemplo*, BLAST, ALIGN, CLUSTAL) com o uso de parâmetros padrão. Uma indicação de que duas sequências de ácido nucleico são substancialmente idênticas é que as duas moléculas de ácido nucleico hibridizam uma a outra sob condições estringentes (*por exemplo*, dentro de uma faixa de estringência média a alta).

[000157] Um ácido nucleico ou polinucleotídeo é "isolado" quando

ele é parcial ou completamente separado de outros componentes, incluindo, mas não se limitando a, por exemplo, outras proteínas, ácidos nucleicos, células, etc. De modo similar, um polipeptídeo, proteína ou peptídeo é "isolado" quando ele é parcial ou completamente separado de outros componentes, incluindo, mas não se limitando a, por exemplo, outras proteínas, ácidos nucleicos, células, etc. Em uma base molar, uma espécie isolada é mais abundante que as outras espécies em uma composição. Por exemplo, uma espécie isolada pode compreender pelo menos cerca de 50%, cerca de 70%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, cerca de 99%, ou cerca de 100% (em base molar) de todas as espécies macromoleculares presentes. De preferência, a espécie de interesse é purificada até homogeneidade essencial (*isto é*, espécies contaminantes não podem ser detectadas na composição por métodos de detecção convencionais). A pureza e a homogeneidade podem ser determinadas com o uso de inúmeras técnicas bem conhecidas na técnica, como eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida de uma amostra de proteína ou de ácido nucleico, seguido de visualização por coloração. Se desejado, uma técnica de alta resolução, como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou meios similares podem ser utilizados para a purificação do material.

[000158] O termo "purificado", conforme aplicado a ácidos nucleicos ou polipeptídeos, denota, geralmente, um ácido nucleico ou polipeptídeo que é essencialmente isento de outros componentes, como determinado por métodos analíticos bem conhecidos na técnica (*por exemplo*, um polipeptídeo ou polinucleotídeo purificado forma uma banda distinta em um gel eletroforético, eluído cromatográfico, e/ou um meio submetido à centrifugação por gradiente de densidade). Por exemplo, um ácido nucleico ou polipeptídeo que gera essencialmente

uma banda em um gel eletroforético é "purificado". Um ácido nucleico ou polipeptídeo purificado é pelo menos cerca de 50% puro, geralmente, pelo menos cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, cerca de 99%, cerca de 99,5%, cerca de 99,6%, cerca de 99,7%, cerca de 99,8% ou mais puro (*por exemplo*, por cento, em peso, em base molar). Em um sentido relacionado, a invenção fornece métodos para enriquecer composições para uma ou mais moléculas da invenção, como um ou mais polipeptídeos ou polinucleotídeos da invenção. Uma composição é enriquecida para uma molécula quando há um aumento substancial na concentração da molécula após aplicação de uma técnica de purificação ou enriquecimento. Um polipeptídeo ou polinucleotídeo substancialmente puro da invenção (*por exemplo*, protease variante substancialmente pura ou polinucleotídeo que codifica uma protease variante da invenção, respectivamente) compreenderá, tipicamente, pelo menos cerca de 55%, cerca de 60%, cerca de 70%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98, cerca de 99%, cerca de 99,5% ou mais, em peso (em base molar) de todas as espécies macromoleculares em uma composição particular.

[000159] Em um sentido relacionado, a invenção fornece métodos de enriquecer as composições para uma ou mais moléculas da invenção, como, por exemplo, um ou mais polipeptídeos da invenção (*por exemplo*, uma ou mais proteases variantes da invenção) ou um ou mais ácidos nucleicos da invenção (*por exemplo*, um ou mais ácidos nucleicos que codificam uma ou mais proteases variantes da invenção). Uma composição é enriquecida para uma molécula quando há um aumento substancial na concentração da molécula após aplicação de uma téc-

nica de purificação ou enriquecimento. Um polipeptídeo ou polinucleotídeo substancialmente puro compreenderá, tipicamente, pelo menos cerca de 55%, cerca de 60%, cerca de 70%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98, cerca de 99%, cerca de 99,5% ou mais, em peso (em base molar) de todas as espécies macromoleculares em uma composição particular.

[000160] Para uso na presente invenção, o termo "mutagênese combinatória" ou "combinatório" refere-se a métodos pelos quais bibliotecas de variantes de ácido nucleico de uma sequência de ácidos nucleicos de referência são geradas. Nestas bibliotecas, as variantes contêm uma ou várias mutações escolhidas a partir de um conjunto predefinido de mutações. Os métodos também fornecem meios para introduzir mutações aleatórias que não eram membros do conjunto predefinido de mutações. Alguns destes métodos incluem os apresentados na patente US 6.582.914, aqui incorporada por referência. Alguns métodos de mutagênese combinatória incluem e/ou abrangem métodos incorporados em kits comercialmente disponíveis (*por exemplo*, kit de mutagênese sítio-dirigida QUIKCHANGE® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), fusão de PCR/extensão de PCR).

[000161] Para uso na presente invenção, o termo "que tem propriedades aprimoradas" usado com relação a uma protease variante se refere a uma protease variante com desempenho de lavagem ou limpeza aprimorado ou intensificado, e/ou estabilidade aprimorada ou intensificada, opcionalmente com desempenho de lavagem ou de limpeza mantido em relação à protease de referência correspondente (*por exemplo*, protease selvagem ou de ocorrência natural). As propriedades otimizadas de uma protease variante podem compreender desempenho de lavagem ou limpeza aprimorado e/ou estabilidade aprimora-

da. Em algumas modalidades, a invenção fornece proteases variantes da invenção que têm uma das seguintes propriedades: desempenho de lavagem das mãos aprimorado, desempenho de lavagem de louças manual ou com as mãos aprimorado, desempenho de lavagem automática de louças aprimorado, desempenho de lavagem de roupas aprimorado, e/ou estabilidade aprimorada em relação a uma protease de referência (*por exemplo*, protease selvagem como uma subtilisina selvagem).

[000162] Para uso na presente invenção, o termo "teste funcional" refere-se a um teste que fornece uma indicação da atividade de uma proteína. Em algumas modalidades, o termo se refere a sistemas de teste nos quais uma proteína é analisada quanto a sua capacidade de funcionar na sua capacidade usual. Por exemplo, no caso de enzimas, um teste funcional envolve determinar a eficácia da enzima em catalisar a reação.

[000163] Para uso na presente invenção, o termo "propriedade alvo" se refere à propriedade do gene inicial que deve ser alterada. Não se pretende que a presente invenção seja limitada a uma propriedade alvo particular. Entretanto, em algumas modalidades, a propriedade alvo é a estabilidade de um produto gênico (*por exemplo*, resistência à desnaturação, proteólise ou outros fatores de degradação), enquanto em outras modalidades, o nível de produção em um hospedeiro de produção é alterado.

[000164] O termo "propriedade" ou equivalentes gramaticais do mesmo no contexto de um ácido nucleico, para uso na presente invenção, se refere a qualquer característica ou atributo de um ácido nucleico que pode ser selecionado ou detectado. Estas propriedades incluem, mas não se limitam a, uma propriedade que afeta a ligação a um polipeptídeo, uma propriedade conferida sobre uma célula que compreende um ácido nucleico particular, uma propriedade que afeta a

transcrição gênica (por exemplo, força do promotor, reconhecimento do promotor, regulação do promotor, função do intensificador), uma propriedade que afeta o processamento de RNA (*por exemplo*, splicing de RNA, estabilidade do RNA, conformação do RNA, e modificação pós-transcricional), uma propriedade que afeta a tradução (*por exemplo*, nível, regulação, ligação de mRNA a proteínas ribossômicas, modificação pós-traducional). Por exemplo, um sítio de ligação para um fator de transcrição, polimerase, fator regulatório, etc., de um ácido nucleico pode ser alterado para produzir as características desejadas ou para identificar características indesejáveis.

[000165] O termo "propriedade" ou equivalentes gramaticais do mesmo no contexto de um polipeptídeo, para uso na presente invenção, se refere a qualquer característica ou atributo de um polipeptídeo que pode ser selecionado ou detectado. Estas propriedades incluem, mas não se limitam a, estabilidade oxidativa, especificidade de substrato, atividade catalítica, atividade enzimática, estabilidade térmica, estabilidade alcalina, perfil de atividade pH, resistência à degradação proteolítica, K_M , k_{cat} , razão k_{cat}/K_M , enovelamento de proteína, indução de uma resposta imunológica, capacidade de se ligar a um ligando, capacidade de se ligar a um receptor, capacidade de ser secretado, capacidade de ser mostrado sobre a superfície de uma célula, capacidade de oligomerizar, capacidade para sinalizar, capacidade para estimular a proliferação celular, capacidade para inibir a proliferação celular, capacidade para induzir apoptose, capacidade para ser modificado por fosforilação ou glicosilação, e/ou capacidade para tratar uma doença, etc.

[000166] Para uso na presente invenção, o termo "triagem" tem seu significado usual na técnica. Em um processo de triagem exemplificador, um ácido nucleico mutante ou polipeptídeo variante codificado a partir dele é fornecido e uma propriedade do ácido nucleico mutante

ou polipeptídeo variante, respectivamente, é avaliada ou determinada. A propriedade determinada do ácido nucleico mutante ou polipeptídeo variante pode ser comparada a uma propriedade do ácido nucleico precursor (original) correspondente ou à propriedade do polipeptídeo original correspondente, respectivamente.

[000167] Será aparente ao versado na técnica que o procedimento de triagem para obter um ácido nucleico ou proteína com uma propriedade alterada depende da propriedade do material de partida, cuja modificação a geração do ácido nucleico mutante se destina a facilitar. Portanto, o versado na técnica compreenderá que a invenção não se limita a uma propriedade específica a ser triada e que a descrição a seguir de propriedades apenas menciona exemplos ilustrativos. Os métodos para fazer a triagem qualquer propriedade específica são descritos de maneira geral na técnica. Por exemplo, pode-se medir a ligação, pH, especificidade, etc., antes e depois da mutação, sendo que uma mudança indica uma alteração. De preferência, as triagens são feitas em alta velocidade, incluindo múltiplas amostras sendo triadas simultaneamente, incluindo, mas não se limitando a testes usando circuitos integrados, apresentação em fago, e múltiplos substratos e/ou indicadores.

[000168] Para uso na presente invenção, em algumas modalidades, um processo de triagem abrange uma ou mais etapas de seleção nas quais as variantes de interesse são enriquecidas a partir de uma população de variantes. Exemplos destas modalidades incluem a seleção de variantes que conferem uma vantagem de crescimento ao organismo hospedeiro, assim como apresentação em fago ou qualquer outro método de apresentação, onde variantes podem ser capturadas a partir de uma população de variantes com base na sua ligação ou em suas propriedades catalíticas. Em algumas modalidades, uma biblioteca de variantes é exposta ao estresse (*por exemplo*, calor, desnaturação,

etc.) e, subsequentemente, as variantes que ainda estão intactas são identificadas em uma triagem ou são enriquecidas por seleção. Pretende-se que o termo abranja quaisquer meios adequados para seleção. De fato, não se pretende que a presente invenção seja limitada a um método particular de triagem.

[000169] Os termos "sequência de ácidos nucleicos modificada" e "gene modificado" são usados de maneira intercambiável na presente invenção para se referir a uma sequência de ácidos nucleicos que inclui uma deleção, inserção ou interrupção de uma sequência de ácidos nucleicos de ocorrência natural (*isto é*, selvagem). Em algumas modalidades, o produto de expressão da sequência de ácidos nucleicos modificada é uma proteína truncada (*por exemplo*, se a modificação for uma deleção ou interrupção da sequência). Em algumas modalidades, a proteína truncada retém sua atividade biológica. Em modalidades alternativas, o produto de expressão da sequência de ácidos nucleicos modificada é uma proteína alongada (*por exemplo*, modificações que compreendem uma inserção na sequência de ácidos nucleicos). Em algumas modalidades, uma inserção de nucleotídeo na sequência de ácidos nucleicos leva a uma proteína truncada (*por exemplo*, quando a inserção resulta na formação de um códon de parada). Desta forma, uma inserção pode resultar em uma proteína truncada ou uma proteína alongada como um produto de expressão.

[000170] Uma sequência de ácidos nucleicos "mutante" se refere tipicamente a uma sequência de ácidos nucleicos que tem uma alteração em pelo menos um códon que ocorre em uma sequência selvagem da célula hospedeira, para que o produto de expressão da sequência de ácidos nucleicos mutante seja uma proteína com uma sequência de aminoácidos alterada em relação à proteína selvagem. O produto de expressão pode ter uma capacidade funcional alterada (*por exemplo*, atividade enzimática intensificada).

[000171] Para uso na presente invenção, a expressão "alteração na especificidade de substrato" se refere a alterações na especificidade de substrato de uma enzima. Em algumas modalidades, uma alteração na especificidade de substrato é definida como uma alteração em k_{cat} e/ou K_m para um substrato particular, resultante de mutações da enzima ou alteração das condições de reação. A especificidade ao substrato de uma enzima é determinada por comparação das eficiências catalíticas que ele tem com diferentes substratos. Estas determinações encontram uso particular na avaliação da eficiência das enzimas mutantes, uma vez que isto é geralmente desejado para produzir enzimas variantes que exibem maiores razões de k_{cat}/K_m para substratos de interesse. Entretanto, não se pretende que a presente invenção seja limitada a qualquer composição do substrato ou especificidade de substrato particular.

[000172] Para uso na presente invenção, o termo "propriedade de superfície" é usado em referência à carga eletrostática, bem como propriedades como a capacidade hidrofóbica e a capacidade hidrofílica exibidas pela superfície de uma proteína.

[000173] Para uso na presente invenção, o termo "carga líquida" é definido como a soma de todas as cargas presentes em uma molécula. "Alterações de carga líquida" são feitas a uma molécula de proteína original para fornecer uma variante que tem uma carga líquida que difere daquela da molécula original (*isto é*, a variante tem uma carga líquida que não é igual a da molécula original). Por exemplo, a substituição de um aminoácido neutro por um aminoácido negativamente carregado ou um aminoácido positivamente carregado por um aminoácido neutro resulta em uma carga líquida de -1 com relação à molécula original. A substituição de um aminoácido positivamente carregado por um aminoácido negativamente carregado resulta em uma carga líquida de -2 com relação ao original. A substituição de um aminoácido neutro

por um aminoácido positivamente carregado ou um aminoácido negativamente carregado por um aminoácido neutro resulta em uma carga líquida de +1 com relação ao original. A substituição de um aminoácido negativamente carregado por um aminoácido positivamente carregado resulta em uma carga líquida de +2 com relação ao original. A carga líquida de uma proteína original também pode ser alterada pela deleção e/ou inserção de aminoácidos carregados.

[000174] Os termos "termicamente estável" e "termoestável" e "termoestabilidade" referem-se a proteases que guardam uma quantidade especificada de atividade enzimática após exposição a temperaturas identificadas ao longo de um dado período de tempo sob condições que prevalecem durante os processos proteolíticos, de hidrólise, limpeza ou outro processo da invenção, enquanto são expostos a temperaturas alteradas. As "temperaturas alteradas" abrangem temperaturas aumentadas ou diminuídas. Em algumas modalidades, as proteases retêm pelo menos cerca de 50%, cerca de 60%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 92%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, ou cerca de 99% da atividade proteolítica após exposição a temperaturas alteradas ao longo de um dado período de tempo, por exemplo, pelo menos cerca de 60 minutos, cerca de 120 minutos, cerca de 180 minutos, cerca de 240 minutos, cerca de 300 minutos, etc.

[000175] O termo "estabilidade otimizada" no contexto de uma protease estável à oxidação, quelante, calor e/ou pH se refere a uma atividade proteolítica mais elevada retida ao longo do tempo em comparação com outras proteases (*por exemplo*, proteases subtilisina) e/ou enzimas selvagens

[000176] O termo "estabilidade diminuída" no contexto de uma protease estável à oxidação, quelante, calor e/ou pH se refere a uma atividade proteolítica menor retida ao longo do tempo em comparação

com outras proteases (*por exemplo*, proteases subtilisina) e/ou enzimas selvagens.

[000177] O termo "atividade de limpeza" se refere a um desempenho da limpeza alcançado por uma protease variante ou protease de referência sob condições que prevalecem durante o processo proteolítico, de hidrólise, limpeza, ou outro processo da invenção. Em algumas modalidades, o desempenho da limpeza de uma protease variante ou protease de referência pode ser determinado pelo uso de vários testes para limpar uma ou mais manchas sensíveis a várias enzimas sobre um item ou superfície (*por exemplo*, uma mancha causada por alimento, grama, sangue, tinta, leite, óleo, e/ou proteína de ovo). O desempenho de limpeza de uma variante ou protease de referência pode ser determinado por submeter a mancha sobre o objeto, item, ou superfície a condição(ões) de lavagem padrão e avaliar o grau de remoção da mancha pelo uso de várias metodologias cromatográficas, espectrofotométricas ou outras metodologias quantitativas. Exemplos de testes e métodos de limpeza são conhecidos na técnica e incluem, mas não se limitam aos descritos em WO 99/34011 e na patente US 6.605.458, ambos aqui incorporados, a título de referência, assim como os testes de limpeza e métodos incluídos nos exemplos fornecidos abaixo.

[000178] O termo "quantidade eficaz de limpeza" de uma protease variante ou protease de referência refere-se à quantidade de protease que obtém um nível desejado de atividade enzimática em uma composição de limpeza específica. Tais quantidades eficazes são facilmente verificadas por um versado na técnica e são baseadas em muitos fatores, como, por exemplo, a protease específica usada, a aplicação de limpeza, a composição específica da composição de limpeza, e se uma composição líquida ou seca (*por exemplo*, granular, tablete, barra) é necessária, etc.

[000179] O termo "material auxiliar de limpeza" refere-se a qualquer

material líquido, sólido, ou gasoso incluído na composição de limpeza diferente de uma protease variante da invenção. Em algumas modalidades, as composições de limpeza da presente invenção incluem um de mais materiais auxiliares de limpeza. Cada material auxiliar de limpeza é selecionado dependendo tipicamente do tipo e forma particular de composição de limpeza (por exemplo, líquido, grânulo, pó, barra, pasta, aspersão, tablete, gel, espuma, ou outra composição). De preferência, cada material auxiliar de limpeza é compatível com a enzima protease usada na composição.

[000180] O termo "desempenho aprimorado" no contexto de atividade de limpeza refere-se a uma atividade de limpeza aumentada ou maior por uma enzima sobre determinadas manchas sensíveis à enzima como, por exemplo, ovo, leite, grama, tinta, óleo, e/ou sangue, como determinado por avaliação usual após um ciclo de lavagem padrão e/ou múltiplos ciclos de lavagem.

[000181] O termo "desempenho reduzido" no contexto de atividade de limpeza refere-se a uma atividade de limpeza reduzida ou menor por uma enzima sobre certas manchas sensíveis à enzima como, por exemplo, ovo, leite, grama ou sangue, como determinado por avaliação usual após um ciclo de lavagem padrão.

[000182] O termo "desempenho comparativo" no contexto da atividade de limpeza de uma protease variante da invenção se refere a pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 91%, pelo menos cerca de 92%, pelo menos cerca de 93%, pelo menos cerca de 94%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99%, pelo menos cerca de 99,5% da atividade de limpeza de uma protease comparativa ou de referência (por exemplo, proteases comercialmente dispo-

níveis), incluindo, mas não se limitando a, por exemplo, protease OPTIMASE™ (Genencor), produtos de protease PURAFECT™ (Genencor), protease SAVINASE™ (Novozymes), variantes de BPN' (*consulte, por exemplo*, patente US nº Re 34.606), proteases RELEASE™, DURAZYME™, EVERLASE™, KANNASE™ (Novozymes), proteases MAXACAL™, MAXAPEM™, PROPERASE™ (Genencor; *consulte também*, a patente US nº Re 34.606, e patentes US nºs 5.700.676; 5.955.340; 6.312.936; e 6.482.628), e produtos da protease variante de *B. lentus* (*por exemplo*, os descritos em WO 92/21760, WO 95/23221 e/ou WO 97/07770). O desempenho da limpeza pode ser determinado pela comparação das proteases variantes da presente invenção com proteases subtilisina de referência em vários testes de limpeza relacionados com manchas sensíveis a enzimas, como grama, sangue, tinta, óleo, e/ou leite, conforme determinado por metodologias espectrofotométricas ou analíticas usuais após condições de ciclo de lavagem padrão.

[000183] Para uso na presente invenção, o termo "produto destinado ao consumidor" significa produto para cuidados de tecidos e da casa. Para uso na presente invenção, o termo "produto para cuidados de tecidos e doméstico" ou "produto para cuidados de tecidos e da casa" inclui produtos geralmente destinados a serem usados ou consumidos sob a forma na qual eles são vendidos e que são para tratamento de tecidos, superfícies duras e quaisquer outras superfícies, e sistemas de limpeza, todos para o cuidado e limpeza de superfícies inanimadas, assim como produtos condicionadores de tecido e outros produtos feitos especificamente para o cuidado e manutenção de tecidos, e produtos para cuidados para o ar, incluindo: cuidados para o ar, incluindo perfumadores de ar e sistemas de liberação de aroma, cuidados para o carro, cuidados para animais de estimação, cuidados para gado, cuidados pessoais, cuidados com joias, lavagem de louças, condiciona-

mento de tecidos (incluindo amaciamento e/ou renovação), detergência para lavanderia, aditivo de lavagem e enxágue e/ou composições de limpeza de cuidado e pré-tratamento, limpeza e/ou tratamento de superfícies duras incluindo produtos para limpeza do chão e vaso sanitário, produtos para a limpeza e/ou tratamentos de vidro, produtos para limpeza e/ou tratamentos de ladrilhos, produtos para limpeza e/ou tratamentos de cerâmica, e outras limpezas para uso doméstico ou institucional. Em algumas modalidades, os produtos para cuidados com tecidos e com a casa são adequados ao uso sobre ferimentos e/ou pele. O "produto para cuidados de tecidos e da casa" inclui produtos para uso doméstico e institucional.

[000184] Para uso na presente invenção, o termo "produtos para cuidados com não tecidos e com a casa" se refere a composições que são adicionadas a outras composições para produzir um produto final que pode ser um produto para cuidados de tecidos e da casa.

[000185] Para uso na presente invenção, o termo "composição de limpeza institucional" refere-se a produtos adequados para uso em instituições como por exemplo, mas não se limitando a escolas, hospitais, indústrias, lojas, corporações, edifícios, restaurantes, complexos e edifícios de escritórios, instalações de processamento e/ou fabricação, hospitais veterinários, fazendas de criação, ranchos de criação, etc.

[000186] Para uso na presente invenção, o termo "composição de limpeza e/ou tratamento" é um subconjunto dos produtos para cuidados com tecidos e com a casa que inclui, exceto onde indicado em contrário, composições adequadas para limpeza e/ou tratamento de itens. Tais produtos incluem, mas não se limitam a produtos para tratamento de tecidos, superfícies duras e quaisquer outras superfícies na área de cuidados para tecidos e casa, incluindo: agentes renovadores e sistemas de liberação de aroma para cuidados com o ar, cuidados para o carro, lavagem de louças, condicionamento de tecidos (in-

cluindo amaciamento e/ou renovação), detergência para lavanderia, aditivo e/ou cuidados de lavanderia e enxágue, limpeza e/ou tratamento de superfícies duras incluindo agentes de limpeza de chão e vaso sanitário, agentes de lavagem para múltiplas finalidades ou "para tarefas pesadas" granulares ou em pó, especificamente detergentes de limpeza; agentes de lavagem para múltiplas finalidades líquidos, em gel ou em pasta, especificamente os denominados líquidos para tarefas pesadas; detergentes líquidos para tecidos finos; agentes para lavagem de pratos à mão ou agentes para lavagem de louças para tarefas leves, especificamente os do tipo de alta produção de espuma; agentes para lavagem de pratos à máquina, incluindo os vários tipos em tabletes, granulares, líquidos e de auxílio ao enxágue para uso doméstico e institucional: xampus para carros ou tapetes, agentes para limpeza de banheiros incluindo agentes para limpeza de vaso sanitário; assim como compostos auxiliares de limpeza como aditivos alvejantes e "bastão removedor de manchas" ou os tipos pré-tratamento, produtos carregados com substrato como folhas com secante adicionado.

[000187] Para uso na presente invenção, a "composição de limpeza" ou "formulação de limpeza" da invenção se refere a qualquer composição da invenção útil para remover ou eliminar um composto (*por exemplo*, um composto indesejado) de um objeto, item ou superfície a ser limpa, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a um tecido, item de tecido, item de louça, item de utensílio de mesa, copo, lente de contato, outros substratos sólidos, pelo (xampus) (incluindo cabelo humano ou pelo de animais), pele (sabões, cosméticos, e cremes), dentes (enxaguatórios bucais, pastas dentais), superfície de um item ou objeto (*por exemplo*, superfícies duras, como a superfície dura de uma mesa, tampo da mesa, parede, item de mobília, piso, teto, item que não é louça, item que não é utensílio de mesa, etc.), filtros, mem-

branas (*por exemplo*, membranas de filtração, incluindo, mas não se limitando a membranas de ultrafiltração), etc. O termo abrange qualquer material e/ou composto adicionado selecionado para o tipo particular de composição de limpeza desejada e a forma do produto (*por exemplo*, líquido, gel, grânulo, pulverização, ou outra composição), contanto que a composição seja compatível com a protease e outra(s) enzima(s) usada(s) na composição. A seleção específica dos materiais da composição de limpeza é facilmente feita por considerar a superfície, objeto, item ou tecido a ser limpo, e a forma desejada da composição para as condições de limpeza durante o uso.

[000188] As composições de limpeza e as formulações para limpeza incluem qualquer composição que seja adequada para limpar, alvejar, desinfetar, e/ou esterilizar qualquer objeto, item, e/ou superfície. Tais composições e formulações incluem, mas não se limitam a, por exemplo, composições líquidas e/ou sólidas, incluindo composições de limpeza ou detergentes (*por exemplo*, composições de limpeza ou detergentes para lavanderia líquidas, em tablete, gel, barra, grânulo, e/ou sólidas e composições detergentes para tecidos finos; composições e formulações para limpeza de superfícies duras, como para tampos e janelas de vidro, madeira, cerâmica e metal; agentes para limpeza de carpete; agentes para limpeza de fornos; renovadores de tecido; amaciantes de tecido; e composições de limpeza ou detergentes de reforço para lavanderia e têxteis, composições de limpeza aditivas para lavanderia, e composições de limpeza pré-removedor de mancha para uso em lavanderia; composições para lavagem de pratos, incluindo composições para lavagem à mão ou manual de pratos (*por exemplo*, detergentes para lavagem de pratos à "mão" ou "manual") e composições para lavagem de louças automática (*por exemplo*, "detergentes para lavagem de louças automática").

[000189] A composição de limpeza ou as formulações para limpeza,

para uso na presente invenção, incluem, exceto onde indicado em contrário, agentes de lavagem granulares ou em pó para múltiplas finalidades ou para tarefas pesadas, especificamente detergentes de limpeza; agentes de lavagem para múltiplas finalidades líquidos, granulares, gel, sólidos, em tablete, ou pasta, especificamente os tipos designados detergente líquido para tarefas pesadas (HDL) ou detergente em pó para tarefas pesadas (HDD); detergentes líquidos para tecidos finos; agentes para lavagem manual ou à mão de pratos, inclusive aqueles com alta formação de espuma; lavagem de pratos manual ou à mão, lavagem de louças automática, ou agentes para lavagem de louças ou utensílios de mesa, incluindo os vários tipos em tablete, pó, sólidos, granulares, líquidos, em gel, e de auxílio ao enxágue para uso doméstico e institucional; agentes de limpeza e desinfecção líquidos, incluindo os tipos bactericidas para lavagem das mãos, barras de limpeza, enxaguatórios bucais, limpadores de dentadura, xampus para carro, xampus para carpete, agentes para limpeza de banheiros; xampus para cabelos e/ou cremes para cabelo para seres humanos e outros animais; géis de banho e espumas de banho e limpadores de metal; assim como compostos auxiliares de limpeza, como aditivos alvejantes e "bastão removedor de manchas" ou os tipos pré-tratamento. Em algumas modalidades, as composições granulares estão sob forma "compacta"; em algumas modalidades, as composições líquidas estão sob forma "concentrada".

[000190] Para uso na presente invenção, "composições de limpeza de tecido" incluem composições detergentes lavagem de roupas à mão e à máquina incluindo composições de aditivos para lavanderia e composições apropriadas para uso no enxágue e/ou pré-tratamento de tecidos manchados (*por exemplo*, roupas, artigos fabris de cama e mesa, e outros materiais têxteis).

[000191] Para uso na presente invenção, "composições para limpeza

de não tecidos" incluem composições para limpeza da superfície de não têxteis (*isto é*, não tecidos), incluindo, mas não se limitando a, por exemplo, composições detergentes para lavagem de louça à mão ou manual ou automática, composições para limpeza oral, composições para limpeza de dentaduras, e composições para limpeza pessoal.

[000192] Para uso na presente invenção, o termo "composição de limpeza e/ou tratamento de tecido e/ou superfície dura" é um subconjunto das composições de limpeza e tratamento que inclui, exceto onde indicado em contrário, agentes de lavagem para múltiplas finalidades ou "para tarefas pesadas" granulares ou em pó, especificamente detergentes de limpeza; agentes de lavagem para múltiplas finalidades líquidos, em gel ou em pasta, especificamente os denominados líquidos para tarefas pesadas; detergentes líquidos para tecidos finos; agentes para lavagem de pratos à mão ou agentes para lavagem de louças para tarefas leves, especificamente os do tipo de alta produção de espuma; agentes para lavagem de pratos à máquina, incluindo os vários tipos em tabletes, granulares, líquidos e de auxílio ao enxágue para uso doméstico e institucional; agentes líquidos de limpeza e desinfecção, xampus para carros ou tapetes, agentes para limpeza de banheiros incluindo agentes para limpeza de vaso sanitário; produtos condicionadores de tecidos incluindo amaciantes e/ou renovadores que podem estar sob a forma líquida, sólida e/ou folha secante; assim como compostos auxiliares de limpeza como aditivos alvejantes e "bastão removedor de manchas" ou os tipos pré-tratamento, produtos carregados com substrato como folhas com secante adicionado. Todos estes produtos que são aplicáveis podem estar sob a forma padrão, concentrada ou mesmo altamente concentrada, ainda que tais produtos possam ser, em certos aspectos, não aquosos.

[000193] Para uso na presente invenção, o termo "composição detergente" ou "formulação do detergente" é usado com relação a uma

composição destinada ao uso em um meio de lavagem para a limpeza de objetos sujos ou manchados, que inclui objetos ou itens de tecido e/ou não tecido específicos. Tais composições da presente invenção não se limitam a, qualquer composição ou formulação detergente particular. De fato, em algumas modalidades, os detergentes da invenção compreendem pelo menos uma protease variante da invenção e, além disso, um ou mais tensoativos, transferase(s), enzimas hidrolíticas, óxido redutases, builders (*por exemplo*, um sal builder), agentes alvejantes, ativadores de alvejantes, agentes de azulamento, corantes fluorescentes, inibidores de formação de torta, agentes de mascaramento, ativadores de enzima, antioxidantes, e/ou solubilizantes. Em alguns casos, um sal builder é uma mistura de um sal de silicato e um sal de fosfato, de preferência, com mais silicato (*por exemplo*, metassilicato de sódio) do que fosfato (*por exemplo*, tripolifosfato de sódio). Algumas composições da invenção, como, por exemplo, mas não se limitando a, composições de limpeza ou composições detergentes não contêm fosfato (*por exemplo*, sal de fosfato ou builder à base de fosfato).

[000194] Para uso na presente invenção, o termo "alvejamento" refere-se ao tratamento de um material (*por exemplo*, tecido, lavanderia, polpa, etc.) ou superfície por um período suficiente de tempo e/ou sob condições de pH e/ou temperatura adequadas para fazer um clareamento (*isto é*, branqueamento) e/ou limpeza do material. Exemplos de produtos químicos adequados para o alvejamento incluem, mas não se limitam a, por exemplo, ClO_2 , H_2O_2 , perácidos, NO_2 , etc.

[000195] Para uso na presente invenção, "desempenho de lavagem" de uma protease (*por exemplo*, uma protease variante da invenção) se refere à contribuição de uma variante de protease para lavagem, que fornece desempenho de limpeza adicional ao detergente em comparação ao detergente sem a adição da protease variante à composição. O desempenho de lavagem é comparado sob condições de lavagem re-

levantes. Em alguns sistemas de teste, outros fatores relevantes, como, por exemplo, a composição detergente, a concentração da espuma de sabão, dureza da água, mecânica de lavagem, tempo, pH, e/ou temperatura, podem ser controlados de forma tal que a(s) condição(ões) típica(s) para uma aplicação doméstica em um certo segmento do mercado (*por exemplo*, lavagem de louças manual ou à mão ou, lavagem de louças automática, limpeza de louças, limpeza de utensílios de mesa, limpeza de tecido, etc.) é/são imitada(s).

[000196] O termo "condições de lavagem relevantes" é usado na presente invenção para indicar as condições, particularmente, temperatura de lavagem, tempo, mecânica da lavagem, concentração da espuma de sabão, tipo de detergente e dureza da água, realmente usadas em aparelhos domésticos em um segmento de mercado de lavagem de louças à mão, lavagem de louças automática ou detergente para lavagem de roupas.

[000197] O termo "desempenho de lavagem aprimorado" é usado para indicar que um resultado final melhor na remoção de manchas é obtido sob condições de lavagem relevantes, ou que menos protease variante, com base no peso, é necessária para se obter o mesmo resultado final em relação à protease original inicial ou selvagem correspondente.

[000198] Para uso na presente invenção, o termo "desinfetar" refere-se à remoção de contaminantes das superfícies, assim como a inibição ou morte de micróbios sobre as superfícies de itens. Não se pretende que a presente invenção seja limitada a uma superfície, um item, ou contaminante(s) ou micróbios particular(es) a ser(em) removido(s).

[000199] A forma "compacta" das composições de limpeza da presente invenção é mais bem refletida pela densidade e, em termos de composição, pela quantidade de sal de carga inorgânico. Os sais de carga inorgânicos são ingredientes convencionais de composições de-

tergentes sob a forma de pó. Em composições detergentes convencionais, os sais de carga estão presentes em quantidades substanciais, tipicamente, cerca de 17 a cerca de 35% com base no peso da composição total. Em contrapartida, em composições compactas, o sal de carga está presente em quantidades que não excedem cerca de 15% da composição total. Em algumas modalidades, o sal de carga está presente em quantidades que não excedem cerca de 10% ou, com mais preferência, cerca de 5%, em peso da composição. Em algumas modalidades, os sais de carga inorgânicos são selecionados a partir dos sais metálicos alcalinos e alcalinos-terrosos de sulfatos e cloretos. Em algumas modalidades, o sal de carga é sulfato de sódio.

[000200] A posição de um resíduo de aminoácido em uma dada sequência de aminoácidos é tipicamente numerada na presente invenção com o uso da numeração da posição do resíduo de aminoácido correspondente da sequência de aminoácidos BPN' da subtilisina de *B. amiloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1. A sequência de aminoácidos BPN' da subtilisina de *B. amiloliquefaciens* da SEQ ID NO:1 serve, assim, como uma sequência de referência. Uma dada sequência de aminoácidos, como, por exemplo, uma sequência de aminoácidos da protease variante aqui descrita, pode ser alinhada com a sequência BPN' (SEQ ID NO:1) com o uso de um algoritmo de alinhamento descrito na presente invenção, e um resíduo de aminoácido na dada sequência de aminoácidos que se alinha (de preferência, e alinha otimamente) com um resíduo de aminoácido na sequência BPN' pode ser convenientemente numerado por referência ao resíduo de aminoácido correspondente na sequência BPN' de subtilisina. Alternativamente, se as posições dos resíduos de aminoácido das sequências da protease variante de subtilisina forem numeradas com o uso da numeração real das posições de resíduos de aminoácido na sequência de aminoácidos de GG36 (SEQ ID NO:2), e não por referência às po-

sições de aminoácido correspondentes na sequência BPN' mediante alinhamento, a protease variante de subtilisina pode ser descrita como uma protease variante da protease GG36 mostrada na SEQ ID NO:2 [000201] Em geral, a nomenclatura usada na presente invenção e muitos dos procedimentos laboratoriais em cultura celular, genética molecular, biologia molecular, química de ácidos nucleicos, e química de proteínas descritos a seguir são bem conhecidos e comumente empregados pelos versados na técnica,. Os métodos para produção e manipulação de ácidos nucleicos recombinantes, síntese de ácidos nucleicos, métodos de cultura celular, e incorporação de transgenes (por exemplo, transfecção, eletroporação) são conhecidos pelos versados na técnica e são descritos em vários textos padrão. A síntese de oligonucleotídeo e as etapas de purificação são feitas tipicamente de acordo com as especificações. As técnicas e procedimentos são geralmente feitos de acordo com métodos convencionais bem conhecidos na técnica e várias referências gerais que são fornecidas ao longo deste documento. Acredita-se que os procedimentos ali contidos são bem conhecidos dos versados na técnica e são fornecidos para a conveniência do leitor.

Polipeptídeos da invenção

[000202] A presente invenção apresenta novos polipeptídeos, que podem ser coletivamente chamados de "polipeptídeos da invenção". Os polipeptídeos da invenção incluem polipeptídeos de protease variante isolados, recombinantes, substancialmente puros, ou que não tem ocorrência natural, incluindo, por exemplo, polipeptídeos de subtilisina variantes que têm atividade enzimática (*por exemplo*, atividade proteolítica). Em algumas modalidades, os polipeptídeos da invenção são úteis em aplicações para limpeza e podem ser incorporados em composições de limpeza que são úteis em métodos de limpeza de um item ou uma superfície (*por exemplo*, da superfície de um item) em neces-

cidade de limpeza.

[000203] Em algumas modalidades, uma protease variante da invenção compreende uma "subtilisina variante". Em algumas modalidades, a invenção apresenta uma "protease variante de *Bacillus sp.*". Em algumas modalidades, a invenção apresenta uma "subtilisina variante de *Bacillus sp.*".

[000204] Em algumas modalidades, a invenção inclui uma protease variante isolada, recombinante, substancialmente pura, ou que não tem ocorrência natural que tem atividade proteolítica, cujo polipeptídeo compreende uma sequência de polipeptídeos que tem pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 86%, pelo menos cerca de 87%, pelo menos cerca de 88%, pelo menos cerca de 89%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 91%, pelo menos cerca de 92%, pelo menos cerca de 93%, pelo menos cerca de 94%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99%, pelo menos cerca de 99,5%, ou 100% de identidade de sequência com as sequências de aminoácidos que codificam as proteases variantes aqui fornecidas.

[000205] Conforme observado acima, os polipeptídeos da protease variante da invenção possuem atividades enzimáticas (*por exemplo*, atividades proteolíticas) e, desta forma, são úteis em aplicações para limpeza, incluindo, mas não se limitando aos métodos para limpeza de louças, utensílios de mesa, tecidos, e itens que possuem superfícies duras (*por exemplo*, a superfície dura de uma tabela, tampo da mesa, parede, item de mobília, piso, teto, etc.). Exemplos de composições de limpeza que compreendem um ou mais polipeptídeos da protease variante da invenção são descritos abaixo. A atividade enzimática (*por exemplo*, atividade da protease) de um polipeptídeo da protease variante da invenção pode ser facilmente determinada com o uso de procedimentos bem conhecidos dos versados na técnica. Os exemplos

apresentados abaixo descrevem métodos para avaliar a atividade enzimática, desempenho de limpeza, e/ou desempenho de lavagem. O desempenho das proteases variantes da invenção na remoção de manchas (*por exemplo*, uma mancha proteínácea), limpeza de superfícies duras, ou limpeza de roupas, louças ou utensílios de mesa pode ser facilmente determinado com o uso de procedimentos bem conhecidos na técnica e/ou usando os procedimentos descritos nos exemplos.

[000206] Um polipeptídeo da invenção pode ser submetido a várias alterações, como, por exemplo, uma ou mais inserções, deleções, e/ou substituições de aminoácido, conservativas ou não conservativas, incluindo quando estas alterações não alteram substancialmente a atividade enzimática do polipeptídeo. De maneira similar, um ácido nucleico da invenção também pode ser submetido a várias alterações, como, por exemplo, uma ou mais substituições de um ou mais ácidos nucleicos em um ou mais códons para que um códon particular codifique um aminoácido igual ou diferente, resultando em uma variação silenciosa (*por exemplo*, uma mutação em uma sequência de nucleotídeos resulta em uma mutação silenciosa na sequência de aminoácido, por exemplo, quando o aminoácido codificado não é alterado pela mutação de ácido nucleico) ou variação não silenciosa, uma ou mais deleções de um ou mais ácidos nucleicos (ou códons) na sequência, um ou mais adições ou inserções de um ou mais ácidos nucleicos (ou códons) na sequência, e/ou clivagem de um ou mais truncamentos de um ou mais ácidos nucleicos (ou códons) na sequência. Muitas destas alterações na sequência de ácidos nucleicos podem não alterar substancialmente a atividade enzimática da variante de protease resultante codificada em comparação com a protease variante codificada pela sequência de ácidos nucleicos original. Um ácido nucleico da invenção também pode ser modificado para incluir um ou mais códons que for-

necem expressão ótima em um sistema de expressão (*por exemplo*, sistema de expressão bacteriano), enquanto, se desejado, os ditos um ou mais códons ainda codificam os mesmos aminoácido(s).

[000207] Em algumas modalidades, a presente invenção apresenta um gênero de polipeptídeos que compreende polipeptídeos de protease variante que possuem a atividade enzimática desejada (*por exemplo*, atividade de protease ou atividade de desempenho de limpeza) que compreendem sequências que têm as substituições de aminoácido aqui descritas e que também compreendem uma ou mais substituições de aminoácido adicionais, como substituições conservativas e não conservativas, sendo que o polipeptídeo tem, mantém ou mantém aproximadamente a atividade enzimática desejada (*por exemplo*, atividade da protease ou atividade de subtilisina, conforme refletido na atividade ou desempenho de limpeza da protease variante). As substituições de aminoácido de acordo com a invenção podem incluir, mas não se limitam a, uma ou mais substituições não conservativas e/ou uma ou mais substituições de aminoácido conservativas. Uma substituição conservativa de um resíduo de aminoácido envolve tipicamente a troca de um elemento dentro de uma classe funcional de resíduos de aminoácido por um resíduo que pertence à mesma classe funcional (resíduos de aminoácido idênticos são considerados funcionalmente homólogos ou conservados ao calcular o percentual de homologia funcional). Uma substituição de aminoácido conservativa envolve tipicamente a substituição de um aminoácido em uma sequência de aminoácidos por um aminoácido funcionalmente similar. Por exemplo, alanina, glicina, serina, e treonina são funcionalmente similares e assim podem servir como substituições de aminoácido conservativas umas para as outras. Ácido aspártico e ácido glutâmico podem servir como substituições conservativas um para o outro. Asparagina e glutamina podem servir como substituições conservativas uma para a outra. Arginina,

lisina, e histidina podem servir como substituições conservativas uma para a outra. Isoleucina, leucina, metionina, e valina pode servir como substituições conservativas uma para a outra. Fenilalanina, tirosina, e triptofano podem servir como substituições conservativas um para o outro.

[000208] Outros grupos de substituição de aminoácido conservativa podem ser previstos. Por exemplo, os aminoácidos podem ser agrupadas por função ou estrutura química ou composição similar (*por exemplo*, ácidos, básicos, alifáticos, aromáticos, ou contendo enxofre). Por exemplo, um agrupamento alifático pode compreender: glicina (G), alanina (A), valina (V), leucina (L), isoleucina (I). Outros grupos contendo aminoácidos que são considerados substituições conservativas um pelo outro incluem: aromáticos: fenilalanina (F), tirosina (Y), triptofano (W); contendo enxofre: metionina (M), cisteína (C); básicos: arginina (R), lisina (K), histidina (H); ácidos: ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E); resíduos não carregados não polares, cisteína (C), metionina (M), e prolina (P); resíduos não carregados hidrofílicos: serina (S), treonina (T), asparagina (N), e glutamina (Q). Grupos adicionais de aminoácidos são bem conhecidos daqueles versados na técnica e são descritos em vários livros-texto padrão. Listagem de uma sequência de polipeptídeos na presente invenção, em conjunto com os grupos de substituição acima, fornece uma listagem expressa de todas as sequências de polipeptídeo substituídas de modo conservativo.

[000209] As substituições conservativas existem dentro das classes de resíduo de aminoácido descritas acima, que podem, também ou alternativamente, ser adequadas. Os grupos de conservação para substituições que são mais conservativas incluem: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, e asparagina-glutamina. Desta forma, por exemplo, em algumas modalidades, a invenção apresenta um polipeptídeo de protease variante isola-

do ou recombinante (*por exemplo*, subtilisina variante) que tem atividade proteolítica, o dito polipeptídeo de protease variante que compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos cerca de 90%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, cerca de 99%, ou cerca de 99,5% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2. Não se espera que uma substituição conservativa de um aminoácido por outro em uma protease variante da invenção altere significativamente a atividade enzimática ou a atividade de desempenho de limpeza da variante de protease. A atividade enzimática ou atividade de desempenho de limpeza da protease resultante pode ser facilmente determinada usando testes padrão e os testes aqui descritos.

[000210] As variações substituídas de modo conservativo de uma sequência de polipeptídeos da invenção (*por exemplo*, proteases variantes da invenção) incluem substituições de uma pequena porcentagem, algumas vezes menos que cerca de 25%, cerca de 20%, cerca de 15%, cerca de 14%, cerca de 13%, cerca de 12%, cerca de 11%, cerca de 10%, cerca de 9%, cerca de 8%, cerca de 7%, ou cerca de 6% dos aminoácidos da sequência de polipeptídeos, ou menos que cerca de 5%, cerca de 4%, cerca de 3%, cerca de 2%, ou cerca de 1%, dos aminoácidos da sequência de polipeptídeos, por um aminoácido selecionado de modo conservativo do mesmo grupo de substituição conservativa.

[000211] Conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento e nos exemplos aqui fornecidos, os polipeptídeos da invenção podem ter capacidades de limpeza que podem ser comparadas a proteases conhecidas, inclusive subtilisinas conhecidas. Os exemplos de proteases de subtilisina conhecidas incluem, mas não se limitam a, subtilisina de *B. lentus* GG36, BPN' de subtilisina de *B. amyloliquefaciens*, BPN'-Y217L, de subtilisina de *B. amyloliquefaciens*

e *B. clausii* PB92. A sequência de aminoácidos da proteína subtilisina GG36 madura de *B. lentus* é:

AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDTGISTHPDLNIRG-
GASFVPGEPTQDGNGHGHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSA-
ELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSPSPSA-
TLEQAVNSATSRGVLVVAASGNSGAGSISYPARYANAMAVGATD-
QNNNRASFQYAGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMAS-
TPHVAGAAALVKQKNPSWSNVQIRNHL
KNTATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR (SEQ ID NO:2)

[000212] A sequência de aminoácidos da proteína subtilisina BPN' madura de *B. amyloliquefaciens* é:

AQSVPYGVVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAIDSGIDSSHPDLKVAG-
GASMVPSETNPFQDNNSHGHVAGTVAALNNSIGVLGVAPSAS-
LYAVKVLGADGSGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSLGGPSGSAAL-
KAAVDKAVASGVVVVAAAGNEGTSAGSSSTVGYPGKYPSVIAVGAV-
DSSNQRAFSSVGPELDVMAPGVSIQSTLPGNKYGAYNGTSMAS-
PHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSL
ENTTTKLGDSTFYGKGLINVQAAAQ (SEQ ID NO:1)

[000213] A presente invenção apresenta polipeptídeos que compreendem variantes de subtilisina de subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X1R, X2W, X2M, X2R, X2A, X2S, X3R, X4R, X4C, X4S, X8A, X9F, X9W, X9A, X10S, X10M, X10H, X10A, X12R, X12F, X14K, X14F, X14Q, X15R, X15F, X16S, X17R, X17M, X17F, X18R, X18K, X20F, X20R, X20K, X22Y, X22A, X22R, X22V, X22Q, X22W, X22L, X23F, X23S, X23A, X24W, X24R, X24H, X24F, X24Q, X24L, X25V, X25F, X25R, X26F, X27V, X27F, X27L, X27R, X28N, X28E, X28A, X29T, X30E, X31F, X33D, X33G, X33S, X34P, X35M, X36F, X36R, X36T,

X38L, X38F, X38R, X40L, X40W, X40N, X40R, X40T, X40H, X42I, X43D, X43I, X43R, X43M, X43F, X43W, X43S, X43A, X45T, X46R, X48R, X50C, X51H, X51W, X51F, X52F, X52E, X52N, X55Y, X57R, X59R, X59A, X59F, X60A, X60Q, X60P, X62E, X62Q, X63I, X63V, X63T, X63P, X63D, X63M, X63H, X63Q, X63E, X63A, X63S, X64F, X64T, X68C, X68A, X69N, X69P, X69W, X69T, X71G, X72C, X74C, X75F, X75A, X75R, X75E, X76D, X78I, X78R, X78N, X79W, X79Q, X81R, X82V, X82T, X82F, X82M, X82R, X85M, X86L, X86I, X86W, X89P, X89T, X89V, X89G, X89W, X89H, X89F, X89L, X89I, X91N, X91F, X92F, X94N, X99G, X99F, X99M, X99T, X99P, X100I, X100S, X100N, X100Q, X101N, X101A, X101G, X101P, X101F, X101E, X101T, X101D, X102H, X102N, X102E, X102T, X102A, X103G, X103D, X103N, X104D, X104E, X104I, X104L, X105Q, X105E, X105T, X106F, X106V, X106G, X106E, X106T, X106D, X106A, X107F, X107M, X108G, X108I, X109M, X111V, X111I, X112V, X112L, X112Q, X114G, X115K, X115R, X116A, X116K, X116L, X117F, X118I, X118R, X119C, X120F, X120A, X120R, X121E, X121F, X123G, X123E, X124S, X128F, X128H, X128I, X128L, X128Q, X128N, X128M, X128D, X129E, X132E, X132A, X138G, X144R, X147L, X148I, X158E, X158E, X159E, X159C, X160D, X166D, X166E, X167W, X175V, X177C, X181A, X182R, X183F, X183I, X183D, X183R, X183M, X185E, X185I, X185V, X186H, X186K, X188R, X188E, X188D, X192H, X192W, X194V, X194F, X194E, X197F, X198L, X198F, X203E, X203C, X208S, X209N, X209F, X209E, X209S, X209H, X209G, X209T, X209L, X210R, X210V, X210L, X211R, X211Q, X212I, X212M, X212F, X213A, X214F, X215F, X215N, X215D, X215H, X215E, X216F, X216A, X217N, X217E, X217D, X218P, X218D, X218E, X224A, X224G, X227I, X230E, X231I, X231C, X233C, X234F, X235F, X236F, X236N, X238L, X238K, X238R, X239K, X239S, X239T, X239G, X239H, X239R, X239N, X239F, X240R, X241R, X242L,

X242R, X243R, X243F, X244R, X246S, X248I, X248V, X248R, X249R, X249T, X250I, X251S, X251R, X252I, X252F, X252H, X252R, X253F, X253I, X253R, X254C, X256N, X258R, X260V, X260I, X262H, X262D, X263F, X265F, X267N, X267V, X267M, X269I, X269R, X270C, X271F, X271V, X271I, X271P, X271H, X271M, X271T, X271L, X271A, X272F, X272R, X272F, X273I, X273F, e X274G, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000214] A presente invenção fornece, adicionalmente, polipeptídeos que compreendem variantes de subtilisina de uma subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X16S, X18R, X20R, X22A, X24R, X43R/D, X45T, X76D, X101A, X103G, X104L, X111V, X128N, X148I, X230E, X242R, e X249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000215] A presente invenção fornece, adicionalmente, polipeptídeos que compreendem variantes de subtilisina de uma subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X1R, X230E, X271L, X115R, X20R, X249R, X235F, X27V/F/L, X75E, X82R, X18R, X269R, X43D, X43R, X76D, X45T, X212F, X242R, X24R, X78R, X9A, X22R, X121E, X244R, X28E, X30E, X4R, e X241R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequên-

cia de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000216] A presente invenção fornece, adicionalmente, polipeptídeos que compreendem variantes de subtilisina de uma subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X062E-X158E, X103G-X158E, X128N-X158E, X016S-X158E, X104L-X158E, X089P-X158E, X111V-X158E, X022A-X158E, X101A-X158E, X148I-X158E, X129E-X158E, X022A-X089P, X016S-X089P, X062E-X089P, X062E-X271F, X158E-X271F, X186H-X271F, X129E-X271F, X111V-X271F, X209E-X271F, X016S-X271F, X188D-X271F, X022A-X271F, X159E-X271F, X104L-X271F, X101A-X271F, X089P-X271F, X128N-X271F, X103G-X271F, X148I-X271F, X249R-X271F, X062E-X159E, X016S-X159E, X128N-X159E, X148I-X159E, X111V-X159E, X089P-X159E, X022A-X159E, X129E-X159E, X103G-X159E, X104L-X159E, X158E-X159E, X101A-X159E, X158E-X249R, X111V-X249R, X129E-X249R, X062E-X249R, X016S-X249R, X186H-X249R, X148I-X249R, X159E-X249R, X101A-X249R, X188D-X249R, X104L-X249R, X209E-X249R, X022A-X249R, X128N-X249R, X103G-X249R, X089P-X249R, X022A-X111V, X101A-X111V, X016S-X111V, X104L-X111V, X062E-X111V, X103G-X111V, X089P-X111V, X016S-X148I, X062E-X148I, X022A-X148I, X129E-X148I, X104L-X148I, X103G-X148I, X128N-X148I, X101A-X148I, X089P-X148I, X111V-X148I, X016S-X062E, X022A-X062E, X062E-X129E, X022A-X129E, X128N-X129E, X016S-X129E, X101A-X129E, X104L-X129E, X089P-X129E, X103G-X129E, X111V-X129E, X062E-X186H, X128N-X186H, X101A-X186H, X022A-X186H, X016S-X186H, X158E-X186H, X089P-X186H, X129E-X186H, X159E-X186H, X103G-X186H, X104L-X186H, X111V-X186H, X148I-X186H, X062E-X101A, X022A-X101A,

X016S-X101A, X089P-X101A, X062E-X103G, X022A-X103G, X016S-X103G, X101A-X103G, X089P-X103G, X062E-X128N, X016S-X128N, X022A-X128N, X101A-X128N, X104L-X128N, X089P-X128N, X103G-X128N, X111V-X128N, X111V-X188D, X062E-X188D, X016S-X188D, X148I-X188D, X022A-X188D, X128N-X188D, X101A-X188D, X104L-X188D, X089P-X188D, X129E-X188D, X159E-X188D, X186H-X188D, X103G-X188D, X158E-X188D, X016S-X022A, X016S-X104L, X022A-X104L, X101A-X104L, X062E-X104L, X103G-X104L, X089P-X104L, X159E-X209E, X111V-X209E, X101A-X209E, X016S-X209E, X128N-X209E, X148I-X209E, X129E-X209E, X062E-X209E, X022A-X209E, X103G-X209E, X158E-X209E, X188D-X209E, X104L-X209E, X089P-X209E, e X186H-X209E, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000217] A presente invenção fornece, adicionalmente, polipeptídeos que compreendem variantes de subtilisina de uma subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X018R-X241R, X020R-X241R, X024R-X241R, X009A-X241R, X020R-X241R, X004R-X241R, X043R-X241R, X078R-X241R, X022R-X241R, X115R-X241R, X001R-X241R, X212F-X241R, X082R-X241R, X018R-X244R, X024R-X244R, X078R-X244R, X020R-X244R, X212F-X244R, X009A-X244R, X082R-X244R, X001R-X244R, X043R-X244R, X022R-X244R, X004R-X244R, X115R-X244R, X241R-X244R, X242R-X244R, X001R-X004R, X009A-X022R, X018R-X022R, X020R-X022R, X004R-X022R, X001R-X022R, X024R-X242R, X018R-X242R, X004R-X242R, X020R-X242R, X212F-X242R, X082R-X242R, X078R-X242R, X001R-X242R, X009A-X242R, X022R-X242R, X115R-

X242R, X043R-X242R, X241R-X242R, X018R-X212F, X022R-X212F, X004R-X212F, X024R-X212F, X001R-X212F, X115R-X212F, X020R-X212F, X009A-X212F, X043R-X212F, X078R-X212F, X082R-X212F, X009A-X078R, X020R-X078R, X024R-X078R, X022R-X078R, X018R-X078R, X004R-X078R, X001R-X078R, X043R-X078R, X022R-X024R, X020R-X024R, X018R-X024R, X001R-X024R, X004R-X024R, X009A-X024R, X004R-X009A, X001R-X009A, X242R-X269R, X024R-X269R, X020R-X269R, X022R-X269R, X249R-X269R, X212F-X269R, X043R-X269R, X244R-X269R, X001R-X269R, X018R-X269R, X078R-X269R, X009A-X269R, X115R-X269R, X241R-X269R, X004R-X269R, X082R-X269R, X018R-X043R, X020R-X043R, X004R-X043R, X022R-X043R, X009A-X043R, X001R-X043R, X024R-X043R, X009A-X018R, X004R-X018R, X001R-X018R, X024R-X082R, X009A-X082R, X018R-X082R, X001R-X082R, X078R-X082R, X020R-X082R, X022R-X082R, X004R-X082R, X043R-X082R, X043R-X249R, X020R-X249R, X004R-X249R, X018R-X249R, X009A-X249R, X212F-X249R, X022R-X249R, X024R-X249R, X115R-X249R, X001R-X249R, X082R-X249R, X242R-X249R, X241R-X249R, X244R-X249R, X078R-X249R, X018R-X115R, X020R-X115R, X022R-X115R, X078R-X115R, X009A-X115R, X004R-X115R, X001R-X115R, X082R-X115R, X043R-X115R, X024R-X115R, X009A-X020R, X018R-X020R, X004R-X020R, X001R-X020R, X009A-X271L, X020R-X271L, X024R-X271L, X244R-X271L, X241R-X271L, X043R-X271L, X022R-X271L, X249R-X271L, X212F-X271L, X115R-X271L, X242R-X271L, X078R-X271L, X004R-X271L, X269R-X271L, X001R-X271L, X018R-X271L, e X082R-X271L, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000218] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas

maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X020R-X-43R, X020K-X062E, X024F-X116L, X020K-X024F, X024R-X174T, X024R-X118R, X024R-X235F, X024R-X086R, X024R-X086W, X078R-X118R, X033S-X118R, X033S-X235F, X209A-X241R, X020R-X076D, X018R-X245R, X024R-X045T, X232V-X245R, X118R-X172V, X118R-X194T, X008T-X024R, X235F-X243F, X018R-X103A, X018R-X104I, X086W-X118R, X086W-X243F, X086W-X209A, X024C-X033S, X024R-X232V, X024R-X243F, X024R-X239Q, X024R-X101G, X024R-X141G, X024R-X033S, X024R-X274I, X024R-X209A, X078R-X086W, X101G-X232V, X033S-X148F, X033S-X086W, X033S-X201S, X033S-X078R, X033S-X241R, X033S-X209A, X230E-X249R, X232V-X249R, X118R-X235F, X076D-X245R, X086W-X235F, X024R-X247H, X024R-X104A, X078R-X235F, X101G-X249R, X103A-X232V, X033S-X048T, X033S-X239T, X033S-X253A, X143A-X209A, X209A-X235F, X018R-X045T, X209A-X243F, X024R-X272P, X024R-X269C, X101G-X104I, X104I-X232V, X076D-X249R, e X024R-X076D sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000219] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X020R-X076D, X024R-X045T, X230E-X249R, X018R-X045T, X018R-X245R, X101G-X232V, X024R-X232V, X232V-X245R, X024R-X101G, X018R-X104I, X018R-X103A, X101G-X249R, X232V-X249R, X103A-X232V, X076D-X245R, X101G-X104I, X104I-X232V, X076D-X249R, X024R-X076D, X024F-X116L,

X020K-X024F, X020K-X062E, X033S-X118R, X024R-X086W, X024R-X118R, X024R-X086R, X209A-X241R, X024R-X241R, X024R-X235F, X118R-X209A, X078R-X118R, X033S-X235F, X024R-X174T, X086W-X209A, X008T-X024R, X086W-X118R, X033S-X241R, X024R-X243F, X024R-X209A, X033S-X086W, X024R-X033S, X086W-X243F, X033S-X201S, X024R-X239Q, X078R-X086W, X235F-X243F, X118R-X172V, X033S-X148F, X033S-X078R, X033S-X243F, X024C-X033S, X118R-X194T, X033S-X209A, X024R-X141G, X024R-X274I, X086W-X235F, X015T-X033S, X209A-X235F, X024R-X247H, X078R-X235F, X024R-X104A, X033S-X048T, X118R-X235F, X033S-X253A, X143A-X209A, X033S-X239T, X209A-X243F, X024R-X272P, e X024R-X269C, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000220] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X004R-X009A-X020R-X242R, X020R-X043R-X241R, X020R-X242R-X269R, X004R-X009A-X020R-X043R, X004R-X020R-X249R, X018R-X024R-X244R, X009A-X022R-X212F-X241R, X020R-X043R-X269R, X018R-X024R-X242R, X004R-X009A-X043R-X241R, X020R-X043R-X244R, X020R-X022R-X242R, X004R-X020R-X043R, X004R-X009A-X020R-X043R-X242R, X020R-X043R-X242R, X020R-X043R-X242R-X249R, X020R-X212F-X249R, X004R-X009A-X241R, X001R-X009A-X043R, X020R-X043R-X249R, X009A-X020R-X043R-X241R, X020R-X022R-X043R, X020R-X249R-X269R, X020R-X022R-X241R, X004R-X009A-X024R-X043R-X241R, X009A-X043R-X078R, X004R-X020R-X024R-X244R, X020R-X022R-X078R-X242R, X020R-X024R-X242R-X249R, X004R-X009A-X078R-

X241R, X009A-X043R-X078R-X242R, X004R-X020R-X024R, X009A-X043R-X212F, X020R-X043R-X212F, X024R-X078R-X212F, X009A-X020R-X024R-X043R, X009A-X022R-X043R-X078R, X020R-X022R-X212F-X241R, X020R-X043R-X212F-X241R, X009A-X043R-X241R, X020R-X043R-X271L, X020R-X022R-X078R-X241R, X020R-X024R-X043R-X242R, X020R-X022R-X043R-X241R, X009A-X020R-X043R-X212F, X004R-X009A-X020R-X024R-X242R, X020R-X043R-X249R-X271L, X020R-X022R-X024R-X242R, X009A-X022R-X078R-X212F, X020R-X043R-X242R-X271L, X009A-X022R-X078R-X212F-X241R, X004R-X020R-X024R-X249R, X020R-X022R-X271L, X020R-X022R-X043R-X212F, X004R-X020R-X024R-X043R-X242R, X004R-X020R-X024R-X043R, X004R-X009A-X022R-X078R-X212F, X020R-X022R-X078R-X212F-X241R, e X020R-X022R-X269R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000221] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X018R-X020R-X043D-X045T-X230E, X018R-X043R-X045T-X242R-X249R, X024R-X043D-X249R, X018R-X020R-X045T, X020R-X024R-X076D-X249R, X024R-X043R-X230E-X242R, X018R-X024R-X043D-X230E, X020R-X076D, X018R-X024R-X043D-X076D-X249R, X024R-X043R-X076D-X249R, X018R-X024R-X045T-X242R, X020R-X043D-X076D-X230E-X249R, X020R-X043R-X045T-X242R, X018R-X024R-X076D-X249R, X018R-X020R-X024R-X043D-X045T-X233I-X242R, X024R-X043R-X230E, X018R-X020R-X043D, X043R-X242R-X249R, X020R-X043R-X045T-X230E, X043R-X076D-X242R-X249R, X020R-X024R-X045T-X230E-X242R,

X024R-X045T-X076D-X230E-X242R-X249R, X024R-X045T, X024R-X043R-X045T-X076D-X230E-X249R, X018R-X024R-X043D-X045T-X249R, X018R-X043R-X045T-X249R, X024R-X043R-X242R, X018R-X020R-X043R-X076D-X249R, X020R-X024R-X043D-X249R, X020R-X043R-X230E-X242R, X020R-X043R-X242R, X018R-X043R-X076D-X230E, X020R-X024R-X043D-X242R, X020R-X043R-X230E, X018R-X020R-X043R-X076D-X242R-X249R, X043D-X045T-X076D-X249R, X018R-X043R-X242R-X249R, X018R-X020R-X043R-X045T-X242R, X018R-X020R-X043D-X230E-X242R, X020R-X024R-X043R-X045T-X249R, X024R-X043R-X249R, X020R-X024R-X27E-X043R-X076D-X230E, X024R-X043R-X045T-X242R, X018R-X020R-X024R-X043R-X045T-X076D-X230E, X020R-X043R-X076D-X230E-X249R, X018R-X043R-X045T-X242R, X020R-X242R-X249R, X018R-X043R-X076D-X230E-X242R-X249R, X018R-X024R-X076D, X020R-X024R-X27R-X043D-X242R-X249R, X018R-X020R-X024R-X043D-X076D-X242R, X018R-X043R-X076D-X242R-X249R, X018R-X024R-X043D-X230E-X249R, X018R-X020R-X043D-X249R, X018R-X020R-X043D-X045T-X076D-X242R, X024R-X043R-X076D-X230E-X242R, X020R-X024R-X38I-X043R-X045T-X076D-X242R-X249R, X018R-X020R-X043R, X018R-X024R-X045T-X230E-X242R, X018R-X020R-X249R, X024R-X043R-X076D, X018R-X020R-X024R-X043R-X045T-X076D-X249R, X018R-X043D-X045T-X076D-X242R-X249R, X024R-X043D-X242R-X249R, X018R-X020R-X024R-X043D-X045T-X242R, X020R-X024R-X043R-X076D, X018R-X020R-X043D-X045T-X230E-X242R, X020R-X024R-X043R-X045T-X076D-X242R-X249R, X018R-X043R-X045T-X076D-X242R, X018R-X020R-X043R-X076D-X230E-X242R, X018R-X024R-X043D-X249R, X018R-X024R-X043R-X045T-X230E-X249R, X018R-X020R-X043R-X045T-X076D-X249R, X018R-X024R-X242R, X018R-X043R-X045T-X076D-X230E-X242R, X045T-X242R-X249R, X018R-X024R-X043D-X242R, X018R-X020R-X043D-X045T-X240P,

X024R-X043R-X045T-X242R-X249R, X018R-X024R-X30S-X31S-X32I-X33Q-X34V-X35F, X018R-X020R-X043R-X076D, X020R-X043D-X045T-X076D-X242R-X249R, X018R-X024R-X043D-X230E-X242R, X018R-X024R-X043D-X242R-X249R, X024R-X043D-X045T-X242R-X249R, X043R-X230E-X249R, X024R-X043R-X076D-X230E-X249R, X020R-X024R-X043D-X076D-X249R, X024R-X045T-X242R-X273V, X020R-X024R-X045T-X076D-X242R-X249R, X018R-X024R-X043D-X076D-X242R, X018R-X043R-X076D-X230E-X249R, X018R-X020R-X043R-X045T-X249R, X018R-X043R-X045T-X230E-X242R, X020R-X024R-X043D-X045T-X230E-X242R, X018R-X043D-X230E-X249R, X018R-X043R-X076D-X242R, X018R-X020R-X076D, X018R-X020R-X043D-X076D-X242R-X249R, X020R-X024R-X043D-X076D-X242R-X249R, X043D-X242R-X249R, X018R-X020R-X024R-X043R-X076D, X018R-X020R-X043D-X045T-X076D-X249R, X018R-X020R-X043R-X045T-X076D-X230E-X249R, X018R-X076D-X242R, X020R-X043R-X249R, X018R-X076D-X242R-X249R, X018R-X024R-X045T-X230E-X249R, X230E-X249R, X018R-X045T-X249R, X020R-X043R-X076D, X043R-X045T-X249R, X018R-X043D-X076D-X242R-X249R, X043R-X076D-X249R, X018R-X045T, X020R-X076D-X230E-X242R, X020R-X024R-X043D-X045T, X024R-X043D-X076D-X242R-X249R, X020R-X045T-X249R, X043R-X076D-X153A-X249R, X043R-X076D-X230E-X249R, X018R-X043D-X076D-X249R, e X020R-X043R-X076D-X227I, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000222] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de

aminoácido selecionada a partir de: X101G-X103A-X104I-X232V-X236H-X245R-X252K, X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X248R, X101G-X103A-X104I-X159R-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248R, X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R, e X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X248D, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000223] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X101G-X103A-X104I-X129E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X159E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X148I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X159E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X129E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X188D-X232V-X238R-

X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X148I-X158E-
X232V-X245R-X248D, X016S-X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-
X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X158E-
X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X101G-X103A-X104I-
X129E-X158E-X159E-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X024R-
X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X232V-X245R-X248D-
X249R, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X128N-X158E-X188D-
X232V-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X188D-
X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-
X158E-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-
X129E-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-
X129E-X188D-X232V-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-
X158E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-
X104I-X128N-X129E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X024R-
X101G-X103A-X104I-X129E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D,
X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X188D-X232V-X245R-
X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X128N-X188D-X232V-
X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X188D-
X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X128N-
X129E-X158E-X232V-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-
X159E-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-
X128N-X129E-X232V-X238R-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-
X104I-X129E-X159E-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-
X103A-X104I-X129E-X158E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D,
X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X188D-X232V-
X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X159E-X188D-X232V-
X245R-X248D-X249R, X022A-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-
X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-
X129E-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-
X104I-X148I-X158E-X232V-X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-

X104I-X158E-X159E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-X129E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128N-X158E-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-X129E-X159E-X232V-X238R-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X129E-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X148I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-X129E-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X159E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X232V-X238R-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X128N-X159E-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-X159E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X159E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-X129E-X159E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X148I-X188D-X232V-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X232V-X238R-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X188D-X232V-

X238R-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X148I-X158E-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-X159E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X101G-X103A-X104I-X129E-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X129E-X188D-X232V-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X159E-X232V-X238R-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X129E-X159E-X232V-X238R-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X148I-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X238R-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-X128N-X159E-X232V-X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X158E-X232V-X238R-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128N-X158E-X159E-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X024K-

X101G-X103A-X104I-X128N-X158E-X159E-X232V-X245R-X248D,
 X101G-X103A-X104I-X129E-X148I-X188D-X232V-X245R-X248D,
 X024R-X101G-X103A-X104I-X148I-X232V-X245R-X248D, X022A-
 X101G-X103A-X104I-X148I-X188D-X232V-X245R-X248D, X024R-
 X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X188D-X232V-X245R-X248D,
 X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X158E-X232V-X238R-X245R-
 X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X148I-X158E-
 X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-
 X148I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-
 X148I-X159E-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-
 X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D, e X101G-X103A-X104I-
 X128N-X129E-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, sendo que as
 posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por
 correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN'
 de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000224] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de
 subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas
 maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de
 aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de
 aminoácido selecionada a partir de: X022A-X024R-X101G-X103A-
 X104I-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X024R-X101G-
 X103A-X104I-X129E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-
 X103A-X104I-X158E-X159E-X232V-X238R-X245R-X248D, X024R-
 X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-
 X104I-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-
 X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-
 X159E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X024R-X101G-
 X103A-X104I-X158E-X232V-X238R-X245R-X248D, X024R-X101G-
 X103A-X104I-X159E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-
 X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X232V-X245R-X248D, X024R-

X101G-X103A-X104I-X148I-X232V-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X148I-X158E-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X016S-X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X159E-X232V-X238R-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X101G-X103A-X104I-X129E-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X148I-X158E-X232V-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, e X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X232V-X245R-X248D, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000225] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X104L-X128N-X158E-X186H-X249R, X128N-X158E-X188D-X249R, X062E-X128N-X158E-X159E-X271F, X062E-X158E-X188D-X249R-X271F, X062E-X158E-X186H-X249R-X271F, X128N-X158E-X188D-X209E-X271F, X062E-X159E-X188D-X249R, X016S-X062E-X158E-X186H-X249R, X062E-X158E-

X159E-X249R, X101A-X128N-X158E-X209E-X249R, X128N-X158E-X186H-X271F, X062E-X158E-X188D-X249R, X062E-X158E-X186H-X271F, X062E-X158E-X186H-X249R, X062E-X101A-X186H-X249R, X062E-X101A-X158E-X186H-X271F, X062E-X104L-X158E-X188D-X249R-X271F, X062E-X159E-X186H-X249R, X062E-X159E-X249R, X128N-X158E-X186H-X249R, X128N-X158E-X188D-X271F, X062E-X158E-X249R, X062E-X186H-X188D-X249R-X271F, X128N-X158E-X209E-, X062E-X101A-X158E-X249R, X104L-X128N-X158E-X186H-X271F, X062E-X101A-X158E-X186H-X249R-X271F, X016S-X062E-X158E-X249R, X062E-X101A-X159E-X249R, X128N-X158E-X186H-X188D-X271F, X101A-X128N-X158E-X186H-X271F, X062E-X101A-X188D-X249R, X101A-X104L-X158E-X186H-X188D-X249R, X062E-X159E-X249R-X271F, X128N-X158E-X159E-X271F, X016S-X062E-X104L-X158E-X186H-X271F, X022A-X128N-X158E-X249R, X128N-X158E-X249R, X062E-X101A-X104L-X158E-X186H-X271F, X016S-X062E-X158E-X186H-X271F, X104L-X128N-X158E-X249R, X104L-X128N-X158E-X188D-X249R, X022A-X062E-X158E, X062E-X101A-X188D-X249R-X271F, X062E-X158E-X249R-X271F, X104L-X128N-X158E-X186H-X188D-X271F, X062E-X101A-X186H-X271F, X062E-X104L-X159E-X249R, X062E-X186H-X249R, X062E-X101A-X186H-X249R-X271F, X101A-X158E-X186H-X188D-X249R, X062E-X101A-X186H, X101A-X128N-X129E-X186H-X249R, X101A-X103G-X158E-X186H-X249R, X016S-X062E-X104L-X186H-X188D-X271F, X104L-X158E-X186H-X249R, X101A-X128N-X158E-X188D-X209E-X271F, X062E-X101A-X186H-X188D-X271F, X016S-X062E-X158E-X249R-X271F, X062E-X128N-X158E, X062E-X128N-X159E-X249R, X062E-X101A-X158E-X188D-X249R, X101A-X128N-X158E-X249R, X062E-X158E-X186H-X188D-X249R, X016S-X104L-X158E-X186H-X271F, X062E-X148I-X159E, X062E-X101A-X158E-X186H-X249R, X062E-X101A-X186H-X188D-X249R, X104L-X158E-X186H-X188D-X249R,

X062E-X101A-X104L-X186H-X188D-X271F, X022A-X101A-X158E-X186H-X249R, X101A-X128N-X158E-X209E, X158E-X186H-X188D-X249R-X271F, X104L-X158E-X186H-X188D-X249R-X271F, X101A-X104L-X158E-X186H-X249R, X104L-X158E-X249R, X101A-X104L-X128N-X158E-X186H-X271F, X016S-X104L-X188D-X249R, X101A-X104L-X158E-X186H-X188D-X271F, X104L-X128N-X159E-X271F, X104L-X158E-X186H-X249R-X271F, X158E-X186H-X249R, X101A-X158E-X186H-X249R, X104L-X158E-X188D-X249R-X271F, X016S-X128N-X158E-X186H, X104L-X128N-X186H-X188D-X249R, X016S-X101A-X128N-X186H, X016S-X062E-X128N-X186H-X271F, X016S-X128N-X186H-X271F, X128N-X129E-X186H, X158E-X186H-X249R-X271F, X016S-X158E-X249R, X016S-X158E-X186H-X249R, X016S-X022A-X158E-X186H-X271F, X089P-X101A-X129E-X186H, X022A-X128N-X158E-X186H, X101A-X104L-X128N-X158E-X186H, X022A-X128N-X186H-X188D-, X062E-X104L-X158E-X186H-X188D-X249R, X022A-X158E-X186H-X249R-X271F, X022A-X104L-X158E-X249R, X101A-X111V-X129E, X016S-X158E-X249R-X271F, X016S-X111V-X188D-, X022A-X104L-X186H-X188D-X249R, e X104L-X148I-X188D-X249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000226] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X001R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X004R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X271L, X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X004R-X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-

X245R, X018R-X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X271L, X020R-X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X024R-X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X025R-X116A-X167W, X018R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X022R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X078R-X103N-X106G-X167W-X236N, X018R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X024R-X101A-X120F-X194F-X249R, X020R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X101G-X103A-X104I-X212F-X232V-X245R, X020R-X144R-X185I-X233C-X236N, X023A-X078R-X216F-X236N-X249R, X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X101G-X103A-X104I-X115R-X232V-X245R, X052N-X078R-X103N-X148I-X213A, X018R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X024R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X024R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X025R-X089I-X116A-X239S-X270C, X024R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X148I-X213A-X252R, X024R-X025R-X183D-X192W-X239S, X046R-X194F-X212M, X104L-X217E-X224A-X249R-X252R, X023A-X091F-X121F-X192W-X236N, X101G-X103A-X104I-X232V-X244R-X245R, X099F-X144R-X167W-X252R, X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X022W-X078R-X167W-X212M-X270C, X121F-X252R-X270C, X020R-X103N-X216F-X236N-X252R, X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X023A-X052N-X192W-X198L-X252R, X025R-X046R-X121F, X024R-X078R-X104L-X116A-X183D, X046R-X059A-X103N-X211Q-X212M, X020R-X052N-X062Q-X091F-X192W, X023A-X052N-X144R-X192W-X216F, X101G-X103A-X104I-X232V-X242R-X245R, X052N-X103N-X116A-X148I-X192W, X089I-X116A-X117F-X224A-X249R, X144R-X211Q-X238L-X239S-X249R, X043A-X062Q-X194F-X211Q, X020R-X024R-X052N-

X059A-X216F, X024R-X167W-X224A-X249R, X057R-X167W-X249R, X025R-X103N-X186K-X194F-X224A, X105T-X128N-X144R-X148I-X212M, X020R-X059A-X144R-X192W-X224A, X024R-X043A-X117F-X194F-X211Q, X117F-X194F-X213A-X270C, X078R-X091F-X121F-X233C-X252R, X057R-X099F-X105T-X198L-X213A, X023A-X091F-X101A-X198L-X252R, X062Q-X103N-X121F-X144R-X249R, X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X242R-X245R, X023A-X024R-X117F-X212M-X216F, X104L-X213A-X216F, X194F-X211Q-X236N, X062Q-X103N-X117F-X194F, X024R-X062Q-X104L-X106G-X249R, X057R-X089I-X198L, X046R-X059A-X106G-X217E-X249R, X117F-X213A-X215F, X101A-X120F-X192W-X215F-X224A, X043A-X057R-X117F-X144R-X183D, X046R-X183D-X238L, X025R-X043A-X089I-X117F, X078R-X104L-X213A-X215F-X224A, X091F-X099F-X101A-X105T-X167W, X106G-X117F-X238L, X046R-X089I-X091F-X101A-X116A, X020R-X062Q-X089I-X186K-X212M, X057R-X099F-X121F-X185I-X192W, X046R-X089I-X192W-X233C-X270C, X089I-X117F-X185I-X215F-X233C, X052N-X104L-X183D-X216F-X249R, X078R-X099F-X116A-X186K-X224A, X025R-X105T-X128N-X144R-X270C, X105T-X211Q-X216F, X024R-X046R-X091F-X121F, X106G-X185I-X216F-X236N, X062Q-X101A-X236N-X252R-X270C, X025R-X043A-X091F-X198L-X270C, X020R-X023A-X104L-X192W-X233C, X024R-X043A-X105T-X106G-X198L, X020R-X089I-X217E, X024R-X091F-X198L-X215F-X239S, X046R-X089I-X099F-X186K-X212M, X104L-X120F-X186K-X216F-X252R, X022W-X194F-X213A-X233C-X238L, X099F-X105T-X106G-X194F-X212M, X089I-X105T-X116A-X215F-X216F, X025R-X116A-X120F-X224A-X270C, X043A-X059A-X101A-X216F-X224A, X057R-X183D-X236N, X025R-X062Q-X128N-X144R-X185I, X103N-X120F-X167W-X198L-X233C, X022W-X089I-X216F, X024R-X106G-X116A-X212M-X224A, X020R-X052N-X101A-X198L-X233C, X089I-X091F-X185I-X211Q-X270C, X111I-X215F-X239S, X024R-

X116A-X186K-X233C-X236N, e X023A-X103N-X106G-X212M-X215F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000227] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X020R-X022W-X078R-X101A-X103A-X104I-X116S-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X024R-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X022W-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X232V-X245R, X020R-X22W-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X232V-X245R, X018R-X104I-X232V-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X211Q-X249R, X018R-X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X018R-X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X043D-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X024R-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X103A-X232V-X249R, X018R-X101G-X104I-X232V-X245R, X020R-X024R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R-X249R, X018R-X22K-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043R-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X22W-X101G-X103A-X104I-X211Q-X232V-X245R, X024R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X22W-X078R-X101A-

X103A-X104I-X116A-X183D-X232V, X018R-X024R-X076D-X116A-X215F-X249R, X018R-X043R-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X024R-X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X211Q-X232V-X245R, X020R-X022W-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X213A-X215F-X232V-X245R, X043D-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X211Q-X249R, X043R-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X101G-X245R, X020R-X22W-X101A-X103A-X104I-X211Q-X213A-X232V-X245R, X020R-X024R-X043D-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X024R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X101G-X103A-X249R, X018R-X22W-X024R-X076D-X101A-X116A-X232V-X245R, X018R-X101G-X104I-X232V-X249R, X020R-X22W-X101A-X103A-X104I-X215F-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X101G-X104I-X213A-X215F-X232V-X245R, X020R-X101G-X103A-X104I-X116A-X215F-X232V-X245R, X024R-X103A-X104I-X249R, X018R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X024R-X101G-X104I-X245R, X020R-X101G-X103A-X104I-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X024R-X103A-X104I-X232V-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X211Q-X215F-X249R, X018R-X245R,

X024R-X103A-X245R, X024R-X103A-X104I-X245R, X020R-X078R-X101G-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X104I-X249R, X018R-X024R-X104I-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X211Q-X215F-X249R, X019H-X020R-X022W-X078R-X101G-X103A-X104I-X211Q-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X22W-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X103A-X104I-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X215F-X249R, X018R-X024R-X101G-X104I-X232V, X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X024R-X043R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X020R-X043D-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X22W-X024R-X076D-X116A-X213A-X249R, X018R-X024R-X101G-X104I, X020R-X101A-X103A-X104I-X215F-X232V-X245R, X018R-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X101G-X103A-X245R, X043R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X211Q-X215F-X232V-X245R, X020R-X22W-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X213A-X215F-X232V-X245R, X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-X215F-X232V-X245R, X020R-X022W-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X232V-X245R, X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X22W-X101A-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X101G-X103A-X232V-X245R, X020R-X022W-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X232V-X245R, X018R-X020R-X024R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X043R-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X101G-X104I-X249R, X020R-X22W-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X232V-X245R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X198L-X211Q-X213A-X232V-X245R, X020R-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X232V-

X245R, X024R-X076D-X104I-X232V-X245R, X018R-X020R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101G-X104I-X232V-X249R, X018R-X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X001T-X018R-X024R-X076D-X116A-X213A-X249R, X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X232V-X245R, X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X076D-X101G-X104I-X232V-X245R, X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-X211Q-X213A-X215F-X249R, X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X022W-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X232V-X245R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X232V-X245R, X020R-X101G-X198L-X215F-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X213A-X215F-X249R, X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X211Q-X232V-X245R, X020R-X022W-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X215F-X232V-X245R, X020R-X022W-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X232V-X245R, X024R-X232V-X245R, X018R-X024R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X024R-X076D-X101A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X213A-X249R, X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X213A-X215F-X249R, X043D-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X020R-X022W-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X215V-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X211Q-X249R, X020R-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X22W-X101A-X103A-X104I-X211Q-X215F-X232V-X245R, X024R-X076D-

X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X101G-X103A-X104I-X116A-X232V-X245R, X018R-X22W-X024R-X076D-X198L-X215F-X249R, X020R-X022W-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X211Q-X213A-X232V-X245R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X043R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X22W-X024R-X076D-X101A-X215F-X249R, X020R-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-X180A-X232V-X245R, X020R-X022W-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X215F-X232V-X245R, X018R-X101G-X103A-X104I, X020R-X22W-X101A-X103A-X104I-X116A-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X103A-X232V-X245R, X020R-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X211Q-X249R, X020R-X101A-X103A-X104I-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X020R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X211Q-X232V-X245R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X211Q-X215F-X232V-X245R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X211Q-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X232V-X249R, X018R-X024R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X076D-X245R, X024R-X104I-X245R, X101G-X232V, X020R-X22W-X101A-X103A-X104I-X116A-X211Q-X215F-X232V-X245R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X213A-X249R, X020R-X022W-X078R-X101A-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X022W-X078R-X101A-X103A-X104I-X198L-X232V-X245R, X024R-X245R-X249R, X020R-X101G-X103A-X104I-X116A-X211Q-X232V-X245R, X018R-X22W-X024R-X076D-X116A-X211Q-X249R, X024R-X101G-X104I-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X104I, X020R-X022W-X078R-

X101A-X103A-X104I-X183D-X198L-X213A-X215F-X232V-X245R,
X018R-X020R-X22W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X213A-
X249R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X232V-X245R, X012H-
X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-X198L-X211Q-X213A-X232V-
X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-X211Q-X215F-X249R, X018R-
X024R-X076D-X213A-X249R, X024R-X104I-X249R, X018R-X022W-
X024R-X076D-X211Q-X249R, X018R-X076D-X103A-X104I-X249R,
X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X020R-
X078R-X101G-X103A-X104I-X183D-X211Q-X213A-X232V-X245R-
X271G, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X215F-
X249R, X018R-X024R-X043D-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-
X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-X198L-X215F-X249R, X018R-
X022W-X024R-X076D-X116A-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-
X024R-X076D-X101A-X116A-X213A-X215F-X249R, X020R-X043D-
X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X045T-X078R-
X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X22W-X024R-
X076D-X101A-X116A-X215F-X249R, X043D-X101G-X103A-X104I-
X232V-X245R-X269R, X020R-X022W-X078R-X101A-X103A-X104I-
X116A-X183D-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-
X116A-X211Q-X213A-X215F-X249R, X024R-X103A-X175L-X232V-
X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X213A-X249R, X020R-X045T-
X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X078R-X101A-
X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R,
X024R-X043R-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-
X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X213A-X215F-
X249R, X043R-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-
X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X245R, X020R-X024R-
X043D-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R,
X024R-X232V, X020R-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-
X211Q-X232V-X245R, X024R-X076D-X101G-X232V-X245R, X018R-

X076D-X101G-X103A-X104I-X249R, X018R-X024R-X076D-X198M-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X22W-X024R-X076D-X101A-X198L-X215F-X249R, X018R-X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X022W-X103A-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X020R-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X232V-X245R, X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X22W-X024R-X076D-X101A-X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X198L-X215F-X249R-X268G, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X211Q-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X211Q-X249R, X101G-X103A-X104I-X245R, X018R-X076D-X101G-X232V-X245R, X018R-X020R-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X198L-X213A-X249R, X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X020R-X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X043D-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X024R-X103A-X232V, X018R-X024R-X076D-X101A-X211Q-X249R, X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X043R-X045T-X076D-X076T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X273T, X018R-X020R-X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X078R-X101A-X103A-X104I-X183D-X215F-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101G-X232V, X232V-X245R, X043R-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X234I-X245R, X024R-X076D-X103A-X104I-X245R, X020R-X078R-X101A-X103A-X104I-X211Q-X213A-X232V-X245R, X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R-X272V, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X249R, X018R-X103A-X104I-X232V, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X215F-X232V-

X245R, X024R-X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-
X269R, X018R-X022W-X024R-X076D-X213A-X215F-X249R, X018R-
X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X211Q-X213A-X249R, X020R-
X22W-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X232V-
X245R, X020R-X022W-X078R-X101G-X103A-X104I-X211Q-X213A-
X232V-X245R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X215F-X232V-
X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X183D-X215F-X249R,
X018R-X024R-X076D-X116A-X117I-X183D-X213A-X249R, X018R-
X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X213A-X249R, X018R-
X22W-X024R-X076D-X101A-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-
X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-
X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X020R-X022W-
X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X198L-X232V-X245R, X018R-
X043R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R,
X018R-X024R-X076D-X116A-X198L-X209H-X213A-X249R, X020R-
X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X232V-
X245R, X024R-X076D-X101G-X175L-X232V-X245R, X018R-X043D-
X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X045T-X076D-X078R-
X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X078R-X101A-X103A-
X104I-X116A-X183D-X198L-X215F-X232V-X245R, X043R-X076D-
X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X024R-X076D-
X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X198L-
X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X213A-X215F-
X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X213A-
X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X211Q-X213A-
X249R, X018R-X024R-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-
X116A-X215F-X249R, X024R-X076D-X104I-X245R, X027R-X043R-
X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X024R-X076D-
X116A-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-
X198L-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X198L-X211Q-X213A-

X215F-X249R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X043D-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043R-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X22W-X024R-X076D-X116A-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X211Q-X215F-X249R, X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X232V-X245R, X018R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X101G-X104I, X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X020R-X078R-X101A-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X249R, X018R-X024R-X076D-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X076D-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X211Q-X213A-X249R, X020R-X022W-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X114T-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X22W-X024R-X076D-X116A-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X249R, X020R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X211Q-X213A-X249R, X018R-X022K-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X232V, X018R-X024R-X076D-X116A-X249R, X020R-X024R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043D-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X211Q-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X043D-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X22W-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X215F-

X232V-X245R, X020R-X101G-X103A-X104I-X183D-X211Q-X232V-X245R-, X018R-X024R-X076D-X101A-X198L-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X198L-X249R, X018R-X024R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X213A-X249R, X018R-X043D-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X131V-X183D-X213A-X232V-X245R, X018R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X211Q-X249R, X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X024R-X101G-X245R, X024R-X076D-X101G-X245R, X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X183D-X211Q-X215F-X249R, X024R-X101G, X018R-X22W-X024R-X076D-X213A-X215F-X249R, X020R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X183D-X198L-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X043D-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X043D-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X024R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X198L-X211Q-X215F-X232V-X245R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X215F-X232V-X245R, X018R-X020R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X215F-X249R, X018R-X104I, X018R-X024R-X076D-X116A-X198L-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X088I-X101A-X116A-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X211Q-X213A-X249R, X043R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X076D-X101G-X104I-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X213A-X215F-X249R, X018R-X22W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X215F-X249R, X018R-X020R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R-X269R, X024R-

X076D-X245R, X018R-X020R-X043R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X211Q-X215F-X249R, X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X22W-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X215F-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X043R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X043R-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X213A-X249R, X020R-X022W-X101A-X116A-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X043R-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X218S-X232V-X245R, X018R-X103A, X020R-X22W-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X215F-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X211Q-X213A-X249R, X024R-X043R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X232V-X245R, X020R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X027R-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X183D-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X104I, X101G-X103A-X104I-X232V-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X198L-X211Q-X249R, X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R-X275S, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-

X183D-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X198L-X213A-X249R,
X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X211Q-X249R, X004M-
X018R-X024R-X076D-X116A-X198L-X211Q-X213A-X249R, X104I-
X232V-X249R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-
X211Q-X215F-X232V-X245R, X020R-X101A-X103A-X104I-X116A-
X183D-X211Q-X232V-X245R-X274I, X020R-X101A-X103A-X104I-
X213A-X232V-X245R, X020R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-
X211Q-X213A-X232V-X245R, X020R-X024R-X043D-X078R-X101G-
X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X103A-X249R,
X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X215F-
X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X249R,
X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X198L-X215F-X249R, X018R-
X024R-X076D-X101A-X211Q-X213A-X215F-X249R-X270V, X018R-
X043D-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-
X269R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X183D-X232V-X245R,
X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X213A-X249R,
X018R-X022W-X024R-X076D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-
X022W-X024R-X076D-X198L-X213A-X249R, X020R-X022W-X101G-
X103A-X104I-X116A-X183D-X232V-X245R, X018R-X22W-X024R-
X076D-X116A-X198L-X213A-X249R, X043R-X045T-X078R-X101G-
X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X024R-X076D-X101G-
X103A-X104I-X232V, X101G-X249R, X024R-X076D-X101G-X103A-
X104I-X175L-X249R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-
X183D-X232V-X245R-X269S, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-
X198L-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X249R, X018R-
X020R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X215F-X249R, X018R-
X024R-X076D-X213A-X215F-X249R-X260K, X018R-X024R-X076D-
X116A-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-
X116A-X198L-X249R, X024R-X076D-X101G-X103A-X104I-X245R,
X024R-X076D-X103A-X249R, X018R-X101G-X103A-X104I-X232V-

X245R-X249R, X018R-X024R-X076D-X198L-X211Q-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X213A-X249R, X020R-X024R-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X043D-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X272D, X018R-X024R-X076D-X116A-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X22W-X024R-X076D-X101A-X198L-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X198L-X249R, X024R-X076D-X101G-X103A-X232V, X024R-X103A-X104I, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X215F-X249R, X024R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X020R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X232V-X245R, X024R-X043D-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X183D-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X020R-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X211Q-X215F-X249R, X020R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X215F-X232V-X245R, X018R-X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X024R-X076D-X198L-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X213A-X249R, X020R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X024R-X076D-X103A-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X211Q-X213A-X215F-X249R, X103A-X104I-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X211Q-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X043D-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X211Q-X213A-X215F-X249R, X016T-X043R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X215F-X249R, X043R-X076D-X101G-X103T-X104I-X232V-X245R-

X249R-X269R, X020R-X078R-X101A-X103A-X104I-X115E-X116A-X183D-X211Q-X213A-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X198L-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X249R, X020R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101G, X076D-X101G-X232V-X245R, X018R-X076D-X101G-X103A-X104I-X245R, X018R-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X024R-X076D-X215F-X249R, X018R-X104I-X232V, X043D-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X024R-X076D-X101G-X232V-X249R, X103A-X232V-X245R, X020R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X215F-X249R, X024R-X076D-X103A-X104I-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I, X020R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X215F-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X215F-X249R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X020R-X024R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X131T-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X198L-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X211Q-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043R-X101G-X103A-X104I-X245R-X249R, X018R-X076D-X232V-X249R, X018K-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R-X269R, X018R-X020R-X024R-X043D-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X213A-X215F-X249R-X267I, X232V-X249R,

X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X211Q-X213A-X215F-X249R,
X076D-X104I-X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X183D-X198L-
X211Q-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X211Q-X213A-
X249R, X024R-X101G-X103A-X232V, X018R-X020R-X022W-X024R-
X076D-X116A-X183D-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-
X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-
X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X215F-X249R, X020R-X022W-
X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X215F-X232V-X245R,
X018R-X024R-X076D-X116A-X198L-X211Q-X249R, X103A-X232V-
X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X215F-
X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X213A-X249R,
X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X213A-X249R, X018R-X024R-
X076D-X101A-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-
X101A-X116A-X183D-X211Q-X249R, X018R-X045T-X101G-X103A-
X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X020R-X045T-X076D-X078R-
X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-
X116A-X198L-X213A-X215F-X249R, X020R-X022W-X101G-X103A-
X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X232V-X245R, X018R-X020R-
X024R-X076D-X198L-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-
X101A-X116A-X211Q-X249R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-
X116A-X183D-X232V-X245R-X274I, X024R-X103A-X245R-X249R,
X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X249R,
X018R-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-
X022W-X024R-X076D-X116A-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-
X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X213A-X249R, X018R-
X043D-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R,
X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X211Q-X213A-X215F-X249R,
X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X213A-X249R, X043D-
X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X024R-
X076D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-

X076D-X116A-X183D-X213A-X249R, X103A-X232V, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X249R, X018R-X043R-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X211Q-X215F-X249R, X043R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X198L-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X211Q-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X198L-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X198L-X211Q-X249R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X232V-X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X215F-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X249R, X018R-X024R-X076D-X232V, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X249R, X020R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X232V-X245R-X263S, X024R-X076D-X101G-X104I-X232V-X249R, X043R-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X024R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X198L-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X197A-X213A-X215F-X249R, X024R-X101G-X103A, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X211Q-X215F-X249R, X043R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X024R-X104I-X232V, X018R-X024R-X076D-X183D-X211Q-X249R, X020R-X043R-X045T-X078R-X101G-

X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-
X101A-X116A-X183D-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-
X150T-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X213A-X249R,
X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X215F-X249R,
X018R-X020R-X024R-X076D-X211Q-X249R, X018R-X024R-X076D-
X101A-X116A-X183D-X198L-X249R, X024R-X076D-X232V-X249R,
X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-
X211Q-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116T-
X198L-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X198L-X211Q-
X215F-X249R, X018R-X022R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-
X211Q-X249R, X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-
X020R-X024R-X076D-X101A-X183D-X211Q-X249R, X020R-X101G-
X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X232V-X245R, X076D-X101G-
X103A-X245R, X020R-X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-
X245R-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X249R, X018R-
X024R-X076D-X101A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-
X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X249R, X018R-
X22W-X024R-X076D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-
X076D-X183D-X211Q-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-
X116A-X183D-X213A-X249R, X043R-X078R-X101G-X103A-X104I-
X217E-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X215F-
X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X211Q-
X213A-X249R, X076D-X101G-X104I-X249R, X018R-X022W-X024R-
X076D-X101A-X116A-X183D-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-
X183D-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X215F-
X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X198L-X215F-X249R,
X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X249R, X020R-
X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X232V-X245R, X018R-X024R-
X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X249R, X018R-X020R-X024R-
X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X076D-X078R-X101G-

X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X020R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X209H-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X198L-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X076D-X245R, X076D-X101G-X104I-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X211Q-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X211Q-X213A-X249R, X020R-X024R-X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X215F-X249R, X020R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X215F-X232V-X245R, X101G-X103A-X104I, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X204D-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X198L-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X209V-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X043R-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X215F-X249R,

X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X198L-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X211Q-X215F-X249R-X269D, X018R-X020R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X213A-X249R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X183D-X215F-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X209H-X211Q-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X249R, X076D-X232V-X245R, X043D-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X198L-X211Q-X215F-X245R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X213A-X249R, X020R-X024R-X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X215F-X249R, X020R-X090S-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X183D-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X249R, X043D-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X213A-X249R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X020R-X024R-X043D-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X043D-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X076D-X103A-X104I-X232V-X245R, X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-

X101A-X183D-X211Q-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-
X101A-X116A-X183D-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-
X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X043D-X076D-X078R-
X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X076D-X103A-X104I-
X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X211Q-X213A-
X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X249R,
X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X215F-
X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X213A-X215F-X249R,
X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X249R,
X018R-X024R-X076D-X101G-X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-
X116A-X183D-X198L-X213A-X215F-X249R, X043R-X045T-X076D-
X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X020R-X022W-X024R-
X076D-X116A-X198L-X213A-X215F-X249R, X076D-X104I-X232V-
X245R, X027R-X043R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-
X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X213A-X215F-
X249R, X018R-X024R-X076D-X103A-X104I-X135I-X232V, X018R-
X020R-X022W-X024R-X076D-X183D-X198L-X211Q-X249R, X018R-
X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X215F-
X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X249R,
X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R,
X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X249R, X005S-X018R-X022W-
X024R-X076D-X101A-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-
X116A-X183D-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X198L-
X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-
X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X249R,
X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X249R, X018R-
X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X213A-X249R,
X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X211Q-X213A-X249R,
X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X198L-X249R, X018R-X024R-
X076D-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-

X116A-X183D-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X215F-X249R, X018R-X020R-X043D-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X183D-X198L-X215F-X232V-X245R, X076D-X101G-X103A-X104I-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X183D-X198L-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X211Q-X243D-X249R, X018R-X020R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X024R-X076D-X101G, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X183D-X215F-X249R, X018R-X043D-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X213A-X245R, X020R-X024R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X020R-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X211Q-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X198L-X211Q-X215F-X249R-X269S, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X183D-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X086V-X101A-X183D-X198L-X211Q-X249R, X018R-

X076D-X101G-X198T-X232V, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X249R-X248T, X018R-X076D-X104I-X245R-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X249R, X043R-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X043R-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X076D-X101G-X104I, X020R-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X043D-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X249R, X018R-X076D-X104I, X018R-X020R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X183D-X211Q-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X101G-X104I, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X183D-X215F-X249R-X263D, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X198L-X215F-X249R-X269H, X018R-X043D-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-

X232V-X245R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X183D-X198L-X213A-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X249R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X104I-X232V, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X249R, X043D-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X211Q-X249R, X018R-X020R-X043R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X024R-X043R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X043R-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X166F-X176P-X179V-X184T-X187P-X194P, X018R-X022W-X024R-X041E-X076D-X101A-X160T-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X198L-X213A-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X183D-X211Q-X215F-X249R, X024R-X076D-X104I, X018R-X076D-X101G-X232V, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X215F-X249R, X018R-X024R-X031F-

X076D-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X213A-X249R-X269S, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X215F-X249R, X018R-X043R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X114T-X198L-X211Q-X215F-X249R, X024R-X043R-X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X024R-X076D-X103A-X104I-X232V, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X215F-X249R, X101G-X104I-X232V, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X198L-X211Q-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X183D-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X211Q-X213A-X249R, X018R-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X215F-X249R-X260A, X076D-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X213A-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X249R, X076D-X104I-X249R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X024R-X043R-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X183D-X198L-X215F-X249R, X018R-X076D-X101G-X103A, X020R-X024R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X249R, X101G-X103A-X232V, X024R-X076D-X101G-X232V, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X211Q-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X183D-X198L-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-

X211Q-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X156V-X183D-X211Q-X215F-X249R-X269S, X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X249R, X018R-X076D-X101G, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X211Q-X249R, X018R-X076D-X232V, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X232V-X245R, X018R-X043D-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X211Q-X213A-X237D-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X249R-X275S, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X024R-X076D, X018R-X024R-X076D-X183D-X211Q-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X213A-X215F-X249R, X076D-X104I-X232V-X249R, X018R-X076D-X103A-X232V, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X183D-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X175E-X183D-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R-X273E, X020R-X024R-X043D-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X005S-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X103A-X104I-X232V, X018R-X020R-X024R-X068A-X076D-X101A-X116A-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X215F-X249R-X275S, X018R-X024R-X076D-X183D-X198L-X211Q-X213A-X249R, e X043D-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, sendo que as posições de

aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000228] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X018R-X024R-X043R-X076D-X249R-X269R, X018R-X022R-X024R-X043R-X076D-X249R, X018R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X022R-X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043R-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X022R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X043R-X076D-X249R, X018R-X024R-X076D-X242R-X249R, X018R-X024R-X076D-X249R-X269R, X018R-X022R-X024R-X076D-X249R, X018R-X024R-X076D-X078R-X249R, X018R-X024R-X043D-X076D-X249R-X269R, X018R-X022R-X024R-X043D-X076D-X249R, X018R-X024R-X043D-X076D-X078R-X249R, X020R-X101G-X103G-X104I-X232V-X245R, X020R-X101G-X103A-X104L-X232V-X245R, X020R-X101G-X103A-X104V-X232V-X245R, X020R-X101G-X103S-X104I-X232V-X245R, X020R-X101G-X103S-X104L-X232V-X245R, X020R-X101S-X103S-X104I-X232V-X245R, X020R-X101S-X103S-X104L-X232V-X245R, X020R-X101A-X103A-X104L-X232V-X245R, X020R-X101S-X103S-X104V-X232V-X245R, X020R-X101S-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X101S-X103A-X104V-X232V-X245R, X020R-X101S-X103G-X104I-

X232V-X245R, X020R-X101S-X103G-X104V-X232V-X245R, X020R-X101A-X103A-X104V-X232V-X245R, X020R-X101A-X103S-X104I-X232V-X245R, X020R-X101A-X103S-X104V-X232V-X245R, X018R-X024R-X043R-X076D-X078R-X249R, X024R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X024R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X242R-X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X217E-X249R, X018R-X024R-X043R-X076D-X217E-X249R, X018R-X024R-X043D-X076D-X242R-X249R, X018R-X020R-X024R-X043R-X076D-X249R, X020R-X101A-X103G-X104V-X232V-X245R, X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X217E-X249R-X269R, e X018R-X024R-X076D-X217E-X242R-X249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000229] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X020R-X101A-X103A-X104I-X118R-X232V-X245R, X020R-X024R-X116A-X213A, X043R-X101A-X116A-X215F-X269R, X024R-X043R-X101A-X116A, X024R-X043R-X101A-X116A-X215F-X269R, X020R-X101G-X103A-X104I-X215F-X232V-X245R, X043R-X101A-X269R, X024R-X043R-X116A-X213A-X269R, X020R-X024R-X043R-X045T-X101A-X213A, X024R-X043R-X116A-X215F-X269R, X020R-X024R-X213A-X215F, X020R-X116A-X269R, X024R-X116A-X213A-X269R, X043R-X101A-X116A-X269R, X101G-X103A-X104I-X116A-X213A-X232V-X245R-X269R, X024R-X043R-X045T-X101A-X116A-X215F-X269R, X020R-X043R-X101A-

X269R, X101A-X103A-X104I-X213A-X232V-X245R-X269R, X024R-X215F-X269R, X043R-X101A-X116A-X213A-X215F-X269R, X043R-X101A-X213A-X269R, X020R-X024R-X043R-X045T-X116A-X213A, X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X024R-X043R-X045T-X101A-X116A-X213A-X269R, X024R-X043R-X045T-X269R, X020R-X043R-X045T-X101A-X269R, X024R-X043R-X116A-X269R, X020R-X024R-X043R-X045T, X043R-X116A-X269R, X024R-X043R-X101A-X215F-X269R, X024R-X043R-X045T-X213A-X215F-X269R, X020R-X024R-X045T-X269R, X020R-X043R-X101A-X116A-X213A-X215F, X020R-X101G-X103A-X104I-X213A-X215F-X232V-X245R, X020R-X024R-X045T-X116A-X269R, X020R-X101A-X116A-X269R, X024R-X043R-X215F, X020R-X024R-X213A, X024R-X043R-X101A-X215F, X020R-X024R-X043R-X045T-X116A, X020R-X024R-X043R-X045T-X101A-X269R, X020R-X024R-X101A-X215F, X020R-X024R-X116A-X213A-X215F, X020R-X024R-X116A, X020R-X024R-X101A-X116A, X043R-X213A-X215F-X269R, X024R-X101A-X269R, X024R-X043R-X116A-X215F, X020R-X038A-X043R-X101A, X020R-X024R-X116A-X215F, X024R-X043R-X101A-X213A, X014L-X020R-X024R-X043R-X045T-X101A-X215F, X020R-X024R-X215F, X020R-X116A-X215F-X269R, X020R-X045T-X116A-X269R, X020R-X024R-X043R-X045T-X215F, e X020R-X024R-X043R-X045T-X116A-X213A-X215F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000230] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X043R-X076D-X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X024R-

X043R-X076D-X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F-X271F, X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X076D-X101G-X103A-X104I-X114V-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X024R-X076D-X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X024R-X043R-X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X043R-X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101A-X103A-X104I-X158E-X166D-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X076D-X101G-X103A-X104I-X128L-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, e X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X158E-X166D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000231] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X022A-X101G-X103A-X104I-X159D-X217E-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X043R-X101G-X103A-X104I-X159D-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X101G-X103A-X104I-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D-X271F, X043R-X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X043R-X076D-X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-

X249R, X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X183D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X076D-X101G-X103A-X104I-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X076D-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X076D-X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X043R-X101A-X103A-X104I-X158E-X166D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X076D-X101A-X103A-X104I-X158E-X166D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X076D-X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101A-X103A-X104I-X158E-X166D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X043R-X076D-X101A-X103A-X104I-X158E-X166D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X101G-X103A-X104I-X158E-X166D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X076D-X101A-X103A-X104I-X158E-X166D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X101G-X103A-X104I-X158E-X183D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128L-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X076D-X101G-X103A-X104I-X158E-X166D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X043R-X076D-X101A-X103A-X104I-X158E-X166D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, e X076D-X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000232] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de

subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X017R-X022A-X076D-X101G-X103A-X104I-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X043R-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X101G-X103A-X104I-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X017R-X022A-X076D-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X076D-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X022A-X101G-X102A-X103A-X104I-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D-X271F, e X022A-X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000233] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X101S-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101S-X103G-X104V-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103S-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101A-X103A-X104L-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103G-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101S-X103G-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101S-X103S-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101S-X103S-X104V-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101A-X103S-X104I-X158E-

X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101A-X103S-X104I-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101S-X103A-X104I-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104L-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101A-X103A-X104L-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101A-X103S-X104L-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103S-X104L-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101S-X103A-X104L-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101A-X103G-X104V-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, e X101S-X103A-X104V-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000234] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X026F-X051W-X104L-X106E, X026F-X031F-X078N-X102A-X160D, X020K-X100S-X116L-X158E-X166D-X243F, X033S-X043W-X218D-X239G-X243F, X022L-X038F-X048R-X062E-X100S-X186K, X101D-X103N-X116L-X144R-X215D, X104L-X105T-X213A-X217E-X256N, X043W-X101D-X212M-X243F, X026F-X048R-X105T-X213A-X218D-X224A, X024F-X101D-X118R-X215D-X250I-X272F, X121F-X185E-X224A-X239G, X022L-X031F-X102A-X128D-X224A-X243F, X062E-X078N-X102A-X116L-X144R-X250I, X022L-X038F-X121F-X160D-X272F, X026F-X078N-X159C-X186K-X243F, X024F-X048R-X118R-X166D-X217E, X023A-X038F-X078N-X100S-X212M-X215D, X100S-X116L-X158E-X213A, X078N-X104L-X118R-X128D, X102A-X103N-X105T-X194E, X022L-X078N-X128D-X213A, X027R-X100S-X118R-X160D-X188D-X243F, X024F-X102A-X186K-X213A-X217E-X243F, X033S-X105T-X188D-X216F,

X023A-X100S-X194E-X212M, X048R-X128D-X185E-X239G, X020K-X024F-X033S-X129E-X194E, X020K-X027R-X129E-X166D-X239G, X022L-X023A-X027R-X101D-X104L-X216F, X033S-X118R-X129E-X194E-X239G, X022L-X078N-X116L-X129E-X256N, X027R-X101D-X103N-X105T-X272F, X048R-X078N-X116L-X185E-X217E-X239G, X023A-X024F-X027R-X062E, X024F-X103N-X104L-X118R-X188D, X026F-X104L-X256N-X272F, X024F-X043W-X104L-X121F-X129E, X062E-X078N-X116L-X224A, X023A-X024F-X051W-X158E, X027R-X038F-X102A-X116L, X062E-X078N-X144R-X212M, X031F-X116L-X256N-X272F, X022L-X033S-X104L-X116L-X160D-X186K, X024F-X118R-X129E-X186K-X213A, X043W-X105T-X213A-X215D-X216F, X031F-X105T-X186K-X188D, X026F-X194E-X213A-X256N, e X103N-X160D-X250I-X256N, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000235] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X022A-X024R-X101D-X103A-X104I-X118R-X159D-X188D-X232V-X248D-X271F, X022A-X024R-X103A-X104I-X129E-X159D-X188D-X232V-X248D-X271F, X022A-X024R-X103A-X104I-X118R-X159D-X188D-X217D-X232V-X248D, X022A-X024R-X101D-X103A-X104I-X118R-X129E-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101D-X103A-X104I-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X043R-X103A-X104I-X118R-X129E-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X043R-X103A-X104I-X118R-X128I-X129E-X159D-X188D-X232V-X248D, X022A-X043R-X101D-X103A-X104I-X118R-X129E-X159D-X188D-X232V-

X248D-X271F, X022A-X024R-X043R-X101D-X103A-X104I-X159D-
 X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X103A-X104I-X159D-X188D-
 X232V-X248D, X022A-X024R-X103A-X104I-X118R-X129E-X159D-
 X188D-X232V-X248D-X271F, X022A-X024R-X103A-X104I-X159D-
 X188D-X217D-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X043R-X062E-
 X103A-X104I-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-
 X043R-X103A-X104I-X129E-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D,
 X022A-X024R-X103A-X104I-X159D-X188D-X217D-X232V-X248D-
 X271F, X022A-X103A-X104I-X118R-X159D-X188D-X217D-X232V-
 X245R-X248D, X022A-X024R-X101D-X103A-X104I-X118R-X128I-
 X159D-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X043R-X103A-
 X104I-X159D-X188D-X217D-X232V-X248D-X271F, X022A-X043R-
 X103A-X104I-X118R-X159D-X188D-X217D-X232V-X248D-X271F,
 X022A-X043R-X103A-X104I-X118R-X159D-X188D-X232V-X248D-
 X271F, X022A-X103A-X104I-X128I-X129E-X159D-X188D-X232V-
 X248D-X271F, X022A-X103A-X104I-X159D-X188D-X217D-X232V-
 X245R-X248D-X271F, X022A-X043R-X103A-X104I-X128I-X159D-
 X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X101D-X103A-X104I-X118R-
 X159D-X188D-X217D-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X103A-
 X104I-X118R-X129E-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D-X271F,
 X022A-X024R-X043R-X103A-X104I-X118R-X159D-X188D-X217D-
 X232V-X248D, X022A-X062E-X103A-X104I-X118R-X159D-X188D-
 X232V-X245R-X248D, X022A-X043R-X101D-X103A-X104I-X118R-
 X129E-X159D-X188D-X217D-X232V, X022A-X024R-X103A-X104I-
 X159D-X188D-X217D-X232V-X248D, X022A-X024R-X043R-X103A-
 X104I-X118R-X128I-X129E-X159D-X188D-X217D-X232V-X248D-
 X271F, e X022A-X103A-X104I-X118R-X159D-X188D-X217D-X232V-
 X245R-X248D-X271F, sendo que as posições de aminoácido da vari-
 ante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequên-
 cia de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apre-

sentada como SEQ ID NO:1.

[000236] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X020K-X024F-X062E-X188D-X239G, X024F-X062E-X116L-X239G, X020K-X023A-X062E-X188D, X020K-X023A-X024F-X062E-X118R-X188D-X213A, X020K-X043W-X062E-X116L-X188D-X213A-X239G, X023A-X062E-X116L-X118R, X023A-X024F-X062E-X116L-X118R, X024F-X116L, X024F-X062E-X188D-X213A, X023A-X062E-X116L-X118R-X188D-X239G, X020K-X024F-X062E, X020K-X043W-X062E-X116L-X239G, X024F-X062E-X116L-X213A-X239G, X020K-X024F-X043W-X062E-X116L-X213A, X020K-X023A-X024F-X062E-X116L-X188D-X213A, X024F-X062E-X188D-X239G, X023A-X043W-X062E-X116L-X118R-X213A, X062E-X188D-X239G, X020K-X024F-X062E-X239G, X024F-X116L-X118R-X188D-X239G, X020K-X023A-X062E-X116L-X118R-X213A, X020K-X023A-X024F-X062E-X188D-X213A-X239G, X024F-X043W-X118R-X188D, X023A-X024F-X116L-X118R-X188D-X213A, X020K-X023A-X043W-X116L-X188D-X213A-X239G, X023A-X024F-X116L-X188D-X239G, X023A-X043W-X116L-X118R-X188D, X023A-X024F-X118R-X188D-X239G, X023A-X024F-X043W-X062E-X116L-X118R, X020K-X043W-X188D-X213A, X024F-X062E-X118R-X239G, X023A-X043W-X188D-X213A, X020K-X024F-X043W-X062E-X116L-X118R-X188D-X239G, X020K-X116L-X188D-X239G, X020K-X043W-X062E-X118R, X020K-X043W-X116L-X188D-X213A, X020K-X024F, X023A-X043W-X116L-X239G, X023A-X024F-X043W-X116L-X118R-X188D-X239G, X020K-X023A-X043W-X213A, e X023A-X024F-X062E-X118R-X213A-X239G, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoá-

cidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000237] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X020K-X023A-X043W-X118R-X128I-X129E-X159D-X188D, X024F-X118R-X128I-X129E-X159D, X020K-X024F-X062E-X116L-X118R-X188D, X020K-X062E-X116L-X188D, X062E-X116L-X118R-X213A, X020K-X023A-X062E-X116L-X188D, X062E-X116L-X118R-X188D, X020K-X062E-X116L-X213A, X020K-X023A-X062E-X116L, X020K-X062E-X188D-X213A, X020K-X062E, X020K-X024F-X062E-X116L-X188D, X020K-X043W-X062E-X116L-X188D, X020K-X024F-X062E-X188D-X213A, X062E-X116L-X188D-X213A, X020K-X062E-X116L, X020K-X023A-X062E-X116L-X188D-X213A, X023A-X024F-X062E-X116L-X213A, X022A-X043R-X103A-X104I-X128I-X129E-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X043R-X103A-X104I-X118R-X128I-X129E-X159D-X188D-X232V-X248D-X271F, X024F-X062E-X116L-X188D, X022A-X024R-X103A-X104I-X118R-X128I-X129E-X159D-X188D-X232V-X248D, X023A-X062E-X116L-X188D, X043W-X062E-X116L, X020K-X023A-X116L-X188D, X043W-X062E-X116L-X188D, X024F-X062E-X116L, X062E-X116L-X188D, e X022A-X024R-X103A-X104I-X128I-X159D-X188D-X232V-X248D, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000238] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de

aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X087R-X101G-X103A-X104I-X109R-X212P-X232V-X245R-X271V, X101G-X103A-X104I-X109R-X232V-X245R, X101G-X103A-X104I-X109R-X212P-X232V-X245R-X271V, X101G-X103A-X104I-X109R-X212P-X232V-X245R, X076D-S87R-X103A-X104I-X212P-X271V, X076D-X103A-X104I-X109R, X076D-X103A-X104I-X212P-X271V, X076D-X103A-X104I-X109R-X245R, e X076D-X103A-X104I-X212P-X245L-X271V, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000239] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X024R-X086W-X118R, X024R-X078R-X086W-X243F, X024R-X033S-X086S-X087N-X209A, X033S-X118R, X024R-X078R-X086W-X118R-X270T, X024R-X033S-X086W-X118R, X078R-X086W-X243F, X033S-X078R-X086W-X118R-X209A, X033S-X078R-X209A, X086W-X118R-X243F, X024R-X086W, X078R-X086W-X235F, X024R-X118R, X024R-X086R, X101G-X103A-X104I-X232V, X024R-X033S-X078R-X086W-X118R, X024R-X118R-X209A, X209A-X241R, X033S-X086W-X243F, X033S-X172V-X209A, X118R-X209A-X243F, X024R-X086S-X141G, X024R-X118R-X209A-X243F, X024R-X033S-X086S-X085N-X235F, X024R-X033S-X133V, X024R-X033S-X078R-X086W, X024R-X086W-X209A, X024R-X241R, X033S-X118R-X243F, X024R-X235F, X024R-X078R-X086W, X024R-X118R-X209A-X235F, X024R-X209A-X241R, X033S-X118R-X241R, X086W-X118R-X209A, X033S-X118R-X159D-X209A, X033S-X078R-X086W, X024R-X086W-X243F, X118R-X209A, X024R-X086W-X118R-X203I,

X078R-X209A-X235F, X024R-X033S-X241R, X078R-X118R, X033S-X118R-X209A-X243F, X021M-X024R-X033S, X024R-X033S-X086W, X033S-X235F, X078R-X086W-X209A, X024R-X033S-X209A-X235F, X033S-X086W-X118R, X024R-X033S-X078R-X209A, X033S-X086W-X118R-X209A-X243F, X086W-X209A-X243F, X005S-X078R-X118R-X241R, X024R-X174T, X033S-X209A-X243F, X086W-X118R-X133V, X024R-X033S-X118R, X024R-X086W-X209A-X235F, X086W-X209A, X008T-X024R, X086W-X118R, X033S-X241R, X005S-X024R-X033S-X243F, X024R-X209A-X242P, X024R-X033S-X078R-X118R, X024R-X033S-X194T, X024R-X243F, X024R-X209A, X024R-X033S-X118R-X209A, X033S-X086W, X024R-X033S, X024R-X033S-X078R-X243F, X086W-X243F, X033S-X118D-X138V-X209A, X033S-X209A-X235F, X024R-X086R-X118R, X033S-X201S, X024R-X239Q, X033S-X118R-X209A-, X078R-X086W, X235F-X243F, X024R-X209A-X235F, X118R-X172V, X017Y-X024R-X033S-X086W, X033S-X148F, X024R-X118R-X235F, X033S-X078R, X033S-X243F, X024C-X033S, X118R-X194T, X033S-X209A, X118R-X209A-X235F, X024R-X033S-X209A-X243F, X024R-X033S-X235F, X024R-X033S-X118R-X235F, X024R-X141G, X024R-X274I, X024R-X033S-X209A, X086W-X235F, X024R-X209A-X243F, X004E-X033S-X078R, X086W-X209A-X235F, X015T-X033S, X033S-X086W-X156L-X209A, X024R-X118R-X243F-X269H, X209A-X235F, X024R-X247H, X024R-X033S-X228T, X078R-X235F, X024R-X033S-X174V-X235F, X024R-X235F-X243F, X024R-X033S-X235F-X241R, X024R-X033S-X151V, X024R-X104A, X033S-X048T, X012H-X104A-X118R, X118R-X235F, X033S-X253A, X143A-X209A, X024R-X033S-X243F, X033S-X239T, X209A-X243F, X024R-X033S-X129H-X184D-X253M, X024R-X085V-X086W-X118R-X235F, X024R-X272P, e X024R-X269C, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada

como SEQ ID NO:1.

[000240] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X020R-X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X087D-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X150L-X249R, X018R-X024R-X043R-X076D-X087D-X249R, X018R-X024R-X043R-X076D-X150L-X249R, X018R-X024R-X076D-X078R-X087D-X249R, X018R-X024R-X076D-X078R-X150L-X249R, X018R-X024R-X076D-X087D-X249R-X269R, X018R-X024R-X076D-X087D-X242R-X249R, X018R-X024R-X076D-X087D-X150L-X249R, X018R-X024R-X076D-X150L-X249R, X018R-X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R, X018R-X022R-X024R-X076D-X087D-X249R, X018R-X022R-X024R-X076D-X150L-X249R, X043R-X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X043R-X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R, X024R-X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X024R-X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R, X078R-X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X078R-X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R, X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R-X249R, X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R-X269R, X022R-X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X043D-X076D-X150L-X249R, X043R-X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X022R-X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R, X018R-X024R-X043D-X076D-X087D-X249R, X018R-X024R-X076D-X087D-X249R, X018R-X024R-X076D-X150L-X242R-X249R, X043R-X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R-X269R, X076D-X101G-X103A-X104I-X150L-

X232V-X245R, X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X242R-X245R, X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R, X076D-X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, e X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X242R-X245R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000241] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X024R-X101G-X103A-X104I-X129Q-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X130A-X158E-X183D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129Q-X158E-X183D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X130A-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129Q-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129Q-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129Q-X130A-X158E-X183D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128L-X129Q-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129Q-X130A-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X129Q-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X129Q-X130A-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128L-X129Q-X130A-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X128L-X129Q-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, e X024R-X027R-X101G-X103A-X104I-X128L-X129Q-X130A-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, sendo que as

posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000242] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X101G-X103A-X104I-X232V-X222Q-X245R, X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X222S-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X222Q-X232V-X245R-X248D-X249R, X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X222Q-X245R, X101G-X103A-X104I-X232V-X222S-X245R, X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X222S-X245R, e X076D-X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X222S-X232V-X245R-X248D-X249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000243] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X024R-X101G-X103A-X104I-X128L-X129Q-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X130A-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X128L-X129Q-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X129Q-X130A-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X130A-X158E-X183D-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128L-X129Q-X130A-X158E-X188D-X232V-

X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129Q-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X128L-X130A-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128L-X129Q-X158E-X183D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128L-X129Q-X130A-X158E-X183D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128L-X129Q-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271G, X101G-X103A-X104I-X129Q-X158E-X183D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X130A-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128L-X158E-X183D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X129Q-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, e X024R-X101G-X103A-X104I-X128L-X130A-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000244] A presente invenção fornece, adicionalmente, polipeptídeos que compreendem variantes de subtilisina de uma subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X101G-X103A-X104I, X22A-X101A-X209E, S103G-L111V-G159E, X22A-X103G-X159E, X22A-X111V-X159E, X22A-X128N-X271F-X209E, X22A-X103G-X111V, X62E-X111V-X128N, X22A-X111V-X128N, X22A-X62E-X111V, X101A-X103G-X104L-X188D, X101G-X103A-X104I-X159D, X101A-X103G-X104L-X128N, X22A-X101A-X159E, X101A-X103G-X104L, X101A-X103G-X104L-X159E, X22A-X101A-X103G-X104L, X101A-X103G-X104L-X209E, X22A-X209E-X271F, X22A-X101A-X271F, e X101A-X209E-

X271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000245] A presente invenção fornece, adicionalmente, polipeptídeos que compreendem variantes de subtilisina de uma subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X103A-X104I-X159D-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X104I-X159D-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X159D-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X159D-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X159D-X232V-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X159D-X232V-X236H-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X159D-X232V-X236H-X245R-X252K, e X101G-X103A-X104L-X159D-X232V-X236H-X245R-X248D, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000246] A presente invenção fornece, adicionalmente, polipeptídeos que compreendem variantes de subtilisina de uma subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X238R, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X248R, X101G-X103A-

X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X253R, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X24R, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X76D, X101G-X103A-X104I-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X159E-X232V-X245R-X248D-X271F, X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X245R-X248D-X271F, X22A-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X249R, X22A-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X62E-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X249R, e X62E-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000247] A presente invenção fornece, adicionalmente, polipeptídeos que compreendem variantes de subtilisina de uma subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X20R-X43R-X249R, X20R-X22R-X43R, X20R-X43R-X242R, X20R-X43R-X271L, X20R-X43R-X244R, X20R-X24R-X43R-X242R, X9A-X22R-X78R-X212F-X241R, X9A-X20R-X43R-X212F, X9A-X43R-X212F, X20R-X43R-X212F, X20R-X22R-X43R-X212F, X24R-X78R-X212F, X9A-X43R-X78R, X9A-X43R-X78R-X242R, X9A-X20R-X43R-X78R, X20R-X24R-X43R-X78R-X242R, X22R-X24R-X78R-X212F, X9A-X20R-X43R-X78R-X242R, X20R-X43R-X78R-X249R, X20R-X43R-X78R, X9A-X78R-X212F, X9A-X22R-X43R-X78R, X9A-X20R-X24R-X43R, X9A-X22R-X78R-X212F, X4R-X9A-X22R-X78R-X212F, X20R-X24R-X43R, X1R-X9A-X43R, X20R-X24R-X43R-X115R, X9A-X24R-X43R, X20R-X22R-X24R-X43R, X1R-

X24R-X43R, X9A-X20R-X24R-X43R-X242R, X9A-X20R-X22R-X78R-X212F, X9A-X24R-X43R-X244R, X9A-X24R-X43R-X242R, X4R-X9A-X22R-X24R-X212F, e X22R-X24R-X43R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000248] A presente invenção fornece, adicionalmente, polipeptídeos que compreendem variantes de subtilisina de uma subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R, X101G-X103A-X104I-X159R-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248R, X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X248R, X101G-X103A-X104I-X159R-X232V-X245R-X248R, e X101G, X103A, X104I, X232V, X236H, X245R, e X252K, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000249] A presente invenção fornece, adicionalmente, polipeptídeos que compreendem variantes de subtilisina de uma subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X16S, X22A, X24R, X62E, X76D, X89P, X101A/G, X103G/A, X104L/I, X111V, X128N, X129E, X232V, X148I, X158E, X159D/E, X166D, X186H, X188D, X209E, X236H, X238R, X245R, X248D/R, X249R, X252K/R, X253R, e X271F, sendo que as

posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000250] A presente invenção fornece, adicionalmente, polipeptídeos que compreendem variantes de subtilisina de uma subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: N062E-A158E, S103G-A158E, S128N-A158E, A016S-A158E, V104L-A158E, E089P-A158E, L111V-A158E, T022A-A158E, S101A-A158E, L148I-A158E, P129E-A158E, T022A-E089P, A016S-E089P, N062E-E089P, N062E-E271F, A158E-E271F, R186H-E271F, P129E-E271F, L111V-E271F, Y209E-E271F, A016S-E271F, S188D-E271F, T022A-E271F, G159E-E271F, V104L-E271F, S101A-E271F, E089P-E271F, S128N-E271F, S103G-E271F, L148I-E271F, H249R-E271F, N062E-G159E, A016S-G159E, S128N-G159E, L148I-G159E, L111V-G159E, E089P-G159E, T022A-G159E, P129E-G159E, S103G-G159E, V104L-G159E, A158E-G159E, S101A-G159E, A158E-H249R, L111V-H249R, P129E-H249R, N062E-H249R, A016S-H249R, R186H-H249R, L148I-H249R, G159E-H249R, S101A-H249R, S188D-H249R, V104L-H249R, Y209E-H249R, T022A-H249R, S128N-H249R, S103G-H249R, E089P-H249R, T022A-L111V, S101A-L111V, A016S-L111V, V104L-L111V, N062E-L111V, S103G-L111V, E089P-L111V, A016S-L148I, N062E-L148I, T022A-L148I, P129E-L148I, V104L-L148I, S103G-L148I, S128N-L148I, S101A-L148I, E089P-L148I, L111V-L148I, A016S-N062E, T022A-N062E, N062E-P129E, T022A-P129E, S128N-P129E, A016S-P129E, S101A-P129E, V104L-P129E, E089P-P129E, S103G-P129E, L111V-P129E, N062E-R186H, S128N-R186H, S101A-R186H, T022A-R186H, A016S-R186H, A158E-R186H, E089P-R186H, P129E-R186H, G159E-R186H, S103G-R186H, V104L-R186H,

L111V-R186H, L148I-R186H, N062E-S101A, T022A-S101A, A016S-S101A, E089P-S101A, N062E-S103G, T022A-S103G, A016S-S103G, S101A-S103G, E089P-S103G, N062E-S128N, A016S-S128N, T022A-S128N, S101A-S128N, V104L-S128N, E089P-S128N, S103G-S128N, L111V-S128N, L111V-S188D, N062E-S188D, A016S-S188D, L148I-S188D, T022A-S188D, S128N-S188D, S101A-S188D, V104L-S188D, E089P-S188D, P129E-S188D, G159E-S188D, R186H-S188D, S103G-S188D, A158E-S188D, A016S-T022A, A016S-V104L, T022A-V104L, S101A-V104L, N062E-V104L, S103G-V104L, E089P-V104L, G159E-Y209E, L111V-Y209E, S101A-Y209E, A016S-Y209E, S128N-Y209E, L148I-Y209E, P129E-Y209E, N062E-Y209E, T022A-Y209E, S103G-Y209E, A158E-Y209E, S188D-Y209E, V104L-Y209E, E089P-Y209E, e R186H-Y209E, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000251] A presente invenção fornece, adicionalmente, polipeptídeos que compreendem variantes de subtilisina que têm atividade proteolítica, compreendendo uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: N018R-W241R, G020R-W241R, S024R-W241R, S009A-W241R, G020R-W241R, V004R-W241R, N043R-W241R, S078R-W241R, T022R-W241R, G115R-W241R, A001R-W241R, S212F-W241R, L082R-W241R, N018R-V244R, S024R-V244R, S078R-V244R, G020R-V244R, S212F-V244R, S009A-V244R, L082R-V244R, A001R-V244R, N043R-V244R, T022R-V244R, V004R-V244R, G115R-V244R, W241R-V244R, S242R-V244R, A001R-V004R, S009A-T022R, N018R-T022R, G020R-T022R, V004R-T022R, A001R-T022R, S024R-S242R, N018R-S242R, V004R-S242R, G020R-S242R, S212F-S242R, L082R-S242R, S078R-S242R, A001R-S242R, S009A-S242R, T022R-S242R,

G115R-S242R, N043R-S242R, W241R-S242R, N018R-S212F, T022R-S212F, V004R-S212F, S024R-S212F, A001R-S212F, G115R-S212F, G020R-S212F, S009A-S212F, N043R-S212F, S078R-S212F, L082R-S212F, S009A-S078R, G020R-S078R, S024R-S078R, T022R-S078R, N018R-S078R, V004R-S078R, A001R-S078R, N043R-S078R, T022R-S024R, G020R-S024R, N018R-S024R, A001R-S024R, V004R-S024R, S009A-S024R, V004R-S009A, A001R-S009A, S242R-N269R, S024R-N269R, G020R-N269R, T022R-N269R, H249R-N269R, S212F-N269R, N043R-N269R, V244R-N269R, A001R-N269R, N018R-N269R, S078R-N269R, S009A-N269R, G115R-N269R, W241R-N269R, V004R-N269R, L082R-N269R, N018R-N043R, G020R-N043R, V004R-N043R, T022R-N043R, S009A-N043R, A001R-N043R, S024R-N043R, S009A-N018R, V004R-N018R, A001R-N018R, S024R-L082R, S009A-L082R, N018R-L082R, A001R-L082R, S078R-L082R, G020R-L082R, T022R-L082R, V004R-L082R, N043R-L082R, N043R-H249R, G020R-H249R, V004R-H249R, N018R-H249R, S009A-H249R, S212F-H249R, T022R-H249R, S024R-H249R, G115R-H249R, A001R-H249R, L082R-H249R, S242R-H249R, W241R-H249R, V244R-H249R, S078R-H249R, N018R-G115R, G020R-G115R, T022R-G115R, S078R-G115R, S009A-G115R, V004R-G115R, A001R-G115R, L082R-G115R, N043R-G115R, S024R-G115R, S009A-G020R, N018R-G020R, V004R-G020R, A001R-G020R, S009A-E271L, G020R-E271L, S024R-E271L, V244R-E271L, W241R-E271L, N043R-E271L, T022R-E271L, H249R-E271L, S212F-E271L, G115R-E271L, S242R-E271L, S078R-E271L, V004R-E271L, N269R-E271L, A001R-E271L, N018R-E271L, e L082R-E271L, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000252] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de

subtilisina isoladas, sendo que a dita variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020R-N043R, N062E-A158E, S103G-A158E, S128N-A158E, A016S-A158E, V104L-A158E, E089P-A158E, L111V-A158E, T022A-A158E, S101A-A158E, L148I-A158E, P129E-A158E, T022A-E089P, A016S-E089P, N062E-E089P, N062E-E271F, A158E-E271F, R186H-E271F, P129E-E271F, L111V-E271F, Y209E-E271F, A016S-E271F, S188D-E271F, T022A-E271F, G159E-E271F, V104L-E271F, S101A-E271F, E089P-E271F, S128N-E271F, S103G-E271F, L148I-E271F, H249R-E271F, N062E-G159E, A016S-G159E, S128N-G159E, L148I-G159E, L111V-G159E, E089P-G159E, T022A-G159E, P129E-G159E, S103G-G159E, V104L-G159E, A158E-G159E, S101A-G159E, A158E-H249R, L111V-H249R, P129E-H249R, N062E-H249R, A016S-H249R, R186H-H249R, L148I-H249R, G159E-H249R, S101A-H249R, S188D-H249R, V104L-H249R, Y209E-H249R, T022A-H249R, S128N-H249R, S103G-H249R, E089P-H249R, T022A-L111V, S101A-L111V, A016S-L111V, V104L-L111V, N062E-L111V, S103G-L111V, E089P-L111V, A016S-L148I, N062E-L148I, T022A-L148I, P129E-L148I, V104L-L148I, S103G-L148I, S128N-L148I, S101A-L148I, E089P-L148I, L111V-L148I, A016S-N062E, T022A-N062E, N062E-P129E, T022A-P129E, S128N-P129E, A016S-P129E, S101A-P129E, V104L-P129E, E089P-P129E, S103G-P129E, L111V-P129E, N062E-R186H, S128N-R186H, S101A-R186H, T022A-R186H, A016S-R186H, A158E-R186H, E089P-R186H, P129E-R186H, G159E-R186H, S103G-R186H, V104L-R186H, L111V-R186H, L148I-R186H, N062E-S101A, T022A-S101A, A016S-S101A, E089P-S101A, N062E-S103G, T022A-S103G, A016S-S103G, S101A-S103G, E089P-S103G, N062E-S128N, A016S-S128N, T022A-S128N, S101A-S128N, V104L-S128N, E089P-S128N, S103G-S128N, L111V-S128N, L111V-

S188D, N062E-S188D, A016S-S188D, L148I-S188D, T022A-S188D, S128N-S188D, S101A-S188D, V104L-S188D, E089P-S188D, P129E-S188D, G159E-S188D, R186H-S188D, S103G-S188D, A158E-S188D, A016S-T022A, A016S-V104L, T022A-V104L, S101A-V104L, N062E-V104L, S103G-V104L, E089P-V104L, G159E-Y209E, L111V-Y209E, S101A-Y209E, A016S-Y209E, S128N-Y209E, L148I-Y209E, P129E-Y209E, N062E-Y209E, T022A-Y209E, S103G-Y209E, A158E-Y209E, S188D-Y209E, V104L-Y209E, E089P-Y209E, R186H-Y209E, N018R-W241R, G020R-W241R, S024R-W241R, S009A-W241R, G020R-W241R, V004R-W241R, N043R-W241R, S078R-W241R, T022R-W241R, G115R-W241R, A001R-W241R, S212F-W241R, L082R-W241R, N018R-V244R, S024R-V244R, S078R-V244R, G020R-V244R, S212F-V244R, S009A-V244R, L082R-V244R, A001R-V244R, N043R-V244R, T022R-V244R, V004R-V244R, G115R-V244R, W241R-V244R, S242R-V244R, A001R-V004R, S009A-T022R, N018R-T022R, G020R-T022R, V004R-T022R, A001R-T022R, S024R-S242R, N018R-S242R, V004R-S242R, G020R-S242R, S212F-S242R, L082R-S242R, S078R-S242R, A001R-S242R, S009A-S242R, T022R-S242R, G115R-S242R, N043R-S242R, W241R-S242R, N018R-S212F, T022R-S212F, V004R-S212F, S024R-S212F, A001R-S212F, G115R-S212F, G020R-S212F, S009A-S212F, N043R-S212F, S078R-S212F, L082R-S212F, S009A-S078R, G020R-S078R, S024R-S078R, T022R-S078R, N018R-S078R, V004R-S078R, A001R-S078R, N043R-S078R, T022R-S024R, G020R-S024R, N018R-S024R, A001R-S024R, V004R-S024R, S009A-S024R, V004R-S009A, A001R-S009A, S242R-N269R, S024R-N269R, G020R-N269R, T022R-N269R, H249R-N269R, S212F-N269R, N043R-N269R, V244R-N269R, A001R-N269R, N018R-N269R, S078R-N269R, S009A-N269R, G115R-N269R, W241R-N269R, V004R-N269R, L082R-N269R, N018R-N043R, G020R-N043R, V004R-N043R, T022R-N043R, S009A-N043R, A001R-N043R,

S024R-N043R, S009A-N018R, V004R-N018R, A001R-N018R, S024R-L082R, S009A-L082R, N018R-L082R, A001R-L082R, S078R-L082R, G020R-L082R, T022R-L082R, V004R-L082R, N043R-L082R, N043R-H249R, G020R-H249R, V004R-H249R, N018R-H249R, S009A-H249R, S212F-H249R, T022R-H249R, S024R-H249R, G115R-H249R, A001R-H249R, L082R-H249R, S242R-H249R, W241R-H249R, V244R-H249R, S078R-H249R, N018R-G115R, G020R-G115R, T022R-G115R, S078R-G115R, S009A-G115R, V004R-G115R, A001R-G115R, L082R-G115R, N043R-G115R, S024R-G115R, S009A-G020R, N018R-G020R, V004R-G020R, A001R-G020R, S009A-E271L, G020R-E271L, S024R-E271L, V244R-E271L, W241R-E271L, N043R-E271L, T022R-E271L, H249R-E271L, S212F-E271L, G115R-E271L, S242R-E271L, S078R-E271L, V004R-E271L, N269R-E271L, A001R-E271L, N018R-E271L, e L082R-E271L, e sendo que a carga líquida total da variante é 0, +1, +2, +3, +4, +5, -1, -2, -3, -4, ou -5 em relação à carga líquida total da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, e sendo que a carga líquida total é obtida por uma ou mais substituições selecionadas a partir de: N43D, R45T, N62E, N76D, S101D, P129E, A158E, G159D, G159E, S166D, S188D, A230E, N18R, G20K, G20R, T22R, S24R, N43R, G118R, Q245R, H249R, N269R, E271F, e E271L, e sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1.

[000253] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020R-N043R, G020K-N062E,

S024F-N116L, G020K-S024F, S024R-A174T, S024R-G118R, S024R-K235F, S024R-P086R, S024R-P086W, S078R-G118R, T033S-G118R, T033S-K235F, Y209A-W241R, G020R-N076D, N018R-Q245R, S024R-R045T, A232V-Q245R, G118R-A172V, G118R-A194T, I008T-S024R, K235F-N243F, N018R-S103A, N018R-V104I, P086W-G118R, P086W-N243F, P086W-Y209A, S024C-T033S, S024R-A232V, S024R-N243F, S024R-P239Q, S024R-S101G, S024R-S141G, S024R-T033S, S024R-T274I, S024R-Y209A, S078R-P086W, S101G-A232V, T033S-L148F, T033S-P086W, T033S-P201S, T033S-S078R, T033S-W241R, T033S-Y209A, A230E-H249R, A232V-H249R, G118R-K235F, N076D-Q245R, P086W-K235F, S024R-R247H, S024R-V104A, S078R-K235F, S101G-H249R, S103A-A232V, T033S-A048T, T033S-P239T, T033S-T253A, T143A-Y209A, Y209A-K235F, N018R-R045T, Y209A-N243F, S024R-A272P, S024R-R269C, S101G-V104I, V104I-A232V, N076D-H249R, e S024R-N076D sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000254] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020R-N076D, S024R-R045T, A230E-H249R, N018R-R045T, N018R-Q245R, S101G-A232V, S024R-A232V, A232V-Q245R, S024R-S101G, N018R-V104I, N018R-S103A, S101G-H249R, A232V-H249R, S103A-A232V, N076D-Q245R, S101G-V104I, V104I-A232V, N076D-H249R, S024R-N076D, S024F-N116L, G020K-S024F, G020K-N062E, T033S-G118R, S024R-P086W, S024R-G118R, S024R-P086R, Y209A-W241R, S024R-W241R, S024R-K235F, G118R-Y209A, S078R-G118R, T033S-K235F, S024R-A174T,

P086W-Y209A, I008T-S024R, P086W-G118R, T033S-W241R, S024R-N243F, S024R-Y209A, T033S-P086W, S024R-T033S, P086W-N243F, T033S-P201S, S024R-P239Q, S078R-P086W, K235F-N243F, G118R-A172V, T033S-L148F, T033S-S078R, T033S-N243F, S024C-T033S, G118R-A194T, T033S-Y209A, S024R-S141G, S024R-T274I, P086W-K235F, A015T-T033S, Y209A-K235F, S024R-R247H, S078R-K235F, S024R-V104A, T033S-A048T, G118R-K235F, T033S-T253A, T143A-Y209A, T033S-P239T, Y209A-N243F, S024R-A272P, e S024R-R269C, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000255] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: V004R-S009A-G020R-S242R, G020R-N043R-W241R, G020R-S242R-N269R, V004R-S009A-G020R-N043R, V004R-G020R-H249R, N018R-S024R-V244R, S009A-T022R-S212F-W241R, G020R-N043R-N269R, N018R-S024R-S242R, V004R-S009A-N043R-W241R, G020R-N043R-V244R, G020R-T022R-S242R, V004R-G020R-N043R, V004R-S009A-G020R-N043R-S242R, G020R-N043R-S242R, G020R-N043R-S242R-H249R, G020R-S212F-H249R, V004R-S009A-W241R, A001R-S009A-N043R, G020R-N043R-H249R, S009A-G020R-N043R-W241R, G020R-T022R-N043R, G020R-H249R-N269R, G020R-T022R-W241R, V004R-S009A-S024R-N043R-W241R, S009A-N043R-S078R, V004R-G020R-S024R-V244R, G020R-T022R-S078R-S242R, G020R-S024R-S242R-H249R, V004R-S009A-S078R-W241R, S009A-N043R-S078R-S242R, V004R-G020R-S024R, S009A-N043R-S212F, G020R-N043R-S212F, S024R-S078R-S212F, S009A-

G020R-S024R-N043R, S009A-T022R-N043R-S078R, G020R-T022R-S212F-W241R, G020R-N043R-S212F-W241R, S009A-N043R-W241R, G020R-N043R-E271L, G020R-T022R-S078R-W241R, G020R-S024R-N043R-S242R, G020R-T022R-N043R-W241R, S009A-G020R-N043R-S212F, V004R-S009A-G020R-S024R-S242R, G020R-N043R-H249R-E271L, G020R-T022R-S024R-S242R, S009A-T022R-S078R-S212F, G020R-N043R-S242R-E271L, S009A-T022R-S078R-S212F-W241R, V004R-G020R-S024R-H249R, G020R-T022R-E271L, G020R-T022R-N043R-S212F, V004R-G020R-S024R-N043R-S242R, V004R-G020R-S024R-N043R, V004R-S009A-T022R-S078R-S212F, G020R-T022R-S078R-S212F-W241R, e G020R-T022R-N269R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000256] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: N018R-G020R-N043D-R045T-A230E, N018R-N043R-R045T-S242R-H249R, S024R-N043D-H249R, N018R-G020R-R045T, G020R-S024R-N076D-H249R, S024R-N043R-A230E-S242R, N018R-S024R-N043D-A230E, G020R-N076D, N018R-S024R-N043D-N076D-H249R, S024R-N043R-N076D-H249R, N018R-S024R-R045T-S242R, G020R-N043D-N076D-A230E-H249R, G020R-N043R-R045T-S242R, N018R-S024R-N076D-H249R, N018R-G020R-S024R-N043D-R045T-L233I-S242R, S024R-N043R-A230E, N018R-G020R-N043D, N043R-S242R-H249R, G020R-N043R-R045T-A230E, N043R-N076D-S242R-H249R, G020R-S024R-R045T-A230E-S242R, S024R-R045T-N076D-A230E-S242R-H249R, S024R-R045T, S024R-N043R-R045T-N076D-A230E-H249R, N018R-S024R-N043D-R045T-

H249R, N018R-N043R-R045T-H249R, S024R-N043R-S242R, N018R-G020R-N043R-N076D-H249R, G020R-S024R-N043D-H249R, G020R-N043R-A230E-S242R, G020R-N043R-S242R, N018R-N043R-N076D-A230E, G020R-S024R-N043D-S242R, G020R-N043R-A230E, N018R-G020R-N043R-N076D-S242R-H249R, N043D-R045T-N076D-H249R, N018R-N043R-S242R-H249R, N018R-G020R-N043R-R045T-S242R, N018R-G020R-N043D-A230E-S242R, G020R-S024R-N043R-R045T-H249R, S024R-N043R-H249R, G020R-S024R-K27E-N043R-N076D-A230E, S024R-N043R-R045T-S242R, N018R-G020R-S024R-N043R-R045T-N076D-A230E, G020R-N043R-N076D-A230E-H249R, N018R-N043R-R045T-S242R, G020R-S242R-H249R, N018R-N043R-N076D-A230E-S242R-H249R, N018R-S024R-N076D, G020R-S024R-K27R-N043D-S242R-H249R, N018R-G020R-S024R-N043D-N076D-S242R, N018R-N043R-N076D-S242R-H249R, N018R-S024R-N043D-A230E-H249R, N018R-G020R-N043D-H249R, N018R-G020R-N043D-R045T-N076D-S242R, S024R-N043R-N076D-A230E-S242R, G020R-S024R-T38I-N043R-R045T-N076D-S242R-H249R, N018R-G020R-N043R, N018R-S024R-R045T-A230E-S242R, N018R-G020R-H249R, S024R-N043R-N076D, N018R-G020R-S024R-N043R-R045T-N076D-H249R, N018R-N043D-R045T-N076D-S242R-H249R, S024R-N043D-S242R-H249R, N018R-G020R-S024R-N043D-R045T-S242R, G020R-S024R-N043R-N076D, N018R-G020R-N043D-R045T-A230E-S242R, G020R-S024R-N043R-R045T-N076D-S242R-H249R, N018R-N043R-R045T-N076D-S242R, N018R-G020R-N043R-N076D-A230E-S242R, N018R-S024R-N043D-H249R, N018R-S024R-N043R-R045T-A230E-H249R, N018R-G020R-N043R-R045T-N076D-H249R, N018R-S024R-S242R, N018R-N043R-R045T-N076D-A230E-S242R, R045T-S242R-H249R, N018R-S024R-N043D-S242R, N018R-G020R-N043D-R045T-S240P, S024R-N043R-R045T-S242R-H249R, N018R-S024R-V30S-L31S-D32I-T33Q-G34V-I35F, N018R-G020R-N043R-N076D, G020R-

N043D-R045T-N076D-S242R-H249R, N018R-S024R-N043D-A230E-S242R, N018R-S024R-N043D-S242R-H249R, S024R-N043D-R045T-S242R-H249R, N043R-A230E-H249R, S024R-N043R-N076D-A230E-H249R, G020R-S024R-N043D-N076D-H249R, S024R-R045T-S242R-A273V, G020R-S024R-R045T-N076D-S242R-H249R, N018R-S024R-N043D-N076D-S242R, N018R-N043R-N076D-A230E-H249R, N018R-G020R-N043R-R045T-H249R, N018R-N043R-R045T-A230E-S242R, G020R-S024R-N043D-R045T-A230E-S242R, N018R-N043D-A230E-H249R, N018R-N043R-N076D-S242R, N018R-G020R-N076D, N018R-G020R-N043D-N076D-S242R-H249R, G020R-S024R-N043D-N076D-S242R-H249R, N043D-S242R-H249R, N018R-G020R-S024R-N043R-N076D, N018R-G020R-N043D-R045T-N076D-H249R, N018R-G020R-N043R-R045T-N076D-A230E-H249R, N018R-N076D-S242R, G020R-N043R-H249R, N018R-N076D-S242R-H249R, N018R-S024R-R045T-A230E-H249R, A230E-H249R, N018R-R045T-H249R, G020R-N043R-N076D, N043R-R045T-H249R, N018R-N043D-N076D-S242R-H249R, N043R-N076D-H249R, N018R-R045T, G020R-N076D-A230E-S242R, G020R-S024R-N043D-R045T, S024R-N043D-N076D-S242R-H249R, G020R-R045T-H249R, N043R-N076D-S153A-H249R, N043R-N076D-A230E-H249R, N018R-N043D-N076D-H249R, e G020R-N043R-N076D-V227I, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000257] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S101G-S103A-V104I-A232V-Q236H-Q245R-N252K, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248R,

S101G-S103A-V104I-G159R-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R, e S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248D, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000258] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D, A016S-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-

S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-

S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D,
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-S188D-A232V-
Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-
G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-
P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-
S103A-V104I-S128N-A158E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-
S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D,
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-N238R-Q245R-
N248D, S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-Q245R-N248D-
H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-
N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-A158E-
S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-
G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-
G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-
V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-
S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-
N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-G159E-S188D-A232V-
Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-
Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-
S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-A158E-
A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-
G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-
V104I-P129E-L148I-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-
S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-
S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-
S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D,
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-
N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-
N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-
A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-S188D-

A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-G159E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-S188D-A232V-Q245R-N248D,

S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-L148I-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-L148I-G159E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, e S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000259] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-

S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, A016S-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, e S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000260] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: V104L-S128N-A158E-R186H-H249R, S128N-A158E-S188D-H249R, N062E-S128N-A158E-G159E-E271F, N062E-A158E-S188D-H249R-E271F, N062E-A158E-R186H-H249R-E271F, S128N-A158E-S188D-Y209E-E271F, N062E-G159E-S188D-H249R, A016S-N062E-A158E-R186H-H249R, N062E-A158E-G159E-H249R, S101A-S128N-A158E-Y209E-H249R, S128N-A158E-R186H-E271F, N062E-A158E-S188D-H249R, N062E-A158E-R186H-

E271F, N062E-A158E-R186H-H249R, N062E-S101A-R186H-H249R, N062E-S101A-A158E-R186H-E271F, N062E-V104L-A158E-S188D-H249R-E271F, N062E-G159E-R186H-H249R, N062E-G159E-H249R, S128N-A158E-R186H-H249R, S128N-A158E-S188D-E271F, N062E-A158E-H249R, N062E-R186H-S188D-H249R-E271F, S128N-A158E-Y209E-, N062E-S101A-A158E-H249R, V104L-S128N-A158E-R186H-E271F, N062E-S101A-A158E-R186H-H249R-E271F, A016S-N062E-A158E-H249R, N062E-S101A-G159E-H249R, S128N-A158E-R186H-S188D-E271F, S101A-S128N-A158E-R186H-E271F, N062E-S101A-S188D-H249R, S101A-V104L-A158E-R186H-S188D-H249R, N062E-G159E-H249R-E271F, S128N-A158E-G159E-E271F, A016S-N062E-V104L-A158E-R186H-E271F, T022A-S128N-A158E-H249R, S128N-A158E-H249R, N062E-S101A-V104L-A158E-R186H-E271F, A016S-N062E-A158E-R186H-E271F, V104L-S128N-A158E-H249R, V104L-S128N-A158E-S188D-H249R, T022A-N062E-A158E, N062E-S101A-S188D-H249R-E271F, N062E-A158E-H249R-E271F, V104L-S128N-A158E-R186H-S188D-E271F, N062E-S101A-R186H-E271F, N062E-V104L-G159E-H249R, N062E-R186H-H249R, N062E-S101A-R186H-H249R-E271F, S101A-A158E-R186H-S188D-H249R, N062E-S101A-R186H, S101A-S128N-P129E-R186H-H249R, S101A-S103G-A158E-R186H-H249R, A016S-N062E-V104L-R186H-S188D-E271F, V104L-A158E-R186H-H249R, S101A-S128N-A158E-S188D-Y209E-E271F, N062E-S101A-R186H-S188D-E271F, A016S-N062E-A158E-H249R-E271F, N062E-S128N-A158E, N062E-S128N-G159E-H249R, N062E-S101A-A158E-S188D-H249R, S101A-S128N-A158E-H249R, N062E-A158E-R186H-S188D-H249R, A016S-V104L-A158E-R186H-E271F, N062E-L148I-G159E, N062E-S101A-A158E-R186H-H249R, N062E-S101A-R186H-S188D-H249R, V104L-A158E-R186H-S188D-H249R, N062E-S101A-V104L-R186H-S188D-E271F, T022A-S101A-A158E-R186H-H249R, S101A-S128N-A158E-Y209E, A158E-R186H-S188D-

H249R-E271F, V104L-A158E-R186H-S188D-H249R-E271F, S101A-V104L-A158E-R186H-H249R, V104L-A158E-H249R, S101A-V104L-S128N-A158E-R186H-E271F, A016S-V104L-S188D-H249R, S101A-V104L-A158E-R186H-S188D-E271F, V104L-S128N-G159E-E271F, V104L-A158E-R186H-H249R-E271F, A158E-R186H-H249R, S101A-A158E-R186H-H249R, V104L-A158E-S188D-H249R-E271F, A016S-S128N-A158E-R186H, V104L-S128N-R186H-S188D-H249R, A016S-S101A-S128N-R186H, A016S-N062E-S128N-R186H-E271F, A016S-S128N-R186H-E271F, S128N-P129E-R186H, A158E-R186H-H249R-E271F, A016S-A158E-H249R, A016S-A158E-R186H-H249R, A016S-T022A-A158E-R186H-E271F, E089P-S101A-P129E-R186H, T022A-S128N-A158E-R186H, S101A-V104L-S128N-A158E-R186H, T022A-S128N-R186H-S188D-, N062E-V104L-A158E-R186H-S188D-H249R, T022A-A158E-R186H-H249R-E271F, T022A-V104L-A158E-H249R, S101A-L111V-P129E, A016S-A158E-H249R-E271F, A016S-L111V-S188D-, T022A-V104L-R186H-S188D-H249R, e V104L-L148I-S188D-H249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000261] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: A001R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, V004R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-E271L, S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, V004R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-A232V-

Q245R-E271L, G020R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-G025R-N116A-Y167W, N018R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, T022R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S078R-S103N-S106G-Y167W-Q236N, N018R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-S101A-H120F-A194F-H249R, G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S101G-S103A-V104I-S212F-A232V-Q245R, G020R-S144R-N185I-L233C-Q236N, G023A-S078R-S216F-Q236N-H249R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S101G-S103A-V104I-G115R-A232V-Q245R, P052N-S078R-S103N-L148I-T213A, N018R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G025R-E089I-N116A-P239S-A270C, S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, L148I-T213A-N252R, S024R-G025R-N183D-Y192W-P239S, G046R-A194F-S212M, V104L-L217E-T224A-H249R-N252R, G023A-Y091F-V121F-Y192W-Q236N, S101G-S103A-V104I-A232V-V244R-Q245R, S099F-S144R-Y167W-N252R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, T022W-S078R-Y167W-S212M-A270C, V121F-N252R-A270C, G020R-S103N-S216F-Q236N-N252R, N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, G023A-P052N-Y192W-I198L-N252R, G025R-G046R-V121F, S024R-S078R-V104L-N116A-N183D, G046R-Q059A-S103N-G211Q-S212M, G020R-P052N-N062Q-Y091F-Y192W, G023A-P052N-S144R-Y192W-S216F, S101G-S103A-V104I-A232V-S242R-Q245R, P052N-S103N-N116A-L148I-Y192W, E089I-N116A-N117F-T224A-H249R, S144R-G211Q-N238L-P239S-H249R, N043A-N062Q-A194F-G211Q, G020R-S024R-P052N-Q059A-S216F, S024R-Y167W-T224A-H249R, T057R-Y167W-H249R, G025R-S103N-R186K-A194F-T224A, S105T-S128N-S144R-L148I-

S212M, G020R-Q059A-S144R-Y192W-T224A, S024R-N043A-N117F-A194F-G211Q, N117F-A194F-T213A-A270C, S078R-Y091F-V121F-L233C-N252R, T057R-S099F-S105T-I198L-T213A, G023A-Y091F-S101A-I198L-N252R, N062Q-S103N-V121F-S144R-H249R, N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-S242R-Q245R, G023A-S024R-N117F-S212M-S216F, V104L-T213A-S216F, A194F-G211Q-Q236N, N062Q-S103N-N117F-A194F, S024R-N062Q-V104L-S106G-H249R, T057R-E089I-I198L, G046R-Q059A-S106G-L217E-H249R, N117F-T213A-A215F, S101A-H120F-Y192W-A215F-T224A, N043A-T057R-N117F-S144R-N183D, G046R-N183D-N238L, G025R-N043A-E089I-N117F, S078R-V104L-T213A-A215F-T224A, Y091F-S099F-S101A-S105T-Y167W, S106G-N117F-N238L, G046R-E089I-Y091F-S101A-N116A, G020R-N062Q-E089I-R186K-S212M, T057R-S099F-V121F-N185I-Y192W, G046R-E089I-Y192W-L233C-A270C, E089I-N117F-N185I-A215F-L233C, P052N-V104L-N183D-S216F-H249R, S078R-S099F-N116A-R186K-T224A, G025R-S105T-S128N-S144R-A270C, S105T-G211Q-S216F, S024R-G046R-Y091F-V121F, S106G-N185I-S216F-Q236N, N062Q-S101A-Q236N-N252R-A270C, G025R-N043A-Y091F-I198L-A270C, G020R-G023A-V104L-Y192W-L233C, S024R-N043A-S105T-S106G-I198L, G020R-E089I-L217E, S024R-Y091F-I198L-A215F-P239S, G046R-E089I-S099F-R186K-S212M, V104L-H120F-R186K-S216F-N252R, T022W-A194F-T213A-L233C-N238L, S099F-S105T-S106G-A194F-S212M, E089I-S105T-N116A-A215F-S216F, G025R-N116A-H120F-T224A-A270C, N043A-Q059A-S101A-S216F-T224A, T057R-N183D-Q236N, G025R-N062Q-S128N-S144R-N185I, S103N-H120F-Y167W-I198L-L233C, T022W-E089I-S216F, S024R-S106G-N116A-S212M-T224A, G020R-P052N-S101A-I198L-L233C, E089I-Y091F-N185I-G211Q-A270C, L111I-A215F-P239S, S024R-N116A-R186K-L233C-Q236N, e G023A-S103N-S106G-S212M-A215F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são

numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000262] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116S-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-A232V-Q245R, G020R-T22W-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-A232V-Q245R, N018R-V104I-A232V-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-H249R, N018R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N018R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S103A-A232V-H249R, N018R-S101G-V104I-A232V-Q245R, G020R-S024R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R-H249R, N018R-T22K-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T22W-S101G-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R, S024R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T22W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V, N018R-S024R-N076D-N116A-A215F-H249R, N018R-N043R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-

Q245R, S024R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-T213A-A215F-A232V-Q245R, N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-G211Q-H249R, N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S101G-Q245R, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-S024R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S101G-S103A-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-N116A-A232V-Q245R, N018R-S101G-V104I-A232V-H249R, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-V104I-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-A215F-A232V-Q245R, S024R-S103A-V104I-H249R, N018R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-S101G-V104I-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, S024R-S103A-V104I-A232V-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-G211Q-A215F-H249R, N018R-Q245R, S024R-S103A-Q245R, S024R-S103A-V104I-Q245R, G020R-S078R-S101G-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-V104I-H249R, N018R-

S024R-V104I-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-G211Q-A215F-H249R, R019H-G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T22W-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S103A-V104I-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-S101G-V104I-A232V, S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R, N018R-S024R-S101G-V104I, G020R-S101A-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R, N018R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S101G-S103A-Q245R, N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-T22W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S101G-V104I-H249R, G020R-T22W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-I198L-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, S024R-N076D-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101G-

V104I-A232V-H249R, N018R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, A001T-N018R-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R, N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-A232V-Q245R, N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N076D-S101G-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-A215F-H249R, R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-S101G-I198L-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-T213A-A215F-H249R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-G211Q-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, S024R-A232V-Q245R, N018R-S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-T213A-A215F-H249R, N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-A215V-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-H249R, G020R-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-G211Q-A215F-A232V-Q245R, S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-A232V-Q245R, N018R-T22W-S024R-N076D-I198L-A215F-

H249R, G020R-T022W-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R, G020R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-T180A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, N018R-S101G-S103A-V104I, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S103A-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-G211Q-H249R, G020R-S101A-S103A-V104I-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-A232V-H249R, N018R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-N076D-Q245R, S024R-V104I-Q245R, S101G-A232V, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-A215F-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-I198L-A232V-Q245R, S024R-Q245R-H249R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-G211Q-A232V-Q245R, N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-G211Q-H249R, S024R-S101G-V104I-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-V104I, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N183D-I198L-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-G020R-T22W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-

H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-A232V-Q245R, Q012H-G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-I198L-G211Q-T213A-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-T213A-H249R, S024R-V104I-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-G211Q-H249R, N018R-N076D-S103A-V104I-H249R, N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R-E271G, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R, G020R-N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-N116A-A215F-H249R, N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, S024R-S103A-M175L-A232V-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R, G020R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, S024R-N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, N043R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-Q245R, G020R-S024R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-A232V, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R, S024R-N076D-S101G-A232V-Q245R, N018R-N076D-S101G-S103A-V104I-H249R, N018R-S024R-N076D-I198M-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-

I198L-A215F-H249R, N018R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T022W-S103A-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R, R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-A215F-H249R-V268G, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-H249R, S101G-S103A-V104I-Q245R, N018R-N076D-S101G-A232V-Q245R, N018R-G020R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-H249R, S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, G020R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-S103A-A232V, N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-H249R, N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-N043R-R045T-N076D-S076T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-A273T, N018R-G020R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N183D-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101G-A232V, A232V-Q245R, N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-V234I-Q245R, S024R-N076D-S103A-V104I-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-G211Q-T213A-A232V-Q245R, N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R-A272V, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-S103A-V104I-A232V, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, S024R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-T022W-S024R-N076D-T213A-A215F-H249R, N018R-

S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R, G020R-T22W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-M117I-N183D-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-A232V-Q245R, N018R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-Y209H-T213A-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R, S024R-N076D-S101G-M175L-A232V-Q245R, N018R-N043D-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-A215F-A232V-Q245R, N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-A215F-H249R, S024R-N076D-V104I-Q245R, K027R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-N043D-R045T-S078R-S101G-

S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-A215F-H249R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, N018R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S101G-V104I, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-N076D-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-H249R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-A114T-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-H249R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022K-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V, N018R-S024R-N076D-N116A-H249R, G020R-S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T22W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N183D-G211Q-A232V-Q245R-, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-T213A-H249R, N018R-

S024R-N076D-S101A-I198L-H249R, N018R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-H249R, N018R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-A131V-N183D-T213A-A232V-Q245R, N018R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-H249R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S024R-S101G-Q245R, S024R-N076D-S101G-Q245R, N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-A215F-H249R, S024R-S101G, N018R-T22W-S024R-N076D-T213A-A215F-H249R, G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N183D-I198L-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-N043D-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-I198L-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, N018R-G020R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R, N018R-V104I, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-L088I-S101A-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-H249R, N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-N076D-S101G-V104I-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-T213A-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R-N269R, S024R-N076D-Q245R, N018R-G020R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-A215F-

H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-A215F-H249R, N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T22W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-T213A-H249R, G020R-T022W-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-N218S-A232V-Q245R, N018R-S103A, G020R-T22W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-G211Q-T213A-H249R, S024R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, K027R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-V104I, S101G-S103A-V104I-A232V-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-G211Q-H249R, N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R-R275S, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-H249R,

V004M-N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R,
V104I-A232V-H249R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-
N183D-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104I-
N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R-T274I, G020R-S101A-S103A-
V104I-T213A-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-
N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-S024R-N043D-S078R-
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S103A-
H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-
A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-
H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-A215F-H249R,
N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-A215F-H249R-A270V,
N018R-N043D-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-
Q245R-N269R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N183D-A232V-
Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-
H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-G211Q-A215F-H249R,
N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-T213A-H249R, G020R-T022W-
S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, N018R-T22W-
S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-H249R, N043R-R045T-S078R-
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-
S101G-S103A-V104I-A232V, S101G-H249R, S024R-N076D-S101G-
S103A-V104I-M175L-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-
N116A-N183D-A232V-Q245R-N269S, N018R-S024R-N076D-S101A-
N116A-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-H249R,
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-A215F-H249R,
N018R-S024R-N076D-T213A-A215F-H249R-T260K, N018R-S024R-
N076D-N116A-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-
N076D-N116A-I198L-H249R, S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-
Q245R, S024R-N076D-S103A-H249R, N018R-S101G-S103A-V104I-
A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-G211Q-H249R,
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-H249R,

G020R-S024R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-A272D, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-H249R, S024R-N076D-S101G-S103A-A232V, S024R-S103A-V104I, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, S024R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, N018R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-H249R, G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-N076D-S103A-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, S103A-V104I-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-A215F-H249R, A016T-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-A215F-H249R, N043R-N076D-S101G-S103T-V104I-A232V-Q245R-H249R-N269R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-G115E-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-

I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-H249R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101G, N076D-S101G-A232V-Q245R, N018R-N076D-S101G-S103A-V104I-Q245R, N018R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-A215F-H249R, N018R-V104I-A232V, N043D-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-N076D-S101G-A232V-H249R, S103A-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-A215F-H249R, S024R-N076D-S103A-V104I-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A215F-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-A215F-H249R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-A131T-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-S101G-S103A-V104I-Q245R-H249R, N018R-N076D-A232V-H249R, N018K-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R-N269R, N018R-G020R-S024R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R-L267I, A232V-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, N076D-V104I-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-

I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-H249R, S024R-S101G-S103A-A232V, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-H249R, S103A-A232V-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R, N018R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-G020R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-I198L-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R-T274I, S024R-S103A-Q245R-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-H249R, N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-H249R, S103A-A232V, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R, N018R-S024R-

N076D-S101A-N116A-H249R, N018R-N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-A232V, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-H249R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R-N263S, S024R-N076D-S101G-V104I-A232V-H249R, N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-V197A-T213A-A215F-H249R, S024R-S101G-S103A, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-A215F-H249R, N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, S024R-V104I-A232V, N018R-S024R-N076D-N183D-G211Q-H249R, G020R-N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-

N116A-A150T-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-H249R, S024R-N076D-A232V-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116T-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R, R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-H249R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, N076D-S101G-S103A-Q245R, G020R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-H249R, N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N076D-S101G-V104I-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-H249R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-

N076D-S101A-N183D-I198L-Y209H-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N076D-Q245R, N076D-S101G-V104I-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-H249R, G020R-S024R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N204D-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A209V-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-

S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-I198L-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-G211Q-A215F-H249R-N269D, N018R-G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-H249R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N183D-A215F-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-Y209H-G211Q-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R, N076D-A232V-Q245R, N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-A215F-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-T213A-H249R, G020R-S024R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R, G020R-A090S-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N076D-S103A-V104I-A232V-Q245R, R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-

N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N076D-S103A-V104I-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-S101G-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, N076D-V104I-A232V-Q245R, K027R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S103A-V104I-L135I-A232V, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-H249R, P005S-N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-

I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N183D-I198L-A215F-A232V-Q245R, N076D-S101G-S103A-V104I-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-N243D-H249R, N018R-G020R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, S024R-N076D-S101G, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-A215F-H249R, N018R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-Q245R, G020R-S024R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R-N269S, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-A086V-S101A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-N076D-S101G-I198T-A232V, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-

S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-H249R-A248T, N018R-N076D-V104I-Q245R-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N043R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-N076D-S101G-V104I, G020R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-N076D-V104I, N018R-G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, S101G-V104I, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R-N263D, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-A215F-H249R-R269H, N018R-N043D-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-

N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-H249R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, V104I-A232V, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-H249R, N043D-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-N043R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, S024R-N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-Y166F-A176P-A179V-N184T-A187P-A194P, N018R-T022W-S024R-D041E-N076D-S101A-S160T-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-I198L-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-G211Q-A215F-H249R, S024R-N076D-V104I, N018R-N076D-S101G-A232V, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R, N018R-S024R-L031F-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R-N269S,

N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-A215F-H249R,
N018R-N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-
N269R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N114T-I198L-G211Q-
A215F-H249R, S024R-N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-
A232V-Q245R, S024R-N076D-S103A-V104I-A232V, N018R-G020R-
T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-A215F-H249R, S101G-
V104I-A232V, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-T213A-
A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-
H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-T213A-H249R, N018R-
S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-
T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-H249R, N018R-S078R-
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-T022W-S024R-
N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R-T260A, N076D-
H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-A215F-H249R,
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-G211Q-A215F-H249R, N018R-
G020R-S024R-N076D-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-
N076D-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-
N076D-S101A-N183D-H249R, N076D-V104I-H249R, G020R-T022W-
S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-
Q245R, S024R-N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-
A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-
A215F-H249R, N018R-N076D-S101G-S103A, G020R-S024R-S101G-
S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-G020R-S024R-N076D-
S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R, S101G-S103A-A232V, S024R-
N076D-S101G-A232V, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-
I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-
I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-
I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-
I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-A156V-
N183D-G211Q-A215F-H249R-N269S, R045T-N076D-S101G-S103A-

V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-H249R, N018R-N076D-S101G, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-N076D-A232V, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-A232V-Q245R, N018R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-N237D-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R-R275S, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, S024R-N076D, N018R-S024R-N076D-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N076D-V104I-A232V-H249R, N018R-N076D-S103A-A232V, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-D175E-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R-A273E, G020R-S024R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, P005S-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S103A-V104I-A232V, N018R-G020R-S024R-V068A-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R-R275S, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, e N043D-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN'

de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000263] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: N018R-S024R-N043R-N076D-H249R-N269R, N018R-T022R-S024R-N043R-N076D-H249R, N018R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, T022R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, T022R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N043R-N076D-H249R, N018R-S024R-N076D-S242R-H249R, N018R-S024R-N076D-H249R-N269R, N018R-T022R-S024R-N076D-H249R, N018R-S024R-N076D-S078R-H249R, N018R-S024R-N043D-N076D-H249R-N269R, N018R-T022R-S024R-N043D-N076D-H249R, N018R-S024R-N043D-N076D-S078R-H249R, G020R-S101G-S103G-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104L-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103S-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103S-V104L-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103S-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103S-V104L-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104L-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103S-V104V-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103A-V104V-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103G-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103G-V104V-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104V-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103S-V104I-

A232V-Q245R, G020R-S101A-S103S-V104V-A232V-Q245R, N018R-S024R-N043R-N076D-S078R-H249R, S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-S242R-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-L217E-H249R, N018R-S024R-N043R-N076D-L217E-H249R, N018R-S024R-N043D-N076D-S242R-H249R, N018R-G020R-S024R-N043R-N076D-H249R, G020R-S101A-S103G-V104V-A232V-Q245R, N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-L217E-H249R-N269R, e N018R-S024R-N076D-L217E-S242R-H249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000264] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020R-S101A-S103A-V104I-G118R-A232V-Q245R, G020R-S024R-N116A-T213A, N043R-S101A-N116A-A215F-N269R, S024R-N043R-S101A-N116A, S024R-N043R-S101A-N116A-A215F-N269R, G020R-S101G-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R, N043R-S101A-N269R, S024R-N043R-N116A-T213A-N269R, G020R-S024R-N043R-R045T-S101A-T213A, S024R-N043R-N116A-A215F-N269R, G020R-S024R-T213A-A215F, G020R-N116A-N269R, S024R-N116A-T213A-N269R, N043R-S101A-N116A-N269R, S101G-S103A-V104I-N116A-T213A-A232V-Q245R-N269R, S024R-N043R-R045T-S101A-N116A-A215F-N269R, G020R-N043R-S101A-N269R, S101A-S103A-V104I-T213A-A232V-Q245R-N269R, S024R-A215F-N269R, N043R-S101A-N116A-T213A-A215F-N269R, N043R-

S101A-T213A-N269R, G020R-S024R-N043R-R045T-N116A-T213A, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-N043R-R045T-S101A-N116A-T213A-N269R, S024R-N043R-R045T-N269R, G020R-N043R-R045T-S101A-N269R, S024R-N043R-N116A-N269R, G020R-S024R-N043R-R045T, N043R-N116A-N269R, S024R-N043R-S101A-A215F-N269R, S024R-N043R-R045T-T213A-A215F-N269R, G020R-S024R-R045T-N269R, G020R-N043R-S101A-N116A-T213A-A215F, G020R-S101G-S103A-V104I-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S024R-R045T-N116A-N269R, G020R-S101A-N116A-N269R, S024R-N043R-A215F, G020R-S024R-T213A, S024R-N043R-S101A-A215F, G020R-S024R-N043R-R045T-N116A, G020R-S024R-N043R-R045T-S101A-N269R, G020R-S024R-S101A-A215F, G020R-S024R-N116A-T213A-A215F, G020R-S024R-N116A, G020R-S024R-S101A-N116A, N043R-T213A-A215F-N269R, S024R-S101A-N269R, S024R-N043R-N116A-A215F, G020R-T038A-N043R-S101A, G020R-S024R-N116A-A215F, S024R-N043R-S101A-T213A, P014L-G020R-S024R-N043R-R045T-S101A-A215F, G020R-S024R-A215F, G020R-N116A-A215F-N269R, G020R-R045T-N116A-N269R, G020R-S024R-N043R-R045T-A215F, e G020R-S024R-N043R-R045T-N116A-T213A-A215F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000265] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S024R-N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-

Q245R-N248D-H249R-E271F-E271F, S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N076D-S101G-S103A-V104I-A114V-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S024R-N043R-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-N043R-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, N076D-S101G-S103A-V104I-S128L-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, e N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000266] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-L217E-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, N043R-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-N183D-S188D-A232V-

Q245R-N248D-H249R, T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N043R-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S101G-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S101G-S103A-V104I-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, N076D-S101G-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, e N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000267] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de

aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: H017R-T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, H017R-T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, T022A-S101G-G102A-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, e T022A-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000268] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S101S-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103G-V104V-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103S-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103A-V104L-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103G-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103G-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103S-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103S-V104V-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103S-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103S-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103A-V104I-G159E-A232V-

Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104L-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103A-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103S-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103S-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103A-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103G-V104V-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, e S101S-S103A-V104V-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000269] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: V026F-V051W-V104L-S106E, V026F-L031F-S078N-G102A-S160D, G020K-G100S-N116L-A158E-S166D-N243F, T033S-N043W-N218D-P239G-N243F, T022L-T038F-A048R-N062E-G100S-R186K, S101D-S103N-N116L-S144R-A215D, V104L-S105T-T213A-L217E-S256N, N043W-S101D-S212M-N243F, V026F-A048R-S105T-T213A-N218D-T224A, S024F-S101D-G118R-A215D-L250I-A272F, V121F-N185E-T224A-P239G, T022L-L031F-G102A-S128D-T224A-N243F, N062E-S078N-G102A-N116L-S144R-L250I, T022L-T038F-V121F-S160D-A272F, V026F-S078N-G159C-R186K-N243F, S024F-A048R-G118R-S166D-L217E, G023A-T038F-S078N-G100S-S212M-A215D, G100S-N116L-A158E-T213A, S078N-V104L-G118R-S128D, G102A-S103N-S105T-A194E, T022L-S078N-S128D-T213A, K027R-G100S-G118R-S160D-S188D-N243F, S024F-G102A-R186K-T213A-L217E-N243F, T033S-S105T-S188D-S216F, G023A-G100S-A194E-S212M, A048R-S128D-N185E-P239G, G020K-S024F-T033S-P129E-A194E, G020K-K027R-P129E-S166D-P239G,

T022L-G023A-K027R-S101D-V104L-S216F, T033S-G118R-P129E-A194E-P239G, T022L-S078N-N116L-P129E-S256N, K027R-S101D-S103N-S105T-A272F, A048R-S078N-N116L-N185E-L217E-P239G, G023A-S024F-K027R-N062E, S024F-S103N-V104L-G118R-S188D, V026F-V104L-S256N-A272F, S024F-N043W-V104L-V121F-P129E, N062E-S078N-N116L-T224A, G023A-S024F-V051W-A158E, K027R-T038F-G102A-N116L, N062E-S078N-S144R-S212M, L031F-N116L-S256N-A272F, T022L-T033S-V104L-N116L-S160D-R186K, S024F-G118R-P129E-R186K-T213A, N043W-S105T-T213A-A215D-S216F, L031F-S105T-R186K-S188D, V026F-A194E-T213A-S256N, e S103N-S160D-L250I-S256N, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000270] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S024R-S103A-V104I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D, T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D, T022A-N043R-S101D-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S024R-N043R-S101D-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S103A-V104I-G159D-S188D-

A232V-N248D, T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S024R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-N062E-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-S103A-V104I-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F, T022A-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-S128I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-N043R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S103A-V104I-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-S103A-V104I-S128I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101D-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S024R-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D, T022A-N062E-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-N043R-S101D-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-L217D-A232V, T022A-S024R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D, T022A-S024R-N043R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F, e T022A-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000271] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de

subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020K-S024F-N062E-S188D-P239G, S024F-N062E-N116L-P239G, G020K-G023A-N062E-S188D, G020K-G023A-S024F-N062E-G118R-S188D-T213A, G020K-N043W-N062E-N116L-S188D-T213A-P239G, G023A-N062E-N116L-G118R, G023A-S024F-N062E-N116L-G118R, S024F-N116L, S024F-N062E-S188D-T213A, G023A-N062E-N116L-G118R-S188D-P239G, G020K-S024F-N062E, G020K-N043W-N062E-N116L-P239G, S024F-N062E-N116L-T213A-P239G, G020K-S024F-N043W-N062E-N116L-T213A, G020K-G023A-S024F-N062E-N116L-S188D-T213A, S024F-N062E-S188D-P239G, G023A-N043W-N062E-N116L-G118R-T213A, N062E-S188D-P239G, G020K-S024F-N062E-P239G, S024F-N116L-G118R-S188D-P239G, G020K-G023A-N062E-N116L-G118R-T213A, G020K-G023A-S024F-N062E-S188D-T213A-P239G, S024F-N043W-G118R-S188D, G023A-S024F-N116L-G118R-S188D-T213A, G020K-G023A-N043W-N116L-S188D-T213A-P239G, G023A-S024F-N116L-S188D-P239G, G023A-N043W-N116L-G118R-S188D, G023A-S024F-G118R-S188D-P239G, G023A-S024F-N043W-N062E-N116L-G118R, G020K-N043W-S188D-T213A, S024F-N062E-G118R-P239G, G023A-N043W-S188D-T213A, G020K-S024F-N043W-N062E-N116L-G118R-S188D-P239G, G020K-N116L-S188D-P239G, G020K-N043W-N062E-G118R, G020K-N043W-N116L-S188D-T213A, G020K-S024F, G023A-N043W-N116L-P239G, G023A-S024F-N043W-N116L-G118R-S188D-P239G, G020K-G023A-N043W-T213A, e G023A-S024F-N062E-G118R-T213A-P239G, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000272] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020K-G023A-N043W-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D, S024F-G118R-S128I-P129E-G159D, G020K-S024F-N062E-N116L-G118R-S188D, G020K-N062E-N116L-S188D, N062E-N116L-G118R-T213A, G020K-G023A-N062E-N116L-S188D, N062E-N116L-G118R-S188D, G020K-N062E-N116L-T213A, G020K-G023A-N062E-N116L, G020K-N062E-S188D-T213A, G020K-N062E, G020K-S024F-N062E-N116L-S188D, G020K-N043W-N062E-N116L-S188D, G020K-S024F-N062E-S188D-T213A, N062E-N116L-S188D-T213A, G020K-N062E-N116L, G020K-G023A-N062E-N116L-S188D-T213A, G023A-S024F-N062E-N116L-T213A, T022A-N043R-S103A-V104I-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, S024F-N062E-N116L-S188D, T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D, G023A-N062E-N116L-S188D, N043W-N062E-N116L, G020K-G023A-N116L-S188D, N043W-N062E-N116L-S188D, S024F-N062E-N116L, N062E-N116L-S188D, e T022A-S024R-S103A-V104I-S128I-G159D-S188D-A232V-N248D, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000273] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S087R-S101G-S103A-V104I-

Q109R-S212P-A232V-Q245R-E271V, S101G-S103A-V104I-Q109R-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-Q109R-S212P-A232V-Q245R-E271V, S101G-S103A-V104I-Q109R-S212P-A232V-Q245R, N076D-S87R-S103A-V104I-S212P-E271V, N076D-S103A-V104I-Q109R, N076D-S103A-V104I-S212P-E271V, N076D-S103A-V104I-Q109R-Q245R, e N076D-S103A-V104I-S212P-Q245L-E271V, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000274] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S024R-P086W-G118R, S024R-S078R-P086W-N243F, S024R-T033S-P086S-S087N-Y209A, T033S-G118R, S024R-S078R-P086W-G118R-A270T, S024R-T033S-P086W-G118R, S078R-P086W-N243F, T033S-S078R-P086W-G118R-Y209A, T033S-S078R-Y209A, P086W-G118R-N243F, S024R-P086W, S078R-P086W-K235F, S024R-G118R, S024R-P086R, S101G-S103A-V104I-A232V, S024R-T033S-S078R-P086W-G118R, S024R-G118R-Y209A, Y209A-W241R, T033S-P086W-N243F, T033S-A172V-Y209A, G118R-Y209A-N243F, S024R-P086S-S141G, S024R-G118R-Y209A-N243F, S024R-T033S-P086S-S085N-K235F, S024R-T033S-A133V, S024R-T033S-S078R-P086W, S024R-P086W-Y209A, S024R-W241R, T033S-G118R-N243F, S024R-K235F, S024R-S078R-P086W, S024R-G118R-Y209A-K235F, S024R-Y209A-W241R, T033S-G118R-W241R, P086W-G118R-Y209A, T033S-G118R-G159D-Y209A, T033S-S078R-P086W, S024R-P086W-N243F, G118R-Y209A, S024R-P086W-G118R-V203I, S078R-Y209A-K235F, S024R-T033S-W241R, S078R-G118R, T033S-G118R-Y209A-N243F, L021M-S024R-T033S, S024R-

T033S-P086W, T033S-K235F, S078R-P086W-Y209A, S024R-T033S-Y209A-K235F, T033S-P086W-G118R, S024R-T033S-S078R-Y209A, T033S-P086W-G118R-Y209A-N243F, P086W-Y209A-N243F, P005S-S078R-G118R-W241R, S024R-A174T, T033S-Y209A-N243F, P086W-G118R-A133V, S024R-T033S-G118R, S024R-P086W-Y209A-K235F, P086W-Y209A, I008T-S024R, P086W-G118R, T033S-W241R, P005S-S024R-T033S-N243F, S024R-Y209A-S242P, S024R-T033S-S078R-G118R, S024R-T033S-A194T, S024R-N243F, S024R-Y209A, S024R-T033S-G118R-Y209A, T033S-P086W, S024R-T033S, S024R-T033S-S078R-N243F, P086W-N243F, T033S-G118D-A138V-Y209A, T033S-Y209A-K235F, S024R-P086R-G118R, T033S-P201S, S024R-P239Q, T033S-G118R-Y209A-, S078R-P086W, K235F-N243F, S024R-Y209A-K235F, G118R-A172V, H017Y-S024R-T033S-P086W, T033S-L148F, S024R-G118R-K235F, T033S-S078R, T033S-N243F, S024C-T033S, G118R-A194T, T033S-Y209A, G118R-Y209A-K235F, S024R-T033S-Y209A-N243F, S024R-T033S-K235F, S024R-T033S-G118R-K235F, S024R-S141G, S024R-T274I, S024R-T033S-Y209A, P086W-K235F, S024R-Y209A-N243F, V004E-T033S-S078R, P086W-Y209A-K235F, A015T-T033S, T033S-P086W-S156L-Y209A, S024R-G118R-N243F-R269H, Y209A-K235F, S024R-R247H, S024R-T033S-A228T, S078R-K235F, S024R-T033S-A174V-K235F, S024R-K235F-N243F, S024R-T033S-K235F-W241R, S024R-T033S-A151V, S024R-V104A, T033S-A048T, Q012H-V104A-G118R, G118R-K235F, T033S-T253A, T143A-Y209A, S024R-T033S-N243F, T033S-P239T, Y209A-N243F, S024R-T033S-P129H-N184D-T253M, S024R-A085V-P086W-G118R-K235F, S024R-A272P, e S024R-R269C, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000275] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de

protease isoladas, sendo que a dita variante de protease compreende uma ou mais, de preferência, duas ou mais ou, de preferência, três ou mais das seguintes mutações: X1R, X2S, X4R, X4S, X9A, X10S, X14K, X16S, X17R, X18R, X20R, X22A, X22R, X24R, X24W, X25R, X25V, X26F, X42I, X43R, X43A, X46R, X52F, X52E, X52N, X57R, X59A, X62E, X62Q, X68A, X68C, X71G, X72C, X74C, X75A, X75F, X75R, X76D, X78R, X82R, X86W, X89P, X89T, X89G, X89H, X89I, X89V, X89W, X91N, X94N, X100S, X101A, X101N, X101G, X101D, X103G, X103N, X104L, X104I, X106V, X106G, X108I, X111V, X112V, X115K, X115R, X117F, X118I, X121F, X128D, X128F, X128L, X128N, X129E, X144R, X148I, X158E, X159E, X160D, X166D, X185E, X185I, X186H, X188E, X188D, X197F, X203E, X209S, X209N, X209F, X209T, X209E, X209H, X209G, X210R, X212I, X212F, X214F, X215N, X215D, X215E, X217E, X217N, X224A, X230E, X231I, X236F, X238R, X238K, X239K, X239G, X239R, X239S, X241R, X242R, X242L, X243R, X244R, X248I, X248V, X249R, X250I, X252R, X253R, X262D, X263F, X265F, X267V, X267N, X269I, X269R, X271F, X271I, X271H, X271P, X271T, X271V, X271L e X272F, e opcionalmente uma ou mais das seguintes mutações: X103A, X159D, X236H, X245R, X248D e X252K.

[000276] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de protease isoladas, sendo que a dita variante de protease compreende um ou mais dos seguintes conjuntos de mutações:

a) G020K-G023A-N043W-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D, G020K-G023A-N062E-N116L, G020K-G023A-N062E-N116L-S188D, G020K-G023A-N062E-N116L-S188D-T213A, G020K-G100S-N116L-A158E-S166D-N243F, G020K-N043W-N062E-N116L-S188D, G020K-N062E, G020K-N062E-N116L, G020K-N062E-N116L-S188D, G020K-N062E-N116L-T213A, G020K-N062E-S188D-T213A, G020K-S024F-N062E-N116L-G118R-S188D, G020K-S024F-N062E-N116L-

S188D, G020K-S024F-N062E-S188D-T213A, G023A-N062E-N116L-S188D, G023A-S024F-N062E-N116L-T213A, N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N043R-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, N043W-N062E-N116L, N043W-S101D-S212M-N243F, N062E-N116L-G118R-S188D, N062E-N116L-G118R-T213A, N062E-N116L-S188D-T213A, S024F-G118R-S128I-P129E-G159D, S024F-N062E-N116L-S188D, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-S130A-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128I-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101D-S103N-N116L-S144R-A215D, S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-N043R-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-N043R-S103A-V104I-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-L217E-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-

Q245R-N248D-E271F, T022L-T038F-A048R-N062E-G100S-R186K,
T033S-N043W-N218D-P239G-N243F, V026F-A048R-S105T-T213A-
N218D-T224A, V026F-L031F-S078N-G102A-S160D, V026F-V051W-
V104L-S106E, V104L-S105T-T213A-L217E-S256N, A016S-N062E-
A158E-H249R, A016S-N062E-A158E-R186H-E271F, A016S-N062E-
A158E-R186H-H249R, A016S-N062E-V104L-A158E-R186H-E271F,
A016S-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-
N248D-H249R, G020K-G023A-N062E-S188D, G020K-G023A-S024F-
N062E-G118R-S188D-T213A, G020K-N043W-N062E-N116L-S188D-
T213A-P239G, G020K-S024F-N062E-S188D-P239G, G023A-N062E-
N116L-G118R, G023A-N062E-N116L-G118R-S188D-P239G, G023A-
S024F-N062E-N116L-G118R, H017R-T022A-N076D-S101G-S103A-
V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, N043R-N076D-
S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-
E271F, N062E-A158E-G159E-H249R, N062E-A158E-H249R, N062E-
A158E-R186H-E271F, N062E-A158E-R186H-H249R, N062E-A158E-
R186H-H249R-E271F, N062E-A158E-S188D-H249R, N062E-A158E-
S188D-H249R-E271F, N062E-G159E-H249R, N062E-G159E-H249R-
E271F, N062E-G159E-R186H-H249R, N062E-G159E-S188D-H249R,
N062E-R186H-S188D-H249R-E271F, N062E-S101A-A158E-H249R,
N062E-S101A-A158E-R186H-E271F, N062E-S101A-A158E-R186H-
H249R-E271F, N062E-S101A-G159E-H249R, N062E-S101A-R186H-
H249R, N062E-S101A-S188D-H249R, N062E-S101A-S188D-H249R-
E271F, N062E-S101A-V104L-A158E-R186H-E271F, N062E-S128N-
A158E-G159E-E271F, N062E-V104L-A158E-S188D-H249R-E271F,
N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-M222Q-Q245R, S024F-N062E-
N116L-P239G, S024F-N062E-S188D-T213A, S024F-N116L, S024R-
N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-
Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-
A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-

G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-
 A158E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-
 V104I-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-
 G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-
 V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-
 V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-
 S103A-V104I-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-
 S103A-V104I-L148I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-
 S101G-S103A-V104I-L148I-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-
 S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-
 S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-
 N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-
 A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-
 S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-
 P129E-G159E-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-
 P129E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-
 S103A-V104I-P129E-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D, S024R-
 S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D,
 S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D,
 S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D-
 H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-A232V-Q245R-
 N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-
 Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-
 A232V-Q245R-N248D, S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-
 Q245R-N248D-H249R, S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-
 Q245R-N248D-H249R-E271F-E271F, S101A-S103A-V104L-A158E-
 S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S128N-A158E-R186H-
 E271F, S101A-S128N-A158E-Y209E-H249R, S101A-V104L-A158E-
 R186H-S188D-H249R, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-
 N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-

N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-M222Q-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-M222S-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-A232V-M222Q-Q245R, S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103G-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103S-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103G-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103G-V104V-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S128N-A158E-G159E-E271F, S128N-A158E-H249R, S128N-A158E-R186H-E271F, S128N-A158E-R186H-H249R, S128N-A158E-R186H-S188D-E271F, S128N-A158E-S188D-E271F, S128N-A158E-S188D-H249R, S128N-A158E-S188D-Y209E-E271F, S128N-A158E-Y209E-, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-N062E-A158E, T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-

V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D, T022A-S024R-S103A-V104I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S128N-A158E-H249R, V104L-S128N-A158E-H249R, V104L-S128N-A158E-R186H-E271F, V104L-S128N-A158E-R186H-

H249R, e/ou V104L-S128N-A158E-S188D-H249R;

b) A016S-N062E-A158E-H249R-E271F, A016S-N062E-S128N-R186H-E271F, A016S-N062E-V104L-R186H-S188D-E271F, A016S-S101A-S128N-R186H, A016S-S128N-A158E-R186H, A016S-V104L-A158E-R186H-E271F, A016S-V104L-S188D-H249R, A158E-R186H-H249R, A158E-R186H-S188D-H249R-E271F, G020K-G023A-N116L-S188D, G020K-G023A-S024F-N062E-N116L-S188D-T213A, G020K-N043W-N062E-N116L-P239G, G020K-S024F-N043W-N062E-N116L-T213A, G020K-S024F-N062E, G023A-N043W-N062E-N116L-G118R-T213A, G023A-T038F-S078N-G100S-S212M-A215D, G100S-N116L-A158E-T213A, G102A-S103N-S105T-A194E, H017R-T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N043R-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, N043W-N062E-N116L-S188D, N062E-A158E-H249R-E271F, N062E-A158E-R186H-S188D-H249R, N062E-L148I-G159E, N062E-N116L-S188D, N062E-R186H-H249R, N062E-S078N-G102A-N116L-S144R-L250I, N062E-S101A-A158E-R186H-H249R, N062E-S101A-A158E-S188D-H249R, N062E-S101A-R186H, N062E-S101A-R186H-E271F, N062E-S101A-R186H-H249R-E271F, N062E-S101A-R186H-S188D-E271F, N062E-S101A-R186H-S188D-H249R, N062E-S101A-V104L-R186H-S188D-E271F, N062E-S128N-A158E, N062E-S128N-G159E-H249R, N062E-S188D-P239G, N062E-V104L-G159E-H249R, N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N076D-S101G-S103A-V104I-A114V-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-M222S-Q245R, S024F-A048R-G118R-S166D-L217E, S024F-

N062E-N116L, S024F-N062E-N116L-T213A-P239G, S024F-N062E-S188D-P239G, S024F-S101D-G118R-A215D-L250I-A272F, S024R-K027R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S078N-V104L-G118R-S128D, S101A-A158E-R186H-H249R, S101A-A158E-R186H-S188D-H249R, S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S101A-S103G-A158E-R186H-H249R, S101A-S103S-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103S-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S128N-A158E-H249R, S101A-S128N-A158E-S188D-Y209E-E271F, S101A-S128N-A158E-Y209E, S101A-S128N-P129E-R186H-H249R, S101A-V104L-A158E-R186H-H249R, S101A-V104L-A158E-R186H-S188D-E271F,

S101A-V104L-S128N-A158E-R186H-E271F, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-A232V-M222S-Q245R, S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S128L-S130A-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-N183D-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104L-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103S-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103S-V104V-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-N043R-N062E-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-S101D-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-N043R-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-S103A-

V104I-G118R-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D, T022A-N043R-S103A-V104I-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S024R-N043R-S101D-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-N043R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F, T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-S128I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S024R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F, T022A-S024R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101A-A158E-R186H-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-

P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-N248D, T022L-L031F-G102A-S128D-T224A-N243F, T022L-T038F-V121F-S160D-A272F, V026F-S078N-G159C-R186K-N243F, V104L-A158E-H249R, V104L-A158E-R186H-H249R, V104L-A158E-R186H-H249R-E271F, V104L-A158E-R186H-S188D-H249R, V104L-A158E-R186H-S188D-H249R-E271F, V104L-S128N-A158E-R186H-S188D-E271F, V104L-S128N-G159E-E271F, V104L-S128N-R186H-S188D-H249R, e/ou V121F-N185E-T224A-P239G;

c) A016S-S128N-R186H-E271F, N076D-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-M222S-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271G, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-S130A-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, T022A-S101G-G102A-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, A016S-A158E-H249R, A016S-A158E-H249R-E271F, A016S-A158E-R186H-H249R, A016S-L111V-S188D-, A016S-T022A-A158E-R186H-E271F, A048R-S078N-N116L-N185E-L217E-P239G, A048R-S128D-N185E-P239G, A158E-R186H-H249R-E271F, E089P-S101A-P129E-R186H, G020K-G023A-N043W-N116L-S188D-T213A-P239G, G020K-G023A-N062E-N116L-G118R-T213A, G020K-G023A-S024F-N062E-S188D-T213A-P239G, G020K-K027R-P129E-S166D-P239G, G020K-S024F-N062E-P239G, G020K-S024F-T033S-P129E-A194E, G023A-

G100S-A194E-S212M, G023A-N043W-N116L-G118R-S188D, G023A-S024F-G118R-S188D-P239G, G023A-S024F-K027R-N062E, G023A-S024F-N043W-N062E-N116L-G118R, G023A-S024F-N116L-G118R-S188D-T213A, G023A-S024F-N116L-S188D-P239G, K027R-G100S-G118R-S160D-S188D-N243F, K027R-S101D-S103N-S105T-A272F, N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, N062E-S078N-N116L-T224A, N062E-V104L-A158E-R186H-S188D-H249R, N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N076D-S101G-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S024F-G102A-R186K-T213A-L217E-N243F, S024F-N043W-G118R-S188D, S024F-N043W-V104L-V121F-P129E, S024F-N116L-G118R-S188D-P239G, S024F-S103N-V104L-G118R-S188D, S024R-N043R-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-N043R-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S101A-L111V-P129E, S101A-S103A-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103S-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-V104L-S128N-A158E-R186H, S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-S188D-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103S-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103A-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S128N-P129E-R186H, T022A-A158E-R186H-H249R-E271F, T022A-S024K-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D, T022A-

S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S103A-V104I-S128I-G159D-S188D-A232V-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-L148I-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-G159E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S128N-A158E-R186H, T022A-S128N-R186H-S188D-, T022A-V104L-A158E-H249R, T022A-V104L-R186H-S188D-H249R, T022L-G023A-K027R-S101D-V104L-S216F, T022L-S078N-N116L-P129E-S256N, T022L-S078N-S128D-T213A, T033S-G118R-P129E-A194E-P239G, T033S-S105T-S188D-S216F, V026F-V104L-S256N-A272F, T022A-N043R-S103A-V104I-S128I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D, T022A-S101D-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F, e/ou T022A-S103A-V104I-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F;

d) G118R-Y209A, G118R-Y209A-N243F, L021M-S024R-T033S, P005S-S078R-G118R-W241R, P086W-G118R-A133V, P086W-G118R-N243F, P086W-G118R-Y209A, P086W-Y209A-N243F, S024R-A174T, S024R-G118R, S024R-G118R-Y209A, S024R-G118R-Y209A-K235F, S024R-G118R-Y209A-N243F, S024R-K235F, S024R-P086R, S024R-P086S-S141G, S024R-P086W, S024R-P086W-G118R, S024R-P086W-G118R-V203I, S024R-P086W-N243F, S024R-P086W-Y209A, S024R-S078R-P086W, S024R-S078R-P086W-G118R-A270T, S024R-S078R-P086W-N243F, S024R-T033S-A133V, S024R-T033S-G118R, S024R-T033S-P086S-S085N-K235F, S024R-T033S-P086S-S087N-Y209A, S024R-T033S-P086W, S024R-T033S-P086W-G118R, S024R-T033S-S078R-P086W, S024R-T033S-S078R-

P086W-G118R, S024R-T033S-S078R-Y209A, S024R-T033S-W241R, S024R-T033S-Y209A-K235F, S024R-Y209A-W241R, S078R-G118R, S078R-P086W-K235F, S078R-P086W-N243F, S078R-P086W-Y209A, S078R-Y209A-K235F, T033S-A172V-Y209A, T033S-G118R, T033S-G118R-G159D-Y209A, T033S-G118R-N243F, T033S-G118R-W241R, T033S-G118R-Y209A-N243F, T033S-K235F, T033S-P086W-G118R, T033S-P086W-G118R-Y209A-N243F, T033S-P086W-N243F, T033S-S078R-P086W, T033S-S078R-P086W-G118R-Y209A, T033S-S078R-Y209A, T033S-Y209A-N243F, Y209A-W241R, A001R-S009A-N043R, A001R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, A001T-N018R-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R, A194F-G211Q-Q236N, E089I-N116A-N117F-T224A-H249R, G020R-G025R-N116A-Y167W, G020R-H249R-N269R, G020R-N043D-N076D-A230E-H249R, G020R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-N043R-A230E, G020R-N043R-A230E-S242R, G020R-N043R-E271L, G020R-N043R-H249R, G020R-N043R-H249R-E271L, G020R-N043R-N269R, G020R-N043R-R045T-A230E, G020R-N043R-R045T-S101A-N269R, G020R-N043R-R045T-S242R, G020R-N043R-S101A-N116A-T213A-A215F, G020R-N043R-S101A-N269R, G020R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-N043R-S212F, G020R-N043R-S212F-W241R, G020R-N043R-S242R, G020R-N043R-S242R-E271L, G020R-N043R-S242R-H249R, G020R-N043R-V244R, G020R-N043R-W241R, G020R-N062Q-E089I-R186K-S212M, G020R-N076D, G020R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-N116A-N269R, G020R-P052N-N062Q-Y091F-Y192W, G020R-Q059A-S144R-Y192W-T224A, G020R-S024R-K27E-N043R-N076D-A230E, G020R-S024R-N043D-H249R, G020R-S024R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S024R-N043D-

S242R, G020R-S024R-N043R-R045T, G020R-S024R-N043R-R045T-H249R, G020R-S024R-N043R-R045T-N116A, G020R-S024R-N043R-R045T-N116A-T213A, G020R-S024R-N043R-R045T-S101A-N269R, G020R-S024R-N043R-R045T-S101A-T213A, G020R-S024R-N043R-S242R, G020R-S024R-N076D-H249R, G020R-S024R-N116A, G020R-S024R-N116A-A215F, G020R-S024R-N116A-T213A, G020R-S024R-N116A-T213A-A215F, G020R-S024R-P052N-Q059A-S216F, G020R-S024R-R045T-A230E-S242R, G020R-S024R-R045T-N116A-N269R, G020R-S024R-R045T-N269R, G020R-S024R-S101A-A215F, G020R-S024R-S101A-N116A, G020R-S024R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R-H249R, G020R-S024R-S242R-H249R, G020R-S024R-T213A, G020R-S024R-T213A-A215F, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-G211Q-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, G020R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101A-N116A-N269R, G020R-S101A-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104I-G118R-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104L-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104V-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103S-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103S-V104V-A232V-Q245R, G020R-S101G-I198L-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-S101G-S103A-V104I-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101G-

S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104L-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104V-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103G-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103S-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103S-V104L-A232V-Q245R, G020R-S101G-V104I-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103A-V104V-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103G-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103G-V104V-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103S-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103S-V104L-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103S-V104V-A232V-Q245R, G020R-S103N-S216F-Q236N-N252R, G020R-S144R-N185I-L233C-Q236N, G020R-S212F-H249R, G020R-S242R-N269R, G020R-T022R-E271L, G020R-T022R-N043R, G020R-T022R-N043R-S212F, G020R-T022R-N043R-W241R, G020R-T022R-S024R-S242R, G020R-T022R-S078R-S242R, G020R-T022R-S078R-W241R, G020R-T022R-S212F-W241R, G020R-T022R-S242R, G020R-T022R-W241R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116S-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-I198L-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-

N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-T038A-N043R-S101A,
G020R-T22W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V,
G020R-T22W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-
Q245R, G020R-T22W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-T213A-
A215F-A232V-Q245R, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-A215F-
A232V-Q245R, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-A232V-Q245R,
G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-G211Q-T213A-A232V-Q245R,
G020R-T22W-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T22W-
S101G-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R, G020R-T22W-S103A-
V104I-A232V-Q245R, G023A-P052N-S144R-Y192W-S216F, G023A-
P052N-Y192W-I198L-N252R, G023A-S024R-N117F-S212M-S216F,
G023A-S078R-S216F-Q236N-H249R, G023A-Y091F-S101A-I198L-
N252R, G023A-Y091F-V121F-Y192W-Q236N, G025R-E089I-N116A-
P239S-A270C, G025R-G046R-V121F, G025R-N043A-E089I-N117F,
G025R-S103N-R186K-A194F-T224A, G046R-A194F-S212M, G046R-
E089I-Y091F-S101A-N116A, G046R-E089I-Y192W-L233C-A270C,
G046R-N183D-N238L, G046R-Q059A-S103N-G211Q-S212M, G046R-
Q059A-S106G-L217E-H249R, L148I-T213A-N252R, N018R-G020R-
N043D, N018R-G020R-N043D-A230E-S242R, N018R-G020R-N043D-
N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-N043D-
R045T-A230E, N018R-G020R-N043R-N076D-H249R, N018R-G020R-
N043R-N076D-S242R-H249R, N018R-G020R-N043R-R045T-S242R,
N018R-G020R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-
G020R-R045T, N018R-G020R-S024R-N043D-R045T-L233I-S242R,
N018R-G020R-S024R-N043R-R045T-N076D-A230E, N018R-G020R-
S024R-N076D-S087D-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-V150L-
H249R, N018R-G020R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-
A232V-Q245R-N269R, N018R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-
A232V-Q245R-N269R, N018R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-
A232V-Q245R, N018R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-

A232V-Q245R, N018R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-N043R-N076D-A230E, N018R-N043R-R045T-H249R, N018R-N043R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N043R-R045T-S242R-H249R, N018R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-N043R-S242R-H249R, N018R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N076D-S101G-V104I-A232V-Q245R, N018R-Q245R, N018R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N043D-A230E, N018R-S024R-N043D-N076D-H249R, N018R-S024R-N043D-N076D-H249R-N269R, N018R-S024R-N043D-N076D-S078R-H249R, N018R-S024R-N043D-R045T-H249R, N018R-S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N043R-N076D-H249R, N018R-S024R-N043R-N076D-H249R-N269R, N018R-S024R-N043R-N076D-S087D-H249R, N018R-S024R-N043R-N076D-V150L-H249R, N018R-S024R-N076D-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-H249R, N018R-S024R-N076D-H249R-N269R, N018R-S024R-N076D-N116A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S078R-H249R, N018R-S024R-N076D-S078R-S087D-H249R, N018R-S024R-N076D-S078R-V150L-H249R, N018R-S024R-N076D-S087D-H249R-N269R, N018R-S024R-N076D-S087D-S242R-H249R, N018R-S024R-N076D-S087D-V150L-H249R, N018R-

S024R-N076D-S101A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-A215V-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101G-V104I-A232V-H249R, N018R-S024R-N076D-S242R-H249R, N018R-S024R-N076D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-V104I-H249R, N018R-S024R-N076D-V150L-H249R, N018R-S024R-R045T-S242R, N018R-S024R-S101G-V104I, N018R-S024R-S101G-V104I-A232V, N018R-S024R-S242R, N018R-S024R-V104I-H249R, N018R-S024R-V244R, N018R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S101G-Q245R, N018R-S101G-S103A-H249R, N018R-S101G-S103A-Q245R, N018R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, N018R-S101G-V104I-A232V-H249R, N018R-S101G-V104I-A232V-Q245R, N018R-S101G-V104I-H249R, N018R-S103A-A232V-H249R, N018R-S103A-V104I-H249R, N018R-T022R-S024R-N043D-N076D-H249R, N018R-T022R-S024R-N043R-N076D-H249R, N018R-T022R-S024R-N076D-H249R, N018R-T022R-S024R-N076D-S087D-H249R, N018R-T022R-S024R-N076D-V150L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-A232V-Q245R, N018R-T22K-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-N116A-A232V-Q245R, N018R-V104I-A232V-H249R, N043A-N062Q-A194F-G211Q, N043A-T057R-N117F-S144R-N183D, N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043D-R045T-N076D-H249R, N043D-

S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-N076D-S242R-H249R, N043R-N116A-N269R, N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-S101A-N116A-A215F-N269R, N043R-S101A-N116A-N269R, N043R-S101A-N116A-T213A-A215F-N269R, N043R-S101A-N269R, N043R-S101A-T213A-N269R, N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-E271L, N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-S242R-Q245R, N043R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, N043R-S242R-H249R, N043R-T213A-A215F-N269R, N062Q-S103N-N117F-A194F, N062Q-S103N-V121F-S144R-H249R, N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N076D-S103A-V104I-Q109R, N076D-S103A-V104I-Q109R-Q245R, N076D-S103A-V104I-S212P-E271V, N076D-S103A-V104I-S212P-Q245L-E271V, N076D-S87R-S103A-V104I-S212P-E271V, N117F-A194F-T213A-A270C, N117F-T213A-A215F, P052N-S078R-S103N-L148I-T213A, P052N-S103N-N116A-L148I-Y192W, R019H-G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R, R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, R045T-S078R-S101G-

S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S009A-G020R-N043R-S212F, S009A-G020R-N043R-W241R, S009A-G020R-S024R-N043R, S009A-N043R-S078R, S009A-N043R-S078R-S242R, S009A-N043R-S212F, S009A-N043R-W241R, S009A-T022R-N043R-S078R, S009A-T022R-S078R-S212F, S009A-T022R-S078R-S212F-W241R, S009A-T022R-S212F-W241R, S024R-A215F-N269R, S024R-A232V-Q245R, S024R-G025R-N183D-Y192W-P239S, S024R-N043A-N117F-A194F-G211Q, S024R-N043D-H249R, S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-N043R-A215F, S024R-N043R-A230E, S024R-N043R-A230E-S242R, S024R-N043R-H249R, S024R-N043R-N076D-H249R, S024R-N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-N043R-N116A-A215F, S024R-N043R-N116A-A215F-N269R, S024R-N043R-N116A-N269R, S024R-N043R-N116A-T213A-N269R, S024R-N043R-R045T-N076D-A230E-H249R, S024R-N043R-R045T-N269R, S024R-N043R-R045T-S101A-N116A-A215F-N269R, S024R-N043R-R045T-S101A-N116A-T213A-N269R, S024R-N043R-R045T-S242R, S024R-N043R-R045T-T213A-A215F-N269R, S024R-N043R-S101A-A215F, S024R-N043R-S101A-A215F-N269R, S024R-N043R-S101A-N116A, S024R-N043R-S101A-N116A-A215F-N269R, S024R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-N043R-S242R, S024R-N062Q-V104L-S106G-H249R, S024R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-N076D-V104I-A232V-Q245R, S024R-N116A-T213A-N269R, S024R-R045T, S024R-R045T-N076D-A230E-S242R-H249R, S024R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-S078R-S212F, S024R-S078R-V104L-N116A-N183D, S024R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-S101A-H120F-A194F-H249R, S024R-S101A-N269R, S024R-

S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, S024R-S101G-V104I-Q245R, S024R-S103A-Q245R, S024R-S103A-V104I-A232V-H249R, S024R-S103A-V104I-H249R, S024R-S103A-V104I-Q245R, S024R-Y167W-T224A-H249R, S078R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S078R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, S078R-S103N-S106G-Y167W-Q236N, S078R-V104L-T213A-A215F-T224A, S078R-Y091F-V121F-L233C-N252R, S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S087R-S101G-S103A-V104I-Q109R-S212P-A232V-Q245R-E271V, S099F-S144R-Y167W-N252R, S101A-H120F-Y192W-A215F-T224A, S101A-S103A-V104I-T213A-A232V-Q245R-N269R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-E271L, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S101G-S103A-V104I-A232V-S242R-Q245R, S101G-S103A-V104I-A232V-V244R-Q245R, S101G-S103A-V104I-G115R-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-N116A-T213A-A232V-Q245R-N269R, S101G-S103A-V104I-Q109R-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-Q109R-S212P-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-Q109R-S212P-A232V-Q245R-E271V, S101G-S103A-V104I-S212F-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R-H249R, S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R-N269R, S105T-S128N-S144R-L148I-S212M, S106G-N117F-N238L, S144R-G211Q-N238L-P239S-H249R, T022R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, T022R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, T022R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, T022R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, T022W-S078R-Y167W-S212M-A270C, T057R-E089I-I198L, T057R-S099F-S105T-I198L-T213A, T057R-S099F-V121F-N185I-Y192W, T057R-Y167W-H249R, V004R-G020R-H249R,

V004R-G020R-N043R, V004R-G020R-S024R, V004R-G020R-S024R-H249R, V004R-G020R-S024R-N043R, V004R-G020R-S024R-N043R-S242R, V004R-G020R-S024R-V244R, V004R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, V004R-S009A-G020R-N043R, V004R-S009A-G020R-N043R-S242R, V004R-S009A-G020R-S024R-S242R, V004R-S009A-G020R-S242R, V004R-S009A-N043R-W241R, V004R-S009A-S024R-N043R-W241R, V004R-S009A-S078R-W241R, V004R-S009A-W241R, V004R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, V104L-L217E-T224A-H249R-N252R, V104L-T213A-S216F, V121F-N252R-A270C, e/ou Y091F-S099F-S101A-S105T-Y167W;

e) S101G-S103A-V104I-A232V-Q236H-Q245R-N252K, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248R, S101G-S103A-V104I-G159R-A232V-Q245R-N248D, A232V-Q245R, E089I-N117F-N185I-A215F-L233C, G020R-E089I-L217E, G020R-G023A-V104L-Y192W-L233C, G020R-N043D-R045T-N076D-S242R-H249R, G020R-N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, G020R-N043R-N076D-A230E-H249R, G020R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-N116A-A215F-N269R, G020R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, G020R-R045T-N116A-N269R, G020R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S024R-A215F, G020R-S024R-K27R-N043D-S242R-H249R, G020R-S024R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-S024R-N043R-N076D, G020R-S024R-N043R-R045T-A215F, G020R-S024R-N043R-R045T-N076D-S242R-H249R, G020R-S024R-N043R-R045T-N116A-T213A-A215F, G020R-S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S024R-T38I-N043R-R045T-N076D-S242R-H249R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-G211Q-T213A-A232V-

Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-A215F-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N183D-A215F-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-A131V-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R-E271G, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-T180A-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104I-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103G-V104V-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-G211Q-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N183D-G211Q-A232V-Q245R-, G020R-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S242R-H249R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-I198L-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N183D-I198L-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-N116A-

I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-I198L-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-A114T-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N183D-I198L-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S103A-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T22W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, G020R-T22W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T22W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, G020R-T22W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, G025R-N043A-Y091F-

I198L-A270C, G025R-S105T-S128N-S144R-A270C, G046R-E089I-S099F-R186K-S212M, G118R-A172V, G118R-A194T, G118R-Y209A-K235F, H017Y-S024R-T033S-P086W, I008T-S024R, K027R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, K027R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, K235F-N243F, N018R-G020R-H249R, N018R-G020R-N043D-H249R, N018R-G020R-N043D-R045T-A230E-S242R, N018R-G020R-N043D-R045T-N076D-S242R, N018R-G020R-N043D-R045T-S240P, N018R-G020R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-N043R, N018R-G020R-N043R-N076D, N018R-G020R-N043R-N076D-A230E-S242R, N018R-G020R-N043R-R045T-N076D-H249R, N018R-G020R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N043D-N076D-S242R, N018R-G020R-S024R-N043D-R045T-S242R, N018R-G020R-S024R-N043R-N076D-H249R, N018R-G020R-S024R-N043R-R045T-N076D-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-L217E-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-H249R, N018R-G020R-T22W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R,

N018R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R,
N018R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-
N269R, N018R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-
H249R, N018R-N043D-R045T-N076D-S242R-H249R, N018R-N043D-
R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N043D-
R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N043D-R045T-
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-N043D-S078R-
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-N043R-N076D-
A230E-S242R-H249R, N018R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-
A232V-Q245R-N269R, N018R-N043R-N076D-S242R-H249R, N018R-
N043R-R045T-N076D-A230E-S242R, N018R-N043R-R045T-N076D-
S076T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-A273T, N018R-N043R-
R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N043R-
R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-
N043R-R045T-N076D-S242R, N018R-N043R-R045T-S242R, N018R-
N076D-H249R, N018R-N076D-Q245R, N018R-N076D-S101G-A232V-
Q245R, N018R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-
N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-N076D-
S101G-S103A-V104I-H249R, N018R-N076D-S101G-V104I-H249R,
N018R-N076D-S103A-V104I-H249R, N018R-R045T-N076D-S101G-
S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N043D-A230E-H249R,
N018R-S024R-N043D-A230E-S242R, N018R-S024R-N043D-H249R,
N018R-S024R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R,
N018R-S024R-N043D-N076D-S242R-H249R, N018R-S024R-N043D-
N076D-V150L-H249R, N018R-S024R-N043D-S242R, N018R-S024R-
N043D-S242R-H249R, N018R-S024R-N043R-N076D-L217E-H249R,
N018R-S024R-N043R-N076D-S078R-H249R, N018R-S024R-N043R-
R045T-A230E-H249R, N018R-S024R-N076D, N018R-S024R-N076D-
A232V-H249R, N018R-S024R-N076D-G211Q-H249R, N018R-S024R-
N076D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-

G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-I198M-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-L088I-S101A-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-A215F-H249R-V268G, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-Y209H-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-M117I-N183D-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101G-A232V, N018R-S024R-N076D-S103A-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-V104I, N018R-S024R-Q245R, N018R-S024R-R045T-A230E-S242R, N018R-

S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R,
N018R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-
N269R, N018R-S024R-S242R, N018R-S024R-V104I, N018R-S024R-
V30S-L31S-D32I-T33Q-G34V-I35F, N018R-S078R-S101G-S103A-
V104I-L217E-A232V-Q245R, N018R-S101G-S103A-V104I, N018R-
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S101G-V104I,
N018R-S103A, N018R-S103A-V104I-A232V, N018R-T022K-N043D-
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-
G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-G211Q-T213A-H249R,
N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-
S024R-N076D-I198L-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-
I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-
G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-
T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-
T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-
H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-T213A-A215F-H249R,
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R, N018R-T022W-
S024R-N076D-S101A-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-
S101A-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-
I198L-G211Q-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-
G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-
I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-
N116A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-
G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-
T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-
A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-
G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-
G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-
N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-
S101A-N116A-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-

N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-T213A-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-I198L-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-G211Q-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-T213A-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-N116A-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-T213A-A215F-H249R, N018R-V104I, N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R-A272V, N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R-R275S, N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-V234I-Q245R, N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-N218S-A232V-Q245R, N043R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N062Q-S101A-Q236N-N252R-A270C, N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N076D-

S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-S242R-Q245R, P005S-S024R-T033S-N243F, P014L-G020R-S024R-N043R-R045T-S101A-A215F, P052N-V104L-N183D-S216F-H249R, P086W-G118R, P086W-N243F, P086W-Y209A, Q012H-G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-I198L-G211Q-T213A-A232V-Q245R, R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, R045T-S242R-H249R, S024C-T033S, S024R-A232V, S024R-G046R-Y091F-V121F, S024R-G118R-K235F, S024R-N043A-S105T-S106G-I198L, S024R-N043D-R045T-S242R-H249R, S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-N043D-S242R-H249R, S024R-N043R-N076D, S024R-N043R-N076D-A230E-S242R, S024R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-N043R-R045T-S242R-H249R, S024R-N043R-S101A-T213A, S024R-N076D-Q245R, S024R-N076D-S101G-A232V-Q245R, S024R-N076D-S101G-M175L-A232V-Q245R, S024R-N076D-S101G-Q245R, S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-N076D-S103A-V104I-Q245R, S024R-N076D-V104I-Q245R, S024R-N243F, S024R-P086R-G118R, S024R-P086W-Y209A-K235F, S024R-P239Q, S024R-Q245R-H249R, S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-S101G, S024R-S101G-Q245R, S024R-S101G-V104I-H249R, S024R-S103A-A232V, S024R-S103A-M175L-A232V-H249R, S024R-S141G, S024R-T033S, S024R-T033S-A194T, S024R-T033S-G118R-K235F, S024R-T033S-G118R-Y209A, S024R-T033S-K235F, S024R-T033S-S078R-G118R, S024R-T033S-S078R-N243F, S024R-T033S-Y209A, S024R-T033S-Y209A-N243F, S024R-T274I, S024R-V104I-H249R,

S024R-V104I-Q245R, S024R-Y091F-I198L-A215F-P239S, S024R-Y209A, S024R-Y209A-K235F, S024R-Y209A-S242P, S078R-P086W, S078R-S099F-N116A-R186K-T224A, S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S101G-A232V, S101G-S103A-V104I-A232V-H249R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R-N269R, S101G-S103A-V104I-Q245R, S105T-G211Q-S216F, S106G-N185I-S216F-Q236N, T022R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, T033S-G118D-A138V-Y209A, T033S-G118R-Y209A-, T033S-L148F, T033S-N243F, T033S-P086W, T033S-P201S, T033S-S078R, T033S-W241R, T033S-Y209A, T033S-Y209A-K235F, V004M-N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R, V104I-A232V-H249R, e/ou V104L-H120F-R186K-S216F-N252R;

f) A015T-T033S, A016T-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, A230E-H249R, A232V-H249R, E089I-S105T-N116A-A215F-S216F, E089I-Y091F-N185I-G211Q-A270C, G020R-A090S-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, G020R-N043R-N076D, G020R-N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-P052N-S101A-I198L-L233C, G020R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-S024R-N043D-N076D-H249R, G020R-S024R-N043D-N076D-S242R-H249R, G020R-S024R-N043D-R045T-A230E-S242R, G020R-S024R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S024R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, G020R-S024R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S024R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, G020R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S024R-R045T-N076D-S242R-H249R, G020R-S024R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-G115E-N116A-N183D-G211Q-T213A-

A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R-T274I, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104I-T213A-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022R-N269R, G020R-T022R-S078R-S212F-W241R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R-N269S, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R-T274I, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N183D-I198L-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R-N263S, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R,

G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N183D-A215F-A232V-Q245R,
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N183D-A232V-Q245R, G025R-
N062Q-S128N-S144R-N185I, G025R-N116A-H120F-T224A-A270C,
G118R-K235F, K027R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-
A232V-Q245R, N018K-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-
A232V-Q245R-N269R, N018R-G020R-N043D-N076D-S078R-S101G-
S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N018R-G020R-N043D-N076D-
S242R-H249R, N018R-G020R-N043D-R045T-N076D-H249R, N018R-
G020R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R,
N018R-G020R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-
Q245R-N269R, N018R-G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-
Q245R-N269R, N018R-G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-L217E-
A232V-Q245R, N018R-G020R-N043R-R045T-H249R, N018R-G020R-
N043R-R045T-N076D-A230E-H249R, N018R-G020R-N076D, N018R-
G020R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R,
N018R-G020R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-
H249R, N018R-G020R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-
H249R, N018R-G020R-S024R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-
V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N043D-N076D-S101G-
S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-G020R-S024R-N043R-
N076D, N018R-G020R-S024R-N076D-A131T-A215F-H249R, N018R-
G020R-S024R-N076D-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-
G211Q-N243D-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-T213A-
A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-T213A-H249R,
N018R-G020R-S024R-N076D-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-
S024R-N076D-I198L-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-I198L-
T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-G211Q-
T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-H249R,
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R-
N269S, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-A215F-

Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-I198L-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N204D-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-G211Q-A215F-H249R-N269D, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-T213A-

H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-
H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-A215F-
H249R, N018R-G020R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-
A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-
Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-I198L-T213A-H249R,
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-H249R, N018R-
G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R,
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-
A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-
I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-
N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-
N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-
N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-
S101A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-
G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-
G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-
S101A-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-
S101A-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-
S101A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-
S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-H249R, N018R-G020R-T022W-
S024R-N076D-S101A-N116A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-
N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-
G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-H249R, N018R-
G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R,
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-
T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-
N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-
N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-
G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-
T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-

N183D-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-
N116A-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-
N183D-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-
N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-
T213A-H249R, N018R-N043D-A230E-H249R, N018R-N043D-N076D-
S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-N043D-
N076D-S242R-H249R, N018R-N043D-R045T-N076D-S078R-S101G-
S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-N043D-R045T-N076D-
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-N043D-R045T-
S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-A272D, N018R-N043R-
N076D-A230E-H249R, N018R-N043R-N076D-S242R, N018R-N043R-
R045T-A230E-S242R, N018R-N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-
V104I-L217E-A232V-Q245R, N018R-N043R-S078R-S101G-S103A-
V104I-A232V-Q245R, N018R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-
Q245R-H249R, N018R-N076D-A232V-H249R, N018R-N076D-S078R-
S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N018R-N076D-S101G-
I198T-A232V, N018R-N076D-S101G-S103A-V104I-Q245R, N018R-
N076D-S101G-V104I, N018R-N076D-S242R, N018R-N076D-S242R-
H249R, N018R-N076D-V104I-Q245R-H249R, N018R-R045T-H249R,
N018R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-
R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-
N043D-N076D-S087D-H249R, N018R-S024R-N043D-N076D-S242R,
N018R-S024R-N076D-A086V-S101A-N183D-I198L-G211Q-H249R,
N018R-S024R-N076D-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-A232V,
N018R-S024R-N076D-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-
I198L-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-G211Q-T213A-
A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-H249R, N018R-S024R-
N076D-I198L-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-L217E-H249R-
N269R, N018R-S024R-N076D-N116A-A150T-T213A-H249R, N018R-
S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-

N116A-I198L-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-H249R-A248T, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S087D-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-A215F-H249R-A270V, N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-

A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-V197A-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101G, N018R-S024R-N076D-S101G-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V, N018R-S024R-N076D-S103A-H249R, N018R-S024R-N076D-S103A-V104I-L135I-A232V, N018R-S024R-N076D-T213A-A215F-H249R-T260K, N018R-S024R-N076D-V150L-S242R-H249R, N018R-S024R-R045T-A230E-H249R, N018R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R,

N018R-T022R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R,
N018R-T022W-S024R-N076D-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A209V-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-Y209H-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-H249R, N018R-T022W-S024R-

N076D-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R-L267I, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116T-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-

S101A-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-
S101A-N183D-I198L-Y209H-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-
S101A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-
G211Q-T213A-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-I198L-
T213A-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-I198L-H249R,
N018R-V104I-A232V, N043A-Q059A-S101A-S216F-T224A, N043D-
N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N043D-R045T-
N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043D-R045T-
S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043D-R045T-S078R-
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043D-S242R-H249R,
N043R-A230E-H249R, N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-
A232V-Q245R-H249R, N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-
L217E-A232V-Q245R, N043R-N076D-S101G-S103T-V104I-A232V-
Q245R-H249R-N269R, N043R-R045T-H249R, N043R-R045T-N076D-
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-R045T-S078R-S101G-
S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-R045T-S078R-S101G-
S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N043R-R045T-S101G-S103A-
V104I-A232V-Q245R-H249R, N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-
L217E-A232V-Q245R, N043R-S101G-S103A-V104I-Q245R-H249R,
N043R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R-N269R, N076D-
A232V-Q245R, N076D-Q245R, N076D-S101G-A232V-Q245R, N076D-
S101G-S103A-Q245R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-H249R,
N076D-S101G-S103A-V104I-H249R, N076D-S101G-S103A-V104I-
V150L-A232V-Q245R, N076D-S101G-V104I-H249R, N076D-S101G-
V104I-Q245R, N076D-S103A-V104I-A232V-Q245R, N076D-S103A-
V104I-Q245R, N076D-V104I-A232V-Q245R, N076D-V104I-Q245R,
P005S-N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-T213A-A215F-H249R,
P086W-K235F, P086W-Y209A-K235F, Q012H-V104A-G118R, R045T-
N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, R045T-
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-G118R-N243F-R269H,

S024R-K235F-N243F, S024R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-N043R-N076D-A230E-H249R, S024R-N076D-A232V-H249R, S024R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S024R-N076D-S101G, S024R-N076D-S101G-A232V-H249R, S024R-N076D-S101G-S103A-A232V, S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-M175L-H249R, S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-Q245R, S024R-N076D-S101G-V104I-A232V-H249R, S024R-N076D-S103A-H249R, S024R-N076D-S103A-Q245R, S024R-N076D-S103A-V104I-H249R, S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S024R-R045T-S242R-A273V, S024R-R247H, S024R-S101G-S103A, S024R-S101G-S103A-A232V, S024R-S101G-S103A-V104I, S024R-S103A-Q245R-H249R, S024R-S103A-V104I, S024R-S106G-N116A-S212M-T224A, S024R-T033S-A151V, S024R-T033S-A174V-K235F, S024R-T033S-A228T, S024R-T033S-K235F-W241R, S024R-T033S-N243F, S024R-V104A, S024R-V104I-A232V, S024R-Y209A-N243F, S078R-K235F, S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-S242R-Q245R, S099F-S105T-S106G-A194F-S212M, S101G-H249R, S101G-S103A-V104I, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248R, S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, S103A-A232V, S103A-A232V-H249R, S103A-A232V-Q245R, S103A-V104I-Q245R, S103N-H120F-Y167W-I198L-L233C, T022W-A194F-T213A-L233C-N238L, T022W-E089I-S216F, T033S-A048T, T033S-P086W-S156L-Y209A, T033S-P239T, T033S-T253A, T057R-N183D-Q236N, T143A-Y209A, V004E-T033S-S078R, V004R-S009A-T022R-S078R-S212F, e/ou Y209A-K235F; e, opcionalmente, uma ou mais das seguintes mutações: S103A, G159D, Q236H, Q245R, N248D e N252K.

[000277] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de protease isoladas, sendo que a dita variante de protease tem pelo me-

nos uma, ou mesmo duas ou mais mutações carregadas selecionadas do grupo que consiste em N062E, S101D, P129E, A158E, G159D/E, S166D, e/ou S188D, tendo, de preferência, uma carga de 0, -1, -2, -3, -4 ou -5, de preferência 0, -1, -2 ou -3, com a máxima preferência -1 ou -2 em relação à enzima da SEQ ID NO:1. As ditas variantes de protease podem também incluir qualquer uma das variantes mencionadas no pedido.

[000278] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de protease isoladas, sendo que a dita variante de protease tem uma ou duas ou mais mutações carregadas selecionadas do grupo que consiste em N018R, G020K/R, T022R, S024R, N043R, Q245R, H249R e/ou N269R, tendo, de preferência, uma carga de 0, +1, +2, +3, +4 ou +5, de preferência, +1, +2 ou +3, com a máxima preferência, +2 em relação à enzima da SEQ ID NO:1. As ditas variantes de protease podem também incluir qualquer uma das variantes mencionadas no pedido.

[000279] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-S087D-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-V150L-H249R, N018R-S024R-N043R-N076D-S087D-H249R, N018R-S024R-N043R-N076D-V150L-H249R, N018R-S024R-N076D-S078R-S087D-H249R, N018R-S024R-N076D-S078R-V150L-H249R, N018R-S024R-N076D-S087D-H249R-N269R, N018R-S024R-N076D-S087D-S242R-H249R, N018R-S024R-N076D-S087D-V150L-H249R, N018R-S024R-N076D-V150L-H249R, N018R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, N018R-T022R-S024R-N076D-S087D-H249R, N018R-

T022R-S024R-N076D-V150L-H249R, N043R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, S024R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, S078R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S078R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R-H249R, S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R-N269R, T022R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N043D-N076D-V150L-H249R, N043R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, T022R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, N018R-S024R-N043D-N076D-S087D-H249R, N018R-S024R-N076D-S087D-H249R, N018R-S024R-N076D-V150L-S242R-H249R, N043R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R-N269R, N076D-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-S242R-Q245R, S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, N076D-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, e S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-S242R-Q245R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000280] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S130A-

A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-S130A-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, e S024R-K027R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000281] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S101G-S103A-V104I-A232V-M222Q-Q245R, S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-M222S-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-M222Q-A232V-Q245R-N248D-H249R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-M222Q-Q245R, S101G-S103A-V104I-A232V-M222S-Q245R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-M222S-Q245R, e N076D-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-M222S-A232V-Q245R-N248D-H249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisi-

na BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000282] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-N183D-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S128L-S130A-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-S130A-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271G, S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, e S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisi-

na BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000283] A presente invenção fornece, adicionalmente, polipeptídeos que compreendem variantes de subtilisina que têm atividade proteolítica compreendendo uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S101G-S103A-V104I, T22A-S101A-Y209E, S103G-L111V-G159E, T22A-S103G-G159E, T22A-L111V-G159E, T22A-S128N-E271F-Y209E, T22A-S103G-L111V, N62E-L111V-S128N, T22A-L111V-S128N, T22A-N62E-L111V, S101A-S103G-V104L-S188D, S101G-S103A-V104I-G159D, S101A-S103G-V104L-S128N, T22A-S101A-G159E, S101A-S103G-V104L, S101A-S103G-V104L-G159E, T22A-S101A-S103G-V104L, S101A-S103G-V104L-Y209E, T22A-Y209E-E271F, T22A-S101A-E271F, e S101A-Y209E-E271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000284] A presente invenção fornece, adicionalmente, polipeptídeos que compreendem variantes de subtilisina que têm atividade proteolítica compreendendo uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S103A-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de

aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000285] A presente invenção fornece, adicionalmente, polipeptídeos que compreendem variantes de subtilisina que têm atividade proteolítica compreendendo uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N238R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N248R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-T253R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-S24R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N76D, S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-E271F, T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R, e N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000286] A presente invenção fornece, adicionalmente, polipeptídeos que compreendem variantes de subtilisina que têm atividade proteolítica compreendendo uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: A1R, A230E, E271L, G115R, G20R, H249R, K235F, K27V/F/L, L75E, L82R, N18R, N269R, N43D, N43R, N76D, R45T, S212F, S242R, S24R, S78R, S9A, T22R, V121E, V244R, V28E, V30E, V4R,

W241R, G20R-N43R-H249R, G20R-T22R-N43R, G20R-N43R-S242R, G20R-N43R-E271L, G20R-N43R-V244R, G20R-S24R-N43R-S242R, S9A-T22R-S78R-S212F-W241R, S9A-G20R-N43R-S212F, S9A-N43R-S212F, G20R-N43R-S212F, G20R-T22R-N43R-S212F, S24R-S78R-S212F, S9A-N43R-S78R, S9A-N43R-S78R-S242R, S9A-G20R-N43R-S78R, G20R-S24R-N43R-S78R-S242R, T22R-S24R-S78R-S212F, S9A-G20R-N43R-S78R-S242R, G20R-N43R-S78R-H249R, G20R-N43R-S78R, S9A-S78R-S212F, S9A-T22R-N43R-S78R, S9A-G20R-S24R-N43R, S9A-T22R-S78R-S212F, V4R-S9A-T22R-S78R-S212F, G20R-S24R-N43R, A1R-S9A-N43R, G20R-S24R-N43R-G115R, S9A-S24R-N43R, G20R-T22R-S24R-N43R, A1R-S24R-N43R, S9A-G20R-S24R-N43R-S242R, S9A-G20R-T22R-S78R-S212F, S9A-S24R-N43R-V244R, S9A-S24R-N43R-S242R, V4R-S9A-T22R-S24R-S212F, e T22R-S24R-N43R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000287] A presente invenção fornece, adicionalmente, polipeptídeos que compreendem variantes de subtilisina que têm atividade proteolítica e compreendendo uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-G159R-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248R, S101G-S103A-V104I-G159R-A232V-Q245R-N248R, S101G, S103A, V104I, A232V, Q236H, e Q245R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000288] A presente invenção fornece, adicionalmente, polipeptídeos que compreendem variantes de subtilisina que têm atividade proteolítica e compreendendo uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: A16S, T22A, S24R, N62E, N76D, E89P, S101A/G, S103G/A, V104L/I, L111V, S128N, P129E, A232V, L148I, A158E, G159D/E, R186H, S188D, Y209E, Q236H, Q245R, N248D/R, H249R, N252K/R, T253R, e E271F sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000289] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de protease de protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, sendo que a protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* compreende a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:2, sendo que a variante de protease compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou 25 mutações selecionadas do grupo de G20K, G20R, G23A, S24F, S24R, N43R, N43W, R45T, N62E, N76D, S101A, N116A, N116L, G118R, S128I, P129E, S188D, T213A, A215F, L217E, P239G, e N269R, sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1 como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000290] A presente invenção fornece, adicionalmente, polipeptídeos que compreendem variantes de subtilisina que têm atividade proteolítica

ca e compreendendo uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: A1R, Q2S, Q2M, Q2A, Q2R, Q2W, S3R, V4R, V4S, V4C, I8A, S9A, S9F, S9W, R10S, R10A, R10H, R10M, Q12F, Q12R, P14K, P14F, P14Q, A15R, A15F, A16S, H17R, H17M, H17F, N18R, N18K, G20F, G20K, G20R, T22A, T22R, T22Y, T22V, T22Q, T22L, T22W, G23A, G23S, G23F, S24R, S24F, S24W, S24Q, S24H, S24L, G25V, G25F, G25R, V26F, K27L, K27F, K27R, K27V, V28A, V28N, V28E, A29T, V30E, L31F, T33S, T33G, T33D, G34P, I35M, S36T, S36F, S36R, T38L, T38F, T38R, P40N, P40L, P40T, P40W, P40H, P40R, L42I, N43A, N43F, N43I, N43S, N43R, N43M, N43W, N43D, R45T, G46R, A48R, F50C, V51W, V51F, V51H, P52F, P52E, P52N, P55Y, T57R, Q59A, Q59F, Q59R, D60P, D60Q, D60A, N62E, N62Q, G63V, G63M, G63T, G63I, G63A, G63S, G63H, G63Q, G63D, G63E, G63P, H64F, H64T, V68A, V68C, A69N, A69T, A69P, A69W, T71G, T71G, I72C, A74C, L75A, L75F, L75E, L75R, N76D, S78R, S78N, S78I, S78R, I79W, I79Q, V81R, L82F, L82T, L82V, L82R, L82M, A85M, P86W, P86L, P86I, E89P, E89T, E89G, E89H, E89W, E89L, E89V, E89W, E89F, E89I, Y91N, Y91F, A92F, K94N, S99F, S99T, S99P, S99G, S99M, G100S, G100N, G100Q, G100I, S101A, S101N, S101G, S101D, S101T, S101D, S101E, S101P, S101F, G102A, G102T, G102N, G102H, G102E, S103G, S103N, S103D, S103A, V104L, V104I, V104E, V104D, S105T, S105E, S105Q, S106G, S106T, S106E, S106D, S106A, S106V, S106F, I107M, I107F, A108I, A108G, Q109M, L111V, L111I, E112V, E112L, E112Q, A114G, G115K, G115R, N116K, N116A, N116L, N117F, G118R, G118I, M119C, H120A, H120F, H120R, V121F, V121F, V121E, N123G, N123E, L124S, S128D, S128F, S128L, S128N, S128H, S128M, S128I, S128Q, P129E, S132A, S132E, A138G, S144R, V147L, L148I, A158E, G159D, G159E, G159C, S160D, S166D, S166E, Y167W, M175V, V177C, D181A,

Q182R, N183I, N183D, N183M, N183R, N183F, N183R, N185E, N185V, N185I, R186H, R186K, S188E, S188D, S188R, Y192H, Y192W, A194E, A194V, A194F, D197F, D197F, I198L, I198F, V203E, V203C, T208S, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, Y209L, P210R, P210V, P210L, G211Q, G211R, S212I, S212M, S212F, T213A, Y214F, A215N, A215D, A215E, A215H, A215F, S216F, S216A, L217E, L217N, L217D, N218D, N218P, N218E, T224A, T224G, V227I, A230E, A231I, A231C, A232V, L233C, V234F, K235F, Q236F, Q236N, Q236H, N238R, N238K, N238L, P239K, P239G, P239R, P239R, P239H, P239T, P239N, P239S, P239F, S240R, W241R, S242L, S242R, N243F, N243R, V244R, Q245R, I246S, N248D, N248V, N248I, N248R, H249R, H249T, L250I, K251R, K251S, N252I, N252F, N252R, N252K, N252H, T253I, T253R, T253F, A254C, S256N, G258R, T260V, T260I, L262D, L262H, Y263F, S265F, L267V, L267N, L267M, N269I, N269R, A270C, E271I, E271H, E271V, E271H, E271M, E271L, E271P, E271A, E271F, E271T, A272F, A272F, A272R, A273F, A273I, e T274G, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000291] A presente invenção fornece, adicionalmente, polipeptídeos que compreendem uma variante de protease da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, sendo que a protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* compreende a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:2, e sendo que a variante de protease compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, ou 50 mutações nas posições de aminoácido selecionadas a partir do aminoácido 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18,

20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 38, 40, 42, 43, 45, 46, 48, 50, 51, 52, 55, 57, 59, 60, 62, 63, 64, 68, 69, 71, 72, 74, 75, 76, 78, 79, 81, 82, 85, 86, 89, 91, 92, 94, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 111, 112, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 123, 124, 128, 129, 132, 138, 44, 147, 148, 158, 159, 160, 166, 167, 175, 177, 181, 182, 183, 185, 186, 188, 192, 194, 197, 198, 203, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 224, 227, 230, 231, 233, 234, 235, 236, 236, 238, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 246, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 256, 258, 260, 262, 263, 265, 267, 269, 270, 271, 272, 273, e 274, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1

[000292] A presente invenção fornece, adicionalmente, polipeptídeos que compreendem variantes de protease da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, sendo que a protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* compreende a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:2, e sendo que a variante de protease compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, ou 50 mutações selecionadas do grupo de A1R, Q2S, Q2M, Q2A, Q2R, Q2W, S3R, V4R, V4S, V4C, I8A, S9A, S9F, S9W, R10S, R10A, R10H, R10M, Q12F, Q12R, P14K, P14F, P14Q, A15R, A15F, A16S, H17R, H17M, H17F, N18R, N18K, G20F, G20K, G20R, T22A, T22R, T22Y, T22V, T22Q, T22L, T22W, G23A, G23S, G23F, S24R, S24F, S24W, S24Q, S24H, S24L, G25V, G25F, G25R, V26F, K27L, K27F, K27R, K27V, V28A, V28N, V28E, A29T, V30E, L31F, T33S, T33G, T33D, G34P, I35M, S36T, S36F, S36R, T38L, T38F, T38R, P40N, P40L, P40T, P40W, P40H, P40R, L42I, N43A, N43F, N43I, N43S,

N43R, N43M, N43W, N43D, R45T, G46R, A48R, F50C, V51W, V51F, V51H, P52F, P52E, P52N, P55Y, T57R, Q59A, Q59F, Q59R, D60P, D60Q, D60A, N62E, N62Q, G63V, G63M, G63T, G63I, G63A, G63S, G63H, G63Q, G63D, G63E, G63P, H64F, H64T, V68A, V68C, A69N, A69T, A69P, A69W, T71G, T71G, I72C, A74C, L75A, L75F, L75E, L75R, N76D, S78R, S78N, S78I, S78R, I79W, I79Q, V81R, L82F, L82T, L82V, L82R, L82M, A85M, P86W, P86L, P86I, E89P, E89T, E89G, E89H, E89W, E89L, E89V, E89W, E89F, E89I, Y91N, Y91F, A92F, K94N, S99F, S99T, S99P, S99G, S99M, G100S, G100N, G100Q, G100I, S101A, S101N, S101G, S101D, S101T, S101D, S101E, S101P, S101F, G102A, G102T, G102N, G102H, G102E, S103G, S103N, S103D, S103A, V104L, V104I, V104E, V104D, S105T, S105E, S105Q, S106G, S106T, S106E, S106D, S106A, S106V, S106F, I107M, I107F, A108I, A108G, Q109M, L111V, L111I, E112V, E112L, E112Q, A114G, G115K, G115R, N116K, N116A, N116L, N117F, G118R, G118I, M119C, H120A, H120F, H120R, V121F, V121F, V121E, N123G, N123E, L124S, S128D, S128F, S128L, S128N, S128H, S128M, S128I, S128Q, P129E, S132A, S132E, A138G, S144R, V147L, L148I, A158E, G159D, G159E, G159C, S160D, S166D, S166E, Y167W, M175V, V177C, D181A, Q182R, N183I, N183D, N183M, N183R, N183F, N183R, N185E, N185V, N185I, R186H, R186K, S188E, S188D, S188R, Y192H, Y192W, A194E, A194V, A194F, D197F, D197F, I198L, I198F, V203E, V203C, T208S, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, Y209L, P210R, P210V, P210L, G211Q, G211R, S212I, S212M, S212F, T213A, Y214F, A215N, A215D, A215E, A215H, A215F, S216F, S216A, L217E, L217N, L217D, N218D, N218P, N218E, T224A, T224G, V227I, A230E, A231I, A231C, A232V, L233C, V234F, K235F, Q236F, Q236N, Q236H, N238R, N238K, N238L, P239K, P239G, P239R, P239R, P239H, P239T, P239N, P239S, P239F, S240R,

W241R, S242L, S242R, N243F, N243R, V244R, Q245R, I246S, N248D, N248V, N248I, N248R, H249R, H249T, L250I, K251R, K251S, N252I, N252F, N252R, N252K, N252H, T253I, T253R, T253F, A254C, S256N, G258R, T260V, T260I, L262D, L262H, Y263F, S265F, L267V, L267N, L267M, N269I, N269R, A270C, E271I, E271H, E271V, E271H, E271M, E271L, E271P, E271A, E271F, E271T, A272F, A272F, A272R, A273F, A273I, e T274G, sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1 como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000293] A presente invenção fornece, adicionalmente, polipeptídeos que compreendem variantes de protease da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, sendo que a protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* compreende a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:2, e sendo que a variante de protease compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, ou 50 mutações selecionadas do grupo de A1R, Q2S, V4R, V4S, S9A, R10S, P14K, A16S, H17R, N18R, G20R, T22A, T22R, S24R, S24W, G25R, G25V, V26F, L42I, N43R, N43A, G46R, P52F, P52E, P52N, T57R, Q59A, N62E, N62Q, V68A, V68C, T71G, I72C, A74C, L75A, L75F, L75R, N76D, S78R, L82R, P86W, E89P, E89T, E89G, E89H, E89I, E89V, E89W, Y91N, K94N, G100S, S101A, S101N, S101G, S101D, S103G, S103N, V104L, V104I, S106V, S106G, A108I, L111V, E112V, G115K, G115R, N117F, G118I, V121F, S128D, S128F, S128L, S128N, P129E, S144R, L148I, A158E, G159E, S160D, S166D,

N185E, N185I, R186H, S188E, S188D, D197F, V203E, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, P210R, S212I, S212F, Y214F, A215N, A215D, A215E, L217E, L217N, T224A, A230E, A231I, Q236F, N238R, N238K, P239K, P239G, P239R, P239S, W241R, S242R, S242L, N243R, V244R, N248I, N248V, H249R, L250I, N252R, T253R, L262D, Y263F, S265F, L267V, L267N, N269I, N269R, E271F, E271I, E271H, E271P, E271T, E271V, E271L e A272F, e compreende, opcionalmente, pelo menos uma mutação selecionada a partir do grupo de S103A, G159D, Q236H, Q245R, N248D e N252K, sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000294] A presente invenção fornece, adicionalmente, polipeptídeos que compreendem variantes de protease da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, sendo que a protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* compreende a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:2, e sendo que a variante de protease compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, ou 50 mutações selecionadas do grupo de A1R, Q2S, V4R, V4S, S9A, R10S, P14K, A16S, H17R, N18R, G20R, T22A, T22R, S24R, S24W, G25R, G25V, V26F, L42I, N43R, N43A, G46R, P52F, P52E, P52N, T57R, Q59A, N62E, N62Q, V68A, V68C, T71G, I72C, A74C, L75A, L75F, L75R, N76D, S78R, L82R, P86W, E89P, E89T, E89G, E89H, E89I, E89V, E89W, Y91N, K94N, G100S, S101A, S101N,

S101G, S101D, S103G, S103N, V104L, V104I, S106V, S106G, A108I, L111V, E112V, G115K, G115R, N117F, G118I, V121F, S128D, S128F, S128L, S128N, P129E, S144R, L148I, A158E, G159E, S160D, S166D, N185E, N185I, R186H, S188E, S188D, D197F, V203E, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, P210R, S212I, S212F, Y214F, A215N, A215D, A215E, L217E, L217N, T224A, A230E, A231I, Q236F, N238R, N238K, P239K, P239G, P239R, P239S, W241R, S242R, S242L, N243R, V244R, N248I, N248V, H249R, L250I, N252R, T253R, L262D, Y263F, S265F, L267V, L267N, N269I, N269R, E271F, E271I, E271H, E271P, E271T, E271V, E271L e A272F, e compreende, opcionalmente, pelo menos uma mutação selecionada a partir do grupo de S103A, G159D, Q236H, Q245R, N248D e N252K, sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000295] A presente invenção fornece, adicionalmente, polipeptídeos que compreendem variantes de protease da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, sendo que a protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* compreende a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:2, sendo que a variante de protease compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, ou 50 mutações selecionadas do grupo de A16S, T22A, S24R, N62E, N76D, E89P, S101A/G, S103G/A, V104L/I, L111V, S128N, P129E, A232V, L148I, A158E, G159D/E, R186H, S188D, Y209E,

Q236H, Q245R, N248D/R, H249R, N252K/R, T253R, E271F, A1R, A230E, E271L, G115R, G20R, H249R, K235F, K27V/F/L, L75E, L82R, N18R, N269R, N43D, N43R, N76D, R45T, S212F, S242R, S24R, S78R, S9A, T22R, V121E, V244R, V28E, V30E, V4R, e W241R, e sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1 como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000296] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de protease de protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, sendo que a protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* compreende a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:2, sendo que a variante de protease compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou 25 mutações selecionadas do grupo de G20K, G20R, G23A, S24F, S24R, N43R, N43W, R45T, N62E, N76D, S101A, N116A, N116L, G118R, S128I, P129E, S188D, T213A, A215F, L217E, P239G, e N269R, sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1 como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000297] A presente invenção fornece, adicionalmente, polipeptídeos que compreendem variantes de protease da protease subtilisina GG36

de *Bacillus lentus*, sendo que a protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* compreende a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:2, e sendo que a variante de protease compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 mutações selecionadas do grupo de A16S, T22A, S24R, N62E, N76D, E89P, S101A/G, S103G/A, V104L/I, L111V, S128N, P129E, A232V, L148I, A158E, G159D/E, R186H, S188D, Y209E, Q236H, Q245R, N248D/R, H249R, N252K/R, T253R, E271F, A1R, A230E, E271L, G115R, G20R, H249R, K235F, K27V/F/L, L75E, L82R, N18R, N269R, N43D, N43R, N76D, R45T, S212F, S242R, S24R, S78R, S9A, T22R, V121E, V244R, V28E, V30E, V4R, e W241R, sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000298] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de protease que compreendem uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2, e sendo que a carga líquida total da variante de protease é 0, +1, +2, +3, +4, +5, -1, -2, -3, -4, ou -5 em relação à carga líquida total da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, e sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da

variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000299] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de protease que compreendem uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2, e sendo que a carga líquida total da variante de protease é 0 em relação à carga líquida total da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, e sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000300] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de protease que compreendem uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2, sendo que as variantes de protease são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020R-N043R, G020K-N062E, S024F-N116L, G020K-S024F, S024R-A174T, S024R-G118R, S024R-K235F, S024R-P086R, S024R-P086W, S078R-G118R, T033S-G118R, T033S-K235F, Y209A-W241R, G020R-N076D, N018R-Q245R, S024R-R045T, A232V-Q245R, G118R-A172V, G118R-A194T, I008T-S024R, K235F-N243F, N018R-S103A, N018R-V104I, P086W-G118R, P086W-N243F, P086W-Y209A, S024C-T033S, S024R-A232V, S024R-N243F, S024R-P239Q, S024R-S101G, S024R-S141G, S024R-T033S, S024R-T274I, S024R-Y209A, S078R-P086W, S101G-A232V, T033S-L148F, T033S-P086W, T033S-P201S, T033S-S078R, T033S-W241R, T033S-Y209A, A230E-H249R, A232V-H249R,

G118R-K235F, N076D-Q245R, P086W-K235F, S024R-R247H, S024R-V104A, S078R-K235F, S101G-H249R, S103A-A232V, T033S-A048T, T033S-P239T, T033S-T253A, T143A-Y209A, Y209A-K235F, N018R-R045T, Y209A-N243F, S024R-A272P, S024R-R269C, S101G-V104I, V104I-A232V, N076D-H249R, e S024R-N076D, e sendo que a carga líquida total da variante de protease é 0, +1, +2, +3, +4, +5, -1, -2, -3, -4, ou -5 em relação à carga líquida total da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, e sendo que a carga líquida total é obtida por uma ou mais substituições selecionadas a partir de: N43D, R45T, N62E, N76D, S101D, P129E, A158E, G159D, G159E, S166D, S188D, A230E, N18R, G20K, G20R, T22R, S24R, N43R, G118R, Q245R, H249R, N269R, E271F, e E271L, e sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000301] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de protease que compreendem uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 sendo que as variantes de protease são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020R-N076D, S024R-R045T, A230E-H249R, N018R-R045T, N018R-Q245R, S101G-A232V, S024R-A232V, A232V-Q245R, S024R-S101G, N018R-V104I, N018R-S103A, S101G-H249R, A232V-H249R, S103A-A232V, N076D-Q245R, S101G-V104I, V104I-A232V, N076D-H249R, S024R-N076D, S024F-N116L, G020K-S024F, G020K-N062E, T033S-G118R, S024R-P086W, S024R-G118R, S024R-P086R, Y209A-W241R,

S024R-W241R, S024R-K235F, G118R-Y209A, S078R-G118R, T033S-K235F, S024R-A174T, P086W-Y209A, I008T-S024R, P086W-G118R, T033S-W241R, S024R-N243F, S024R-Y209A, T033S-P086W, S024R-T033S, P086W-N243F, T033S-P201S, S024R-P239Q, S078R-P086W, K235F-N243F, G118R-A172V, T033S-L148F, T033S-S078R, T033S-N243F, S024C-T033S, G118R-A194T, T033S-Y209A, S024R-S141G, S024R-T274I, P086W-K235F, A015T-T033S, Y209A-K235F, S024R-R247H, S078R-K235F, S024R-V104A, T033S-A048T, G118R-K235F, T033S-T253A, T143A-Y209A, T033S-P239T, Y209A-N243F, S024R-A272P, e S024R-R269C, e sendo que a carga líquida total da variante de protease é 0, +1, +2, +3, +4, +5, -1, -2, -3, -4, ou -5 em relação à carga líquida total da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, e sendo que a carga líquida total é obtida por uma ou mais substituições selecionadas a partir de: N43D, R45T, N62E, N76D, S101D, P129E, A158E, G159D, G159E, S166D, S188D, A230E, N18R, G20K, G20R, T22R, S24R, N43R, G118R, Q245R, H249R, N269R, E271F, e E271L, e sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000302] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de protease que compreendem uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2, sendo que as variantes de protease são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020K-G023A-N043W-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D, G020K-

G023A-N062E-N116L, G020K-G023A-N062E-N116L-S188D, G020K-G023A-N062E-N116L-S188D-T213A, G020K-G100S-N116L-A158E-S166D-N243F, G020K-N043W-N062E-N116L-S188D, G020K-N062E, G020K-N062E-N116L, G020K-N062E-N116L-S188D, G020K-N062E-N116L-T213A, G020K-N062E-S188D-T213A, G020K-S024F-N062E-N116L-G118R-S188D, G020K-S024F-N062E-N116L-S188D, G020K-S024F-N062E-S188D-T213A, G023A-N062E-N116L-S188D, G023A-S024F-N062E-N116L-T213A, N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N043R-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, N043W-N062E-N116L, N043W-S101D-S212M-N243F, N062E-N116L-G118R-S188D, N062E-N116L-G118R-T213A, N062E-N116L-S188D-T213A, S024F-G118R-S128I-P129E-G159D, S024F-N062E-N116L-S188D, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-S130A-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101D-S103N-N116L-S144R-A215D, S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-N043R-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-

E271F, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-N043R-S103A-V104I-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-L217E-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022L-T038F-A048R-N062E-G100S-R186K, T033S-N043W-N218D-P239G-N243F, V026F-A048R-S105T-T213A-N218D-T224A, V026F-L031F-S078N-G102A-S160D, V026F-V051W-V104L-S106E, V104L-S105T-T213A-L217E-S256N, A016S-N062E-A158E-H249R, A016S-N062E-A158E-R186H-E271F, A016S-N062E-A158E-R186H-H249R, A016S-N062E-V104L-A158E-R186H-E271F, A016S-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, G020K-G023A-N062E-S188D, G020K-G023A-S024F-N062E-G118R-S188D-T213A, G020K-N043W-N062E-N116L-S188D-T213A-P239G, G020K-S024F-N062E-S188D-P239G, G023A-N062E-N116L-G118R, G023A-N062E-N116L-G118R-S188D-P239G, G023A-S024F-N062E-N116L-G118R, H017R-T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N062E-A158E-G159E-H249R, N062E-A158E-H249R, N062E-A158E-R186H-E271F, N062E-A158E-R186H-H249R, N062E-A158E-R186H-H249R-E271F, N062E-A158E-S188D-H249R, N062E-A158E-S188D-H249R-E271F, N062E-G159E-H249R, N062E-G159E-H249R-E271F, N062E-G159E-R186H-H249R, N062E-G159E-S188D-H249R, N062E-R186H-S188D-H249R-E271F, N062E-S101A-A158E-H249R, N062E-S101A-A158E-R186H-E271F, N062E-S101A-A158E-R186H-H249R-E271F, N062E-S101A-G159E-H249R, N062E-S101A-R186H-H249R, N062E-S101A-S188D-H249R, N062E-S101A-S188D-H249R-E271F, N062E-S101A-V104L-A158E-R186H-E271F, N062E-S128N-A158E-G159E-

E271F, N062E-V104L-A158E-S188D-H249R-E271F, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-M222Q-Q245R, S024F-N062E-N116L-P239G, S024F-N062E-S188D-T213A, S024F-N116L, S024R-N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-Q245R-N248D, S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-

H249R, S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F-E271F, S101A-S103A-V104L-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S128N-A158E-R186H-E271F, S101A-S128N-A158E-Y209E-H249R, S101A-V104L-A158E-R186H-S188D-H249R, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-M222Q-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-M222S-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-A232V-M222Q-Q245R, S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103G-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103S-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103G-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103G-V104V-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S128N-A158E-G159E-E271F, S128N-A158E-H249R, S128N-A158E-R186H-E271F, S128N-A158E-R186H-H249R, S128N-A158E-R186H-S188D-E271F, S128N-A158E-S188D-E271F, S128N-A158E-S188D-H249R, S128N-A158E-S188D-Y209E-E271F, S128N-A158E-Y209E-, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-N062E-A158E, T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-

Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D, T022A-S024R-S103A-V104I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-

A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S128N-A158E-H249R, V104L-S128N-A158E-H249R, V104L-S128N-A158E-R186H-E271F, V104L-S128N-A158E-R186H-H249R, e V104L-S128N-A158E-S188D-H249R, e sendo que a carga líquida total da variante de protease é 0, +1, +2, +3, +4, +5, -1, -2, -3, -4, ou -5 em relação à carga líquida total da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, e sendo que a carga líquida total é obtida por uma ou mais substituições selecionadas a partir de: N43D, R45T, N62E, N76D, S101D, P129E, A158E, G159D, G159E, S166D, S188D, A230E, N18R, G20K, G20R, T22R, S24R, N43R, G118R, Q245R, H249R, N269R, E271F, e E271L, e sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000303] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de protease que compreendem uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 sendo que as variantes de protease são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: A016S-N062E-A158E-H249R-E271F, A016S-N062E-S128N-R186H-E271F, A016S-N062E-V104L-R186H-S188D-E271F, A016S-S101A-S128N-R186H, A016S-S128N-A158E-R186H, A016S-V104L-A158E-R186H-E271F, A016S-V104L-S188D-H249R, A158E-R186H-H249R, A158E-

R186H-S188D-H249R-E271F, G020K-G023A-N116L-S188D, G020K-G023A-S024F-N062E-N116L-S188D-T213A, G020K-N043W-N062E-N116L-P239G, G020K-S024F-N043W-N062E-N116L-T213A, G020K-S024F-N062E, G023A-N043W-N062E-N116L-G118R-T213A, G023A-T038F-S078N-G100S-S212M-A215D, G100S-N116L-A158E-T213A, G102A-S103N-S105T-A194E, H017R-T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N043R-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, N043W-N062E-N116L-S188D, N062E-A158E-H249R-E271F, N062E-A158E-R186H-S188D-H249R, N062E-L148I-G159E, N062E-N116L-S188D, N062E-R186H-H249R, N062E-S078N-G102A-N116L-S144R-L250I, N062E-S101A-A158E-R186H-H249R, N062E-S101A-A158E-S188D-H249R, N062E-S101A-R186H, N062E-S101A-R186H-E271F, N062E-S101A-R186H-H249R-E271F, N062E-S101A-R186H-S188D-E271F, N062E-S101A-R186H-S188D-H249R, N062E-S101A-V104L-R186H-S188D-E271F, N062E-S128N-A158E, N062E-S128N-G159E-H249R, N062E-S188D-P239G, N062E-V104L-G159E-H249R, N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N076D-S101G-S103A-V104I-A114V-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-M222S-Q245R, S024F-A048R-G118R-S166D-L217E, S024F-N062E-N116L, S024F-N062E-N116L-T213A-P239G, S024F-N062E-S188D-P239G, S024F-S101D-G118R-A215D-L250I-A272F, S024R-K027R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S024R-S101G-S103A-V104I-

A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S078N-V104L-G118R-S128D, S101A-A158E-R186H-H249R, S101A-A158E-R186H-S188D-H249R, S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S101A-S103G-A158E-R186H-H249R, S101A-S103S-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103S-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S128N-A158E-H249R, S101A-S128N-A158E-S188D-Y209E-E271F, S101A-S128N-A158E-Y209E, S101A-S128N-P129E-R186H-H249R, S101A-V104L-A158E-R186H-H249R, S101A-V104L-A158E-R186H-S188D-E271F, S101A-V104L-S128N-A158E-R186H-E271F, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S101G-S103A-V104I-

A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-A232V-M222S-Q245R, S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S128L-S130A-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-N183D-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104L-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103S-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103S-V104V-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-N043R-N062E-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-S101D-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-N043R-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D, T022A-N043R-S103A-V104I-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-

E271F, T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S024R-N043R-S101D-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-N043R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F, T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-S128I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S024R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F, T022A-S024R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101A-A158E-R186H-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-N248D, T022L-L031F-G102A-S128D-T224A-

N243F, T022L-T038F-V121F-S160D-A272F, V026F-S078N-G159C-R186K-N243F, V104L-A158E-H249R, V104L-A158E-R186H-H249R, V104L-A158E-R186H-H249R-E271F, V104L-A158E-R186H-S188D-H249R, V104L-A158E-R186H-S188D-H249R-E271F, V104L-A158E-S188D-H249R-E271F, V104L-S128N-A158E-R186H-S188D-E271F, V104L-S128N-G159E-E271F, V104L-S128N-R186H-S188D-H249R, e V121F-N185E-T224A-P239G, e sendo que a carga líquida total da variante de protease é 0, +1, +2, +3, +4, +5, -1, -2, -3, -4, ou -5 em relação à carga líquida total da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, e sendo que a carga líquida total é obtida por uma ou mais substituições selecionadas a partir de: N43D, R45T, N62E, N76D, S101D, P129E, A158E, G159D, G159E, S166D, S188D, A230E, N18R, G20K, G20R, T22R, S24R, N43R, G118R, Q245R, H249R, N269R, E271F, e E271L, e sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000304] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de protease que compreendem uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 sendo que as variantes de protease são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: A016S-S128N-R186H-E271F, N076D-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-M222S-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-

Q245R-N248D-H249R-E271G, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-S130A-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, T022A-S101G-G102A-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, A016S-A158E-H249R, A016S-A158E-H249R-E271F, A016S-A158E-R186H-H249R, A016S-L111V-S188D-, A016S-T022A-A158E-R186H-E271F, A048R-S078N-N116L-N185E-L217E-P239G, A048R-S128D-N185E-P239G, A158E-R186H-H249R-E271F, E089P-S101A-P129E-R186H, G020K-G023A-N043W-N116L-S188D-T213A-P239G, G020K-G023A-N062E-N116L-G118R-T213A, G020K-G023A-S024F-N062E-S188D-T213A-P239G, G020K-K027R-P129E-S166D-P239G, G020K-S024F-N062E-P239G, G020K-S024F-T033S-P129E-A194E, G023A-G100S-A194E-S212M, G023A-N043W-N116L-G118R-S188D, G023A-S024F-G118R-S188D-P239G, G023A-S024F-K027R-N062E, G023A-S024F-N043W-N062E-N116L-G118R, G023A-S024F-N116L-G118R-S188D-T213A, G023A-S024F-N116L-S188D-P239G, K027R-G100S-G118R-S160D-S188D-N243F, K027R-S101D-S103N-S105T-A272F, N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, N062E-S078N-N116L-T224A, N062E-V104L-A158E-R186H-S188D-H249R, N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N076D-S101G-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S024F-G102A-R186K-T213A-L217E-N243F, S024F-N043W-G118R-S188D, S024F-N043W-V104L-V121F-P129E, S024F-N116L-G118R-S188D-P239G, S024F-S103N-V104L-G118R-S188D, S024R-N043R-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-N043R-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-

Q245R-N248D-H249R-E271F, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S101A-L111V-P129E, S101A-S103A-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103S-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-V104L-S128N-A158E-R186H, S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-S188D-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103S-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103A-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S128N-P129E-R186H, T022A-A158E-R186H-H249R-E271F, T022A-S024K-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S103A-V104I-S128I-G159D-S188D-A232V-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-L148I-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-G159E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S128N-A158E-R186H, T022A-S128N-R186H-S188D-, T022A-V104L-A158E-H249R, T022A-V104L-R186H-S188D-H249R, T022L-G023A-K027R-S101D-V104L-S216F, T022L-S078N-N116L-P129E-S256N, T022L-S078N-S128D-T213A, T033S-G118R-P129E-A194E-P239G, T033S-S105T-S188D-S216F, V026F-V104L-S256N-A272F, T022A-N043R-S103A-V104I-S128I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D, T022A-S101D-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-

N248D-E271F, T022A-S103A-V104I-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-L148I-G159E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, V104L-L148I-S188D-H249R, S024R-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, N076D-S101G-S103A-V104I-S128L-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, T022A-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S101A-S103G-V104V-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103A-V104V-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, G023A-S024F-V051W-A158E, K027R-T038F-G102A-N116L, N062E-S078N-S144R-S212M, L031F-N116L-S256N-A272F, T022L-T033S-V104L-N116L-S160D-R186K, S024F-G118R-P129E-R186K-T213A, N043W-S105T-T213A-A215D-S216F, L031F-S105T-R186K-S188D, V026F-A194E-T213A-S256N, S103N-S160D-L250I-S256N, S024R-S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-N062E-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-N043R-S101D-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-L217D-A232V, T022A-S024R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D, T022A-S024R-N043R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F, T022A-S103A-V104I-

G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F, G020K-N043W-S188D-T213A, S024F-N062E-G118R-P239G, G023A-N043W-S188D-T213A, G020K-S024F-N043W-N062E-N116L-G118R-S188D-P239G, G020K-N116L-S188D-P239G, G020K-N043W-N062E-G118R, G020K-N043W-N116L-S188D-T213A, G020K-S024F, G023A-N043W-N116L-P239G, G023A-S024F-N043W-N116L-G118R-S188D-P239G, G020K-G023A-N043W-T213A, e G023A-S024F-N062E-G118R-T213A-P239G, e sendo que a carga líquida total da variante de protease é 0, +1, +2, +3, +4, +5, -1, -2, -3, -4, ou -5 em relação à carga líquida total da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, e sendo que a carga líquida total é obtida por uma ou mais substituições selecionadas a partir de: N43D, R45T, N62E, N76D, S101D, P129E, A158E, G159D, G159E, S166D, S188D, A230E, N18R, G20K, G20R, T22R, S24R, N43R, G118R, Q245R, H249R, N269R, E271F, e E271L, e sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000305] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de protease que compreendem uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2, sendo que as variantes de protease são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G118R-Y209A, G118R-Y209A-N243F, L021M-S024R-T033S, P005S-S078R-G118R-W241R, P086W-G118R-A133V, P086W-G118R-N243F, P086W-G118R-Y209A, P086W-Y209A-N243F, S024R-A174T,

S024R-G118R, S024R-G118R-Y209A, S024R-G118R-Y209A-K235F, S024R-G118R-Y209A-N243F, S024R-K235F, S024R-P086R, S024R-P086S-S141G, S024R-P086W, S024R-P086W-G118R, S024R-P086W-G118R-V203I, S024R-P086W-N243F, S024R-P086W-Y209A, S024R-S078R-P086W, S024R-S078R-P086W-G118R-A270T, S024R-S078R-P086W-N243F, S024R-T033S-A133V, S024R-T033S-G118R, S024R-T033S-P086S-S085N-K235F, S024R-T033S-P086S-S087N-Y209A, S024R-T033S-P086W, S024R-T033S-P086W-G118R, S024R-T033S-S078R-P086W, S024R-T033S-S078R-P086W-G118R, S024R-T033S-S078R-Y209A, S024R-T033S-W241R, S024R-T033S-Y209A-K235F, S024R-Y209A-W241R, S078R-G118R, S078R-P086W-K235F, S078R-P086W-N243F, S078R-P086W-Y209A, S078R-Y209A-K235F, T033S-A172V-Y209A, T033S-G118R, T033S-G118R-G159D-Y209A, T033S-G118R-N243F, T033S-G118R-W241R, T033S-G118R-Y209A-N243F, T033S-K235F, T033S-P086W-G118R, T033S-P086W-G118R-Y209A-N243F, T033S-P086W-N243F, T033S-S078R-P086W, T033S-S078R-P086W-G118R-Y209A, T033S-S078R-Y209A, T033S-Y209A-N243F, Y209A-W241R, A001R-S009A-N043R, A001R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, A001T-N018R-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R, A194F-G211Q-Q236N, E089I-N116A-N117F-T224A-H249R, G020R-G025R-N116A-Y167W, G020R-H249R-N269R, G020R-N043D-N076D-A230E-H249R, G020R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-N043R-A230E, G020R-N043R-A230E-S242R, G020R-N043R-E271L, G020R-N043R-H249R, G020R-N043R-H249R-E271L, G020R-N043R-N269R, G020R-N043R-R045T-A230E, G020R-N043R-R045T-S101A-N269R, G020R-N043R-R045T-S242R, G020R-N043R-S101A-N116A-T213A-A215F, G020R-N043R-S101A-N269R, G020R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-N043R-S212F, G020R-

N043R-S212F-W241R, G020R-N043R-S242R, G020R-N043R-S242R-E271L, G020R-N043R-S242R-H249R, G020R-N043R-V244R, G020R-N043R-W241R, G020R-N062Q-E089I-R186K-S212M, G020R-N076D, G020R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-N116A-N269R, G020R-P052N-N062Q-Y091F-Y192W, G020R-Q059A-S144R-Y192W-T224A, G020R-S024R-K27E-N043R-N076D-A230E, G020R-S024R-N043D-H249R, G020R-S024R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S024R-N043D-S242R, G020R-S024R-N043R-R045T, G020R-S024R-N043R-R045T-H249R, G020R-S024R-N043R-R045T-N116A, G020R-S024R-N043R-R045T-N116A-T213A, G020R-S024R-N043R-R045T-S101A-N269R, G020R-S024R-N043R-R045T-S101A-T213A, G020R-S024R-N043R-S242R, G020R-S024R-N076D-H249R, G020R-S024R-N116A, G020R-S024R-N116A-A215F, G020R-S024R-N116A-T213A, G020R-S024R-N116A-T213A-A215F, G020R-S024R-P052N-Q059A-S216F, G020R-S024R-R045T-A230E-S242R, G020R-S024R-R045T-N116A-N269R, G020R-S024R-R045T-N269R, G020R-S024R-S101A-A215F, G020R-S024R-S101A-N116A, G020R-S024R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R-H249R, G020R-S024R-S242R-H249R, G020R-S024R-T213A, G020R-S024R-T213A-A215F, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-G211Q-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, G020R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101A-N116A-N269R, G020R-S101A-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104I-G118R-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104L-

A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104V-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103S-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103S-V104V-A232V-Q245R, G020R-S101G-I198L-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-S101G-S103A-V104I-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104L-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104V-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103G-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103S-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103S-V104L-A232V-Q245R, G020R-S101G-V104I-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103A-V104V-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103G-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103G-V104V-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103S-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103S-V104L-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103S-V104V-A232V-Q245R, G020R-S103N-S216F-Q236N-N252R, G020R-S144R-N185I-L233C-Q236N, G020R-S212F-H249R, G020R-S242R-N269R, G020R-T022R-E271L, G020R-T022R-N043R, G020R-T022R-N043R-S212F, G020R-T022R-N043R-W241R, G020R-T022R-S024R-S242R, G020R-T022R-S078R-S242R, G020R-T022R-S078R-W241R, G020R-T022R-S212F-W241R, G020R-T022R-S242R, G020R-T022R-W241R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116S-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-

S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-I198L-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-T038A-N043R-S101A, G020R-T22W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V, G020R-T22W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, G020R-T22W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-T22W-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T22W-S101G-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R, G020R-T22W-S103A-V104I-A232V-Q245R, G023A-P052N-S144R-Y192W-S216F, G023A-P052N-Y192W-I198L-N252R, G023A-S024R-N117F-S212M-S216F, G023A-S078R-S216F-Q236N-H249R, G023A-Y091F-S101A-I198L-N252R, G023A-Y091F-V121F-Y192W-Q236N, G025R-E089I-N116A-P239S-A270C, G025R-G046R-V121F, G025R-N043A-E089I-N117F, G025R-S103N-R186K-A194F-T224A, G046R-A194F-S212M, G046R-E089I-Y091F-S101A-N116A, G046R-E089I-Y192W-L233C-A270C, G046R-N183D-N238L, G046R-Q059A-S103N-G211Q-S212M, G046R-Q059A-S106G-L217E-H249R, L148I-T213A-N252R, N018R-G020R-N043D, N018R-G020R-N043D-A230E-S242R, N018R-G020R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-N043D-R045T-A230E, N018R-G020R-N043R-N076D-H249R, N018R-G020R-N043R-N076D-

S242R-H249R, N018R-G020R-N043R-R045T-S242R, N018R-G020R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-R045T, N018R-G020R-S024R-N043D-R045T-L233I-S242R, N018R-G020R-S024R-N043R-R045T-N076D-A230E, N018R-G020R-S024R-N076D-S087D-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-V150L-H249R, N018R-G020R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N018R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-N043R-N076D-A230E, N018R-N043R-R045T-H249R, N018R-N043R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N043R-R045T-S242R-H249R, N018R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-N043R-S242R-H249R, N018R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N076D-S101G-V104I-A232V-Q245R, N018R-Q245R, N018R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N043D-A230E, N018R-S024R-N043D-N076D-H249R, N018R-S024R-N043D-N076D-H249R-N269R, N018R-S024R-N043D-N076D-S078R-H249R, N018R-S024R-N043D-R045T-H249R, N018R-S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N043R-N076D-H249R, N018R-S024R-N043R-N076D-H249R-N269R, N018R-S024R-N043R-N076D-S087D-H249R, N018R-S024R-N043R-N076D-V150L-H249R, N018R-S024R-N076D-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-G211Q-T213A-

A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-H249R, N018R-S024R-N076D-H249R-N269R, N018R-S024R-N076D-N116A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S078R-H249R, N018R-S024R-N076D-S078R-S087D-H249R, N018R-S024R-N076D-S078R-V150L-H249R, N018R-S024R-N076D-S087D-H249R-N269R, N018R-S024R-N076D-S087D-S242R-H249R, N018R-S024R-N076D-S087D-V150L-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-A215V-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101G-V104I-A232V-H249R, N018R-S024R-N076D-S242R-H249R, N018R-S024R-N076D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-V104I-H249R, N018R-S024R-N076D-V150L-H249R, N018R-S024R-R045T-S242R, N018R-S024R-S101G-V104I, N018R-S024R-S101G-V104I-A232V, N018R-S024R-S242R, N018R-S024R-V104I-H249R, N018R-S024R-V244R, N018R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S101G-Q245R, N018R-S101G-S103A-H249R, N018R-S101G-S103A-Q245R, N018R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, N018R-S101G-V104I-A232V-H249R, N018R-S101G-V104I-A232V-Q245R, N018R-S101G-V104I-H249R, N018R-S103A-A232V-H249R, N018R-S103A-V104I-H249R, N018R-T022R-S024R-N043D-N076D-H249R, N018R-T022R-S024R-N043R-N076D-H249R, N018R-T022R-S024R-N076D-H249R, N018R-T022R-S024R-N076D-S087D-H249R, N018R-T022R-S024R-N076D-V150L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-H249R, N018R-

T022W-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-A232V-Q245R, N018R-T22K-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-N116A-A232V-Q245R, N018R-V104I-A232V-H249R, N043A-N062Q-A194F-G211Q, N043A-T057R-N117F-S144R-N183D, N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043D-R045T-N076D-H249R, N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-N076D-S242R-H249R, N043R-N116A-N269R, N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-S101A-N116A-A215F-N269R, N043R-S101A-N116A-N269R, N043R-S101A-N116A-T213A-A215F-N269R, N043R-S101A-N269R, N043R-S101A-T213A-N269R, N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-E271L, N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-S242R-Q245R, N043R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, N043R-S242R-H249R, N043R-T213A-A215F-N269R, N062Q-S103N-N117F-A194F, N062Q-S103N-V121F-S144R-H249R, N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R,

N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N076D-S103A-V104I-Q109R, N076D-S103A-V104I-Q109R-Q245R, N076D-S103A-V104I-S212P-E271V, N076D-S103A-V104I-S212P-Q245L-E271V, N076D-S87R-S103A-V104I-S212P-E271V, N117F-A194F-T213A-A270C, N117F-T213A-A215F, P052N-S078R-S103N-L148I-T213A, P052N-S103N-N116A-L148I-Y192W, R019H-G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R, R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S009A-G020R-N043R-S212F, S009A-G020R-N043R-W241R, S009A-G020R-S024R-N043R, S009A-N043R-S078R, S009A-N043R-S078R-S242R, S009A-N043R-S212F, S009A-N043R-W241R, S009A-T022R-N043R-S078R, S009A-T022R-S078R-S212F, S009A-T022R-S078R-S212F-W241R, S009A-T022R-S212F-W241R, S024R-A215F-N269R, S024R-A232V-Q245R, S024R-G025R-N183D-Y192W-P239S, S024R-N043A-N117F-A194F-G211Q, S024R-N043D-H249R, S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-N043R-A215F, S024R-N043R-A230E, S024R-N043R-A230E-S242R, S024R-N043R-H249R, S024R-N043R-N076D-H249R, S024R-N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-N043R-N116A-A215F, S024R-N043R-N116A-A215F-N269R, S024R-N043R-N116A-N269R, S024R-N043R-N116A-T213A-N269R, S024R-N043R-R045T-N076D-A230E-H249R, S024R-N043R-R045T-N269R, S024R-N043R-R045T-S101A-N116A-A215F-N269R, S024R-N043R-R045T-S101A-N116A-T213A-N269R, S024R-N043R-R045T-S242R, S024R-N043R-R045T-T213A-A215F-N269R, S024R-N043R-S101A-A215F, S024R-N043R-S101A-A215F-N269R, S024R-N043R-S101A-N116A, S024R-N043R-S101A-N116A-A215F-N269R, S024R-N043R-S101G-S103A-

V104I-A232V-Q245R, S024R-N043R-S242R, S024R-N062Q-V104L-S106G-H249R, S024R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-N076D-V104I-A232V-Q245R, S024R-N116A-T213A-N269R, S024R-R045T, S024R-R045T-N076D-A230E-S242R-H249R, S024R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-S078R-S212F, S024R-S078R-V104L-N116A-N183D, S024R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-S101A-H120F-A194F-H249R, S024R-S101A-N269R, S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, S024R-S101G-V104I-Q245R, S024R-S103A-Q245R, S024R-S103A-V104I-A232V-H249R, S024R-S103A-V104I-H249R, S024R-S103A-V104I-Q245R, S024R-Y167W-T224A-H249R, S078R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S078R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, S078R-S103N-S106G-Y167W-Q236N, S078R-V104L-T213A-A215F-T224A, S078R-Y091F-V121F-L233C-N252R, S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S087R-S101G-S103A-V104I-Q109R-S212P-A232V-Q245R-E271V, S099F-S144R-Y167W-N252R, S101A-H120F-Y192W-A215F-T224A, S101A-S103A-V104I-T213A-A232V-Q245R-N269R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-E271L, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S101G-S103A-V104I-A232V-S242R-Q245R, S101G-S103A-V104I-A232V-V244R-Q245R, S101G-S103A-V104I-G115R-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-N116A-T213A-A232V-Q245R-N269R, S101G-S103A-V104I-Q109R-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-Q109R-S212P-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-Q109R-S212P-A232V-Q245R-E271V, S101G-S103A-V104I-S212F-A232V-

Q245R, S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R-H249R, S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R-N269R, S105T-S128N-S144R-L148I-S212M, S106G-N117F-N238L, S144R-G211Q-N238L-P239S-H249R, T022R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, T022R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, T022R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, T022R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, T022W-S078R-Y167W-S212M-A270C, T057R-E089I-I198L, T057R-S099F-S105T-I198L-T213A, T057R-S099F-V121F-N185I-Y192W, T057R-Y167W-H249R, V004R-G020R-H249R, V004R-G020R-N043R, V004R-G020R-S024R, V004R-G020R-S024R-H249R, V004R-G020R-S024R-N043R, V004R-G020R-S024R-N043R-S242R, V004R-G020R-S024R-V244R, V004R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, V004R-S009A-G020R-N043R, V004R-S009A-G020R-N043R-S242R, V004R-S009A-G020R-S024R-S242R, V004R-S009A-G020R-S242R, V004R-S009A-N043R-W241R, V004R-S009A-S024R-N043R-W241R, V004R-S009A-S078R-W241R, V004R-S009A-W241R, V004R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, V104L-L217E-T224A-H249R-N252R, V104L-T213A-S216F, V121F-N252R-A270C, e Y091F-S099F-S101A-S105T-Y167W, e sendo que a carga líquida total da variante de protease é 0, +1, +2, +3, +4, +5, -1, -2, -3, -4, or -5 em relação à carga líquida total da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, e sendo que a carga líquida total é obtida por uma ou mais substituições selecionadas a partir de: N43D, R45T, N62E, N76D, S101D, P129E, A158E, G159D, G159E, S166D, S188D, A230E, N18R, G20K, G20R, T22R, S24R, N43R, G118R, Q245R, H249R, N269R, E271F, e E271L, e sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequência de

aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000306] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de protease que compreendem uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2, sendo que as variantes de protease são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S101G-S103A-V104I-A232V-Q236H-Q245R-N252K, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248R, S101G-S103A-V104I-G159R-A232V-Q245R-N248D, A232V-Q245R, E089I-N117F-N185I-A215F-L233C, G020R-E089I-L217E, G020R-G023A-V104L-Y192W-L233C, G020R-N043D-R045T-N076D-S242R-H249R, G020R-N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, G020R-N043R-N076D-A230E-H249R, G020R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-N116A-A215F-N269R, G020R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, G020R-R045T-N116A-N269R, G020R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S024R-A215F, G020R-S024R-K27R-N043D-S242R-H249R, G020R-S024R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-S024R-N043R-N076D, G020R-S024R-N043R-R045T-A215F, G020R-S024R-N043R-R045T-N076D-S242R-H249R, G020R-S024R-N043R-R045T-N116A-T213A-A215F, G020R-S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S024R-T38I-N043R-R045T-N076D-S242R-H249R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R,

G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-A215F-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N183D-A215F-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-A131V-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R-E271G, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-T180A-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104I-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103G-V104V-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-G211Q-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N183D-G211Q-A232V-Q245R-, G020R-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S242R-H249R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-I198L-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-I198L-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-A232V-Q245R,

G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-I198L-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-A114T-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N183D-I198L-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S103A-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T22W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, G020R-T22W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T22W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, G020R-T22W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, G025R-N043A-Y091F-I198L-A270C, G025R-S105T-S128N-S144R-A270C, G046R-E089I-S099F-R186K-S212M, G118R-A172V, G118R-A194T, G118R-Y209A-K235F, H017Y-

S024R-T033S-P086W, I008T-S024R, K027R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, K027R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, K235F-N243F, N018R-G020R-H249R, N018R-G020R-N043D-H249R, N018R-G020R-N043D-R045T-A230E-S242R, N018R-G020R-N043D-R045T-N076D-S242R, N018R-G020R-N043D-R045T-S240P, N018R-G020R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-N043R, N018R-G020R-N043R-N076D, N018R-G020R-N043R-N076D-A230E-S242R, N018R-G020R-N043R-R045T-N076D-H249R, N018R-G020R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N043D-N076D-S242R, N018R-G020R-S024R-N043D-R045T-S242R, N018R-G020R-S024R-N043R-N076D-H249R, N018R-G020R-S024R-N043R-R045T-N076D-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-L217E-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-H249R, N018R-G020R-T22W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-

N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-N043D-R045T-N076D-S242R-H249R, N018R-N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N043D-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N043D-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-N043R-N076D-A230E-S242R-H249R, N018R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-N043R-N076D-S242R-H249R, N018R-N043R-R045T-N076D-A230E-S242R, N018R-N043R-R045T-N076D-S076T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-A273T, N018R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-N043R-R045T-N076D-S242R, N018R-N043R-R045T-S242R, N018R-N076D-H249R, N018R-N076D-Q245R, N018R-N076D-S101G-A232V-Q245R, N018R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-N076D-S101G-S103A-V104I-H249R, N018R-N076D-S101G-V104I-H249R, N018R-N076D-S103A-V104I-H249R, N018R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N043D-A230E-H249R, N018R-S024R-N043D-A230E-S242R, N018R-S024R-N043D-H249R, N018R-S024R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N043D-N076D-S242R-H249R, N018R-S024R-N043D-N076D-V150L-H249R, N018R-S024R-N043D-S242R, N018R-S024R-N043D-S242R-H249R, N018R-S024R-N043R-N076D-L217E-H249R, N018R-S024R-N043R-N076D-S078R-H249R, N018R-S024R-N043R-R045T-A230E-H249R, N018R-S024R-N076D, N018R-S024R-N076D-A232V-H249R, N018R-S024R-N076D-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-I198M-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-

N076D-L088I-S101A-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-A215F-H249R-V268G, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-Y209H-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-M117I-N183D-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101G-A232V, N018R-S024R-N076D-S103A-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-V104I, N018R-S024R-Q245R, N018R-S024R-R045T-A230E-S242R, N018R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-

S024R-S242R, N018R-S024R-V104I, N018R-S024R-V30S-L31S-D32I-T33Q-G34V-I35F, N018R-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N018R-S101G-S103A-V104I, N018R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S101G-V104I, N018R-S103A, N018R-S103A-V104I-A232V, N018R-T022K-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-T213A-

A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-T213A-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-I198L-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-G211Q-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-T213A-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-N116A-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-T213A-A215F-H249R, N018R-V104I, N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R-A272V, N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R-R275S, N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-V234I-Q245R, N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-N218S-A232V-Q245R, N043R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N062Q-S101A-Q236N-N252R-A270C, N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-S242R-Q245R, P005S-S024R-T033S-N243F, P014L-G020R-S024R-

N043R-R045T-S101A-A215F, P052N-V104L-N183D-S216F-H249R,
P086W-G118R, P086W-N243F, P086W-Y209A, Q012H-G020R-
S078R-S101G-S103A-V104I-I198L-G211Q-T213A-A232V-Q245R,
R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, R045T-
N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, R045T-S078R-
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, R045T-S101G-S103A-
V104I-A232V-Q245R-N269R, R045T-S242R-H249R, S024C-T033S,
S024R-A232V, S024R-G046R-Y091F-V121F, S024R-G118R-K235F,
S024R-N043A-S105T-S106G-I198L, S024R-N043D-R045T-S242R-
H249R, S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-
N043D-S242R-H249R, S024R-N043R-N076D, S024R-N043R-N076D-
A230E-S242R, S024R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-
Q245R-N269R, S024R-N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-
V104I-A232V-Q245R, S024R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-
V104I-A232V-Q245R, S024R-N043R-R045T-S242R-H249R, S024R-
N043R-S101A-T213A, S024R-N076D-Q245R, S024R-N076D-S101G-
A232V-Q245R, S024R-N076D-S101G-M175L-A232V-Q245R, S024R-
N076D-S101G-Q245R, S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-
Q245R, S024R-N076D-S103A-V104I-Q245R, S024R-N076D-V104I-
Q245R, S024R-N243F, S024R-P086R-G118R, S024R-P086W-Y209A-
K235F, S024R-P239Q, S024R-Q245R-H249R, S024R-R045T-N076D-
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-S101G, S024R-
S101G-Q245R, S024R-S101G-V104I-H249R, S024R-S103A-A232V,
S024R-S103A-M175L-A232V-H249R, S024R-S141G, S024R-T033S,
S024R-T033S-A194T, S024R-T033S-G118R-K235F, S024R-T033S-
G118R-Y209A, S024R-T033S-K235F, S024R-T033S-S078R-G118R,
S024R-T033S-S078R-N243F, S024R-T033S-Y209A, S024R-T033S-
Y209A-N243F, S024R-T274I, S024R-V104I-H249R, S024R-V104I-
Q245R, S024R-Y091F-I198L-A215F-P239S, S024R-Y209A, S024R-
Y209A-K235F, S024R-Y209A-S242P, S078R-P086W, S078R-S099F-

N116A-R186K-T224A, S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S101G-A232V, S101G-S103A-V104I-A232V-H249R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R-N269R, S101G-S103A-V104I-Q245R, S105T-G211Q-S216F, S106G-N185I-S216F-Q236N, T022R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, T033S-G118D-A138V-Y209A, T033S-G118R-Y209A-, T033S-L148F, T033S-N243F, T033S-P086W, T033S-P201S, T033S-S078R, T033S-W241R, T033S-Y209A, T033S-Y209A-K235F, V004M-N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R, V104I-A232V-H249R, e V104L-H120F-R186K-S216F-N252R, e sendo que a carga líquida total da variante de protease é 0, +1, +2, +3, +4, +5, -1, -2, -3, -4, ou -5 em relação à carga líquida total da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, e sendo que a carga líquida total é obtida por uma ou mais substituições selecionadas a partir de: N43D, R45T, N62E, N76D, S101D, P129E, A158E, G159D, G159E, S166D, S188D, A230E, N18R, G20K, G20R, T22R, S24R, N43R, G118R, Q245R, H249R, N269R, E271F, e E271L, e sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000307] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de protease que compreendem uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2, sendo que as variantes de protease são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: A015T-T033S, A016T-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-

A232V-Q245R-N269R, A230E-H249R, A232V-H249R, E089I-S105T-N116A-A215F-S216F, E089I-Y091F-N185I-G211Q-A270C, G020R-A090S-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, G020R-N043R-N076D, G020R-N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-P052N-S101A-I198L-L233C, G020R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-S024R-N043D-N076D-H249R, G020R-S024R-N043D-N076D-S242R-H249R, G020R-S024R-N043D-R045T-A230E-S242R, G020R-S024R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S024R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, G020R-S024R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S024R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, G020R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S024R-R045T-N076D-S242R-H249R, G020R-S024R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-G115E-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R-T274I, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-

N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022R-N269R, G020R-T022R-S078R-S212F-W241R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R-N269S, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R-T274I, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N183D-I198L-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R-N263S, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N183D-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N183D-A232V-Q245R, G025R-N062Q-S128N-S144R-N185I, G025R-N116A-H120F-T224A-A270C, G118R-K235F, K027R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018K-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R-N269R, N018R-G020R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N018R-G020R-N043D-N076D-S242R-H249R, N018R-G020R-N043D-R045T-N076D-H249R, N018R-G020R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N018R-G020R-N043R-R045T-H249R, N018R-G020R-N043R-R045T-

N076D-A230E-H249R, N018R-G020R-N076D, N018R-G020R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-S024R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-G020R-S024R-N043R-N076D, N018R-G020R-S024R-N076D-A131T-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-N243D-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-I198L-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R-N269S, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-A215F-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-I198L-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R,

N018R-G020R-S024R-N076D-N204D-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-G211Q-A215F-H249R-N269D, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-I198L-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-A215F-

H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-T213A-H249R, N018R-N043D-A230E-H249R, N018R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-N043D-N076D-S242R-H249R, N018R-N043D-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-A272D, N018R-N043R-N076D-A230E-H249R, N018R-N043R-N076D-S242R, N018R-N043R-R045T-A230E-S242R, N018R-N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N018R-N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-

Q245R, N018R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-N076D-A232V-H249R, N018R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N018R-N076D-S101G-I198T-A232V, N018R-N076D-S101G-S103A-V104I-Q245R, N018R-N076D-S101G-V104I, N018R-N076D-S242R, N018R-N076D-S242R-H249R, N018R-N076D-V104I-Q245R-H249R, N018R-R045T-H249R, N018R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N043D-N076D-S087D-H249R, N018R-S024R-N043D-N076D-S242R, N018R-S024R-N076D-A086V-S101A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-A232V, N018R-S024R-N076D-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-L217E-H249R-N269R, N018R-S024R-N076D-N116A-A150T-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-

N076D-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-H249R-A248T, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S087D-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-A215F-H249R-A270V, N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-A215F-

H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-V197A-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101G, N018R-S024R-N076D-S101G-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V, N018R-S024R-N076D-S103A-H249R, N018R-S024R-N076D-S103A-V104I-L135I-A232V, N018R-S024R-N076D-T213A-A215F-H249R-T260K, N018R-S024R-N076D-V150L-S242R-H249R, N018R-S024R-R045T-A230E-H249R, N018R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-T022R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R, N018R-

T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A209V-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-Y209H-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-

N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R-L267I, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116T-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-Y209H-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-G211Q-T213A-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-I198L-H249R, N018R-V104I-A232V, N043A-Q059A-S101A-S216F-T224A, N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N043D-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043D-S242R-H249R, N043R-A230E-H249R, N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N043R-N076D-S101G-S103T-V104I-A232V-Q245R-H249R-

N269R, N043R-R045T-H249R, N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N043R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N043R-S101G-S103A-V104I-Q245R-H249R, N043R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R-N269R, N076D-A232V-Q245R, N076D-Q245R, N076D-S101G-A232V-Q245R, N076D-S101G-S103A-Q245R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-H249R, N076D-S101G-S103A-V104I-H249R, N076D-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, N076D-S101G-V104I-H249R, N076D-S101G-V104I-Q245R, N076D-S103A-V104I-A232V-Q245R, N076D-S103A-V104I-Q245R, N076D-V104I-A232V-Q245R, N076D-V104I-Q245R, P005S-N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-T213A-A215F-H249R, P086W-K235F, P086W-Y209A-K235F, Q012H-V104A-G118R, R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-G118R-N243F-R269H, S024R-K235F-N243F, S024R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-N043R-N076D-A230E-H249R, S024R-N076D-A232V-H249R, S024R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S024R-N076D-S101G, S024R-N076D-S101G-A232V-H249R, S024R-N076D-S101G-S103A-A232V, S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-M175L-H249R, S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-Q245R, S024R-N076D-S101G-V104I-A232V-H249R, S024R-N076D-S103A-H249R, S024R-N076D-S103A-Q245R, S024R-N076D-S103A-V104I-H249R, S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S024R-R045T-S242R-A273V, S024R-R247H, S024R-S101G-S103A, S024R-S101G-S103A-A232V, S024R-S101G-S103A-V104I, S024R-S103A-Q245R-H249R, S024R-S103A-V104I, S024R-S106G-N116A-S212M-T224A, S024R-T033S-A151V, S024R-T033S-A174V-

K235F, S024R-T033S-A228T, S024R-T033S-K235F-W241R, S024R-T033S-N243F, S024R-V104A, S024R-V104I-A232V, S024R-Y209A-N243F, S078R-K235F, S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-S242R-Q245R, S099F-S105T-S106G-A194F-S212M, S101G-H249R, S101G-S103A-V104I, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248R, S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, S103A-A232V, S103A-A232V-H249R, S103A-A232V-Q245R, S103A-V104I-Q245R, S103N-H120F-Y167W-I198L-L233C, T022W-A194F-T213A-L233C-N238L, T022W-E089I-S216F, T033S-A048T, T033S-P086W-S156L-Y209A, T033S-P239T, T033S-T253A, T057R-N183D-Q236N, T143A-Y209A, V004E-T033S-S078R, V004R-S009A-T022R-S078R-S212F, Y209A-K235F, N043R-N076D-H249R, N018R-R045T, G020R-N076D-A230E-S242R, G020R-S024R-N043D-R045T, S024R-N043D-N076D-S242R-H249R, G020R-R045T-H249R, N043R-N076D-S153A-H249R, N043R-N076D-A230E-H249R, N018R-N043D-N076D-H249R, G020R-N043R-N076D-V227I, L111I-A215F-P239S, S024R-N116A-R186K-L233C-Q236N, G023A-S103N-S106G-S212M-A215F, Y209A-N243F, S024R-T033S-P129H-N184D-T253M, S024R-A085V-P086W-G118R-K235F, S024R-A272P, S024R-R269C, G020R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-N076D-V104I, N018R-G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, S101G-V104I, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R-N263D, N018R-T022W-S024R-N076D-

S101A-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-A215F-H249R-R269H, N018R-N043D-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-H249R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, V104I-A232V, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-H249R, N043D-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-N043R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, S024R-N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-Y166F-A176P-A179V-N184T-A187P-A194P, N018R-T022W-S024R-D041E-N076D-S101A-S160T-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-I198L-T213A-H249R, N018R-

G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R,
N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-G211Q-A215F-H249R, S024R-
N076D-V104I, N018R-N076D-S101G-A232V, N018R-S024R-N076D-
S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-
G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R, N018R-
S024R-L031F-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R,
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R-
N269S, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-A215F-
H249R, N018R-N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-
Q245R-N269R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N114T-I198L-
G211Q-A215F-H249R, S024R-N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-
L217E-A232V-Q245R, S024R-N076D-S103A-V104I-A232V, N018R-
G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-A215F-H249R,
S101G-V104I-A232V, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-
T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-
G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-T213A-H249R,
N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-
G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-H249R, N018R-
S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-T022W-
S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R-T260A,
N076D-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-A215F-
H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-G211Q-A215F-H249R,
N018R-G020R-S024R-N076D-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-
S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-G020R-T022W-
S024R-N076D-S101A-N183D-H249R, N076D-V104I-H249R, G020R-
T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-
A232V-Q245R, S024R-N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-
L217E-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N183D-
I198L-A215F-H249R, N018R-N076D-S101G-S103A, G020R-S024R-
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-G020R-S024R-

N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R, S101G-S103A-A232V, S024R-N076D-S101G-A232V, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-A156V-N183D-G211Q-A215F-H249R-N269S, R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-H249R, N018R-N076D-S101G, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-N076D-A232V, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-A232V-Q245R, N018R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-N237D-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R-R275S, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, S024R-N076D, N018R-S024R-N076D-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N076D-V104I-A232V-H249R, N018R-N076D-S103A-A232V, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-D175E-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R-A273E, G020R-S024R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R,

P005S-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S103A-V104I-A232V, N018R-G020R-S024R-V068A-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R-R275S, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N043D-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-L217E-S242R-H249R, N076D-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, e S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-S242R-Q245R, e sendo que a carga líquida total da variante de protease é 0, +1, +2, +3, +4, +5, -1, -2, -3, -4, ou -5 em relação à carga líquida total da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, e sendo que a carga líquida total é obtida por uma ou mais substituições selecionadas a partir de: N43D, R45T, N62E, N76D, S101D, P129E, A158E, G159D, G159E, S166D, S188D, A230E, N18R, G20K, G20R, T22R, S24R, N43R, G118R, Q245R, H249R, N269R, E271F, e E271L, e sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000308] Em um outro aspecto, os inventores descobriram que as proteases preferenciais compreendem pelo menos uma, ou mesmo duas ou mais mutações carregadas selecionadas do grupo consistindo em N062E, S101D, P129E, A158E, G159D/E, S166D, e/ou S188D. Tais proteases são particularmente preferenciais para incorporação nas composições detergentes adequadas para adição à água para fazer um líquido de lavagem que tem, de preferência, baixa força iônica ou baixa concentração de detergente. Desta forma, em um aspecto preferencial da invenção, estas proteases farão parte de uma compo-

sição detergente que é adicionada à água para um processo de lavagem manual ou lavagem à máquina, tipicamente dentro de uma máquina de lavar, para formar um líquido de lavagem, cuja condutividade é de cerca de 0,1 mS/cm a cerca de 3 mS/cm, de cerca de 0,3 mS/cm a cerca de 2,5 mS/cm, ou mesmo de cerca de 0,5 mS/cm a cerca de 2 mS/cm.

[000309] Em um outro aspecto, estas proteases que compreendem pelo menos uma, ou mesmo duas ou mais mutações carregadas selecionadas do grupo que consiste em N062E, S101D, P129E, A158E, G159D/E, S166D, e/ou S188D possuem uma carga de 0, -1, -2, -3, -4 ou -5, de preferência 0, -1, -2 ou -3, com a máxima preferência -1 ou -2 em relação à enzima da SEQ ID NO:1.

[000310] De acordo com a presente invenção, as proteases particularmente preferenciais para uso na invenção:

(a) compreendem uma ou mais mutações carregadas selecionadas do grupo que consiste em N062E, S101D, P129E, A158E, G159D/E, S166D, e/ou S188D;

(b) possuem uma carga de 0, -1, -2, -3, -4 ou -5, de preferência 0, -1, -2 ou -3, com a máxima preferência -1 ou -2 em relação à enzima da SEQ ID NO:1; e

(c) compreendem uma, duas, três ou mais mutações para chegar a uma carga líquida desejada selecionada a partir do grupo que compreende G20K, S024R, G118R, Q245R, H249R e/ou E271F/L.

[000311] Por "mutações para chegar a uma carga líquida desejada" pretende-se dizer que quando a variante de enzima é comparada com a protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, a carga líquida total da variante em relação à subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* pode ser ajustada para estar dentro da faixa preferencial por selecionar uma ou mais mutações adicionais selecionadas, de preferência, a partir das mutações identificadas, por exemplo, as mencionadas no item (c) aci-

ma.

[000312] De preferência, estas proteases preferenciais fazem parte de uma composição detergente que é adicionada à água, em um processo de lavagem à mão ou à máquina, tipicamente dentro de uma máquina de lavar, para formar um líquido de lavagem cuja condutividade é de cerca de 0,1 mS/cm a cerca de 3 mS/cm, de cerca de 0,3 mS/cm a cerca de 2,5 mS/cm, ou mesmo de cerca de 0,5 mS/cm a cerca de 2 mS/cm.

[000313] Sem se ater à teoria, acredita-se que estas mutações para chegar a uma carga líquida desejada fornecem desempenho da protease intensificado como um todo por garantir uma carga ótima da molécula para condições de baixa força iônica, ou líquidos de lavagem compreendendo baixa concentração de detergente - é apenas através da combinação cuidadosa de determinadas mutações, das quais estas são preferenciais, que tais proteases preferenciais podem ser obtidas.

[000314] Em um outro aspecto, os inventores descobriram que as proteases preferenciais compreendem pelo menos uma ou duas ou mais mutações carregadas selecionadas do grupo que consiste em N018R, G020K/R, T022R, S024R, N043R, Q245R, H249R e/ou N269R. Tais proteases são particularmente preferenciais para incorporação nas composições detergentes que serão adicionadas à água para fazer um líquido de lavagem que tem, de preferência, alta força iônica ou alta concentração de detergente. Por exemplo, estas proteases preferenciais fazem parte de uma composição detergente que é adicionada à água, para lavagem à mão ou à máquina, tipicamente dentro de uma máquina de lavar, para formar um líquido de lavagem cuja condutividade está acima de cerca de 3 mS/cm a cerca de 30 mS/cm, de cerca de 3,5 mS/cm a cerca de 20 mS/cm, ou mesmo de cerca de 4 mS/cm a cerca de 10 mS/cm.

[000315] Em um outro aspecto, tais proteases compreendem pelo

menos um, ou dois ou mesmo mais mutações carregadas selecionadas do grupo que consiste em N018R, G020K/R, T022R, S024R, N043R, Q245R, H249R e/ou N269R possuem uma carga de 0, +1, +2, +3, +4 ou +5, de preferência, +1, +2 ou +3, com a máxima preferência, +2 em relação à enzima da SEQ ID NO:1.

[000316] As proteases particularmente preferenciais:

(a) compreendem uma ou duas ou mais mutações carregadas selecionadas do grupo que consiste em N018R, G020K/R, T022R, S024R, N043R, Q245R, H249R e/ou N269R;

(b) possuem uma carga de 0, +1, +2, +3, +4 ou +5, de preferência, +1, +2 ou +3, com a máxima preferência, +2 em relação à enzima da SEQ ID NO:1; e

(c) compreendem mutações para chegar a uma carga líquida desejada selecionadas do grupo que consiste em N043D, R045T, N076D e/ou A230E.

[000317] De preferência, estas proteases fazem parte de uma composição detergente que é adicionada à água, em um processo de lavagem à mão ou à máquina, tipicamente dentro de uma máquina de lavar, para formar um líquido de lavagem cuja condutividade está acima de cerca de 3 mS/cm a cerca de 30 mS/cm, de cerca de 3,5 mS/cm a cerca de 20 mS/cm, ou mesmo de cerca de 4 mS/cm a cerca de 10 mS/cm.

[000318] Sem se ater à teoria, acredita-se que estas mutações para chegar a uma carga líquida desejada fornecem desempenho da protease intensificado como um todo em condições de alta força iônica ou alta concentração detergente - é apenas através da combinação cuidadosa de determinadas mutações, das quais estas são preferenciais, que tais proteases preferenciais podem ser obtidas.

[000319] A presente invenção fornece, adicionalmente, polipeptídeos que compreendem variantes de protease que têm uma ou mais das

seguintes características: a) um índice de desempenho no método de teste 2 de pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de 1,1 a cerca de 10, de 1,1 a cerca de 8, ou mesmo de 1,1 a cerca de 5; b) um índice de desempenho no método de teste 3 de pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de 1,1 a cerca de 10, de 1,1 a cerca de 8, ou mesmo de 1,1 a cerca de 5; c) um índice de desempenho no método de teste 4 de pelo menos 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de 1,0 a cerca de 10, de 1,0 a cerca de 8, ou mesmo de 1,0 a cerca de 5; e/ou d) um índice de desempenho no método de teste 6 de pelo menos 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de 1,0 a cerca de 10, de 1,0 a cerca de 8, ou mesmo de 1,0 a cerca de 5. O método de teste 2, o método de teste 3, o método de teste 4 e o método de teste 6 são explicitamente descritos abaixo na seção do Exemplo 1 intitulada "Métodos de teste".

Ácidos nucleicos da invenção

[000320] A invenção fornece ácidos nucleicos isolados, que não têm ocorrência natural, ou recombinantes (também chamados aqui de "polinucleotídeos"), que podem ser coletivamente mencionados como "ácidos nucleicos da invenção" ou "polinucleotídeos da invenção", que codificam os polipeptídeos da invenção. Os ácidos nucleicos da invenção, incluindo todos os descritos a seguir, são úteis na produção recombinante (*por exemplo*, expressão) dos polipeptídeos da invenção, tipicamente através de expressão de um vetor de expressão plasmidial

que compreende uma sequência que codifica o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo. Conforme discutido acima, os polipeptídeos incluem polipeptídeos da protease variante, incluindo polipeptídeos da subtilisina variante possuindo atividade enzimática (*por exemplo*, atividade proteolítica) que são úteis em aplicações para limpeza e composições de limpeza para limpar um item ou uma superfície (*por exemplo*, superfície de um item) que precisa ser limpa.

[000321] Em algumas modalidades, a invenção apresenta um ácido nucleico isolado, recombinante, substancialmente puro, ou que não tem ocorrência natural que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica qualquer polipeptídeo (incluindo qualquer proteína de fusão, etc.) da invenção descrito acima na seção intitulada "Polipeptídeos da invenção" e em outro local no presente documento. A invenção também fornece um ácido nucleico isolado, recombinante, substancialmente puro, ou que não tem ocorrência natural que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica uma combinação de dois ou mais de quaisquer polipeptídeos da invenção descritos acima e em outro local no presente documento.

[000322] Também é fornecido um ácido nucleico isolado, recombinante, substancialmente puro, ou que não tem ocorrência natural que compreende uma sequência de polinucleotídeos que codifica uma protease variante que tem atividade proteolítica, a dita protease variante (*por exemplo*, subtilisina variante) compreendendo uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 por não mais que 50, não mais que 40, não mais que 30, não mais que 35, não mais que 25, não mais que 20, não mais que 19, não mais que 18, não mais que 17, não mais que 16, não mais que 15, não mais que 14, não mais que 13, não mais que 12, não mais que 11, não mais que 10, não mais que 9, não mais que 8, não mais que 7, não mais que 6, não mais que 5, não mais que 4, não mais que 3, não mais que 2, ou

não mais que 1 resíduo(s) de aminoácido, em que as posições de aminoácido da subtilisina variante são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1 como determinado por alinhamento da sequência de aminoácidos da protease variante com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000323] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X1R, X2W, X2M, X2R, X2A, X2S, X3R, X4R, X4C, X4S, X8A, X9F, X9W, X9A, X10S, X10M, X10H, X10A, X12R, X12F, X14K, X14F, X14Q, X15R, X15F, X16S, X17R, X17M, X17F, X18R, X18K, X20F, X20R, X20K, X22Y, X22A, X22R, X22V, X22Q, X22W, X22L, X23F, X23S, X23A, X24W, X24R, X24H, X24F, X24Q, X24L, X25V, X25F, X25R, X26F, X27V, X27F, X27L, X27R, X28N, X28E, X28A, X29T, X30E, X31F, X33D, X33G, X33S, X34P, X35M, X36F, X36R, X36T, X38L, X38F, X38R, X40L, X40W, X40N, X40R, X40T, X40H, X42I, X43D, X43I, X43R, X43M, X43F, X43W, X43S, X43A, X45T, X46R, X48R, X50C, X51H, X51W, X51F, X52F, X52E, X52N, X55Y, X57R, X59R, X59A, X59F, X60A, X60Q, X60P, X62E, X62Q, X63I, X63V, X63T, X63P, X63D, X63M, X63H, X63Q, X63E, X63A, X63S, X64F, X64T, X68C, X68A, X69N, X69P, X69W, X69T, X71G, X72C, X74C, X75F, X75A, X75R, X75E, X76D, X78I, X78R, X78N, X79W, X79Q, X81R, X82V, X82T, X82F, X82M, X82R, X85M, X86L, X86I, X86W, X89P, X89T, X89V, X89G, X89W, X89H, X89F, X89L, X89I, X91N, X91F, X92F, X94N, X99G, X99F, X99M, X99T, X99P, X100I, X100S, X100N, X100Q, X101N, X101A, X101G, X101P, X101F, X101E,

X101T, X101D, X102H, X102N, X102E, X102T, X102A, X103G, X103D, X103N, X104D, X104E, X104I, X104L, X105Q, X105E, X105T, X106F, X106V, X106G, X106E, X106T, X106D, X106A, X107F, X107M, X108G, X108I, X109M, X111V, X111I, X112V, X112L, X112Q, X114G, X115K, X115R, X116A, X116K, X116L, X117F, X118I, X118R, X119C, X120F, X120A, X120R, X121E, X121F, X123G, X123E, X124S, X128F, X128H, X128I, X128L, X128Q, X128N, X128M, X128D, X129E, X132E, X132A, X138G, X144R, X147L, X148I, X158E, X158E, X159E, X159C, X160D, X166D, X166E, X167W, X175V, X177C, X181A, X182R, X183F, X183I, X183D, X183R, X183M, X185E, X185I, X185V, X186H, X186K, X188R, X188E, X188D, X192H, X192W, X194V, X194F, X194E, X197F, X198L, X198F, X203E, X203C, X208S, X209N, X209F, X209E, X209S, X209H, X209G, X209T, X209L, X210R, X210V, X210L, X211R, X211Q, X212I, X212M, X212F, X213A, X214F, X215F, X215N, X215D, X215H, X215E, X216F, X216A, X217N, X217E, X217D, X218P, X218D, X218E, X224A, X224G, X227I, X230E, X231I, X231C, X233C, X234F, X235F, X236F, X236N, X238L, X238K, X238R, X239K, X239S, X239T, X239G, X239H, X239R, X239N, X239F, X240R, X241R, X242L, X242R, X243R, X243F, X244R, X246S, X248I, X248V, X248R, X249R, X249T, X250I, X251S, X251R, X252I, X252F, X252H, X252R, X253F, X253I, X253R, X254C, X256N, X258R, X260V, X260I, X262H, X262D, X263F, X265F, X267N, X267V, X267M, X269I, X269R, X270C, X271F, X271V, X271I, X271P, X271H, X271M, X271T, X271L, X271A, X272F, X272R, X272F, X273I, X273F, e X274G, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000324] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma subtilisina de *Bacillus*, em que a variante de subtilisina é uma

forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X16S, X18R, X20R, X22A, X24R, X43R/D, X45T, X76D, X101A, X103G, X104L, X111V, X128N, X148I, X230E, X242R, e X249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000325] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma subtilisina de *Bacillus*, em que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X1R, X230E, X271L, X115R, X20R, X249R, X235F, X27V/F/L, X75E, X82R, X18R, X269R, X43D, X43R, X76D, X45T, X212F, X242R, X24R, X78R, X9A, X22R, X121E, X244R, X28E, X30E, X4R, e X241R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000326] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma subtilisina de *Bacillus* em que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X062E-X158E, X103G-X158E, X128N-X158E, X016S-X158E, X104L-X158E, X089P-X158E, X111V-X158E, X022A-X158E, X101A-X158E, X148I-X158E, X129E-X158E, X022A-X089P, X016S-X089P, X062E-X089P, X062E-X271F, X158E-X271F, X186H-X271F, X129E-X271F, X111V-X271F, X209E-X271F, X016S-X271F, X188D-X271F, X022A-X271F, X159E-X271F, X104L-X271F, X101A-X271F, X089P-X271F, X128N-X271F, X103G-

X271F, X148I-X271F, X249R-X271F, X062E-X159E, X016S-X159E, X128N-X159E, X148I-X159E, X111V-X159E, X089P-X159E, X022A-X159E, X129E-X159E, X103G-X159E, X104L-X159E, X158E-X159E, X101A-X159E, X158E-X249R, X111V-X249R, X129E-X249R, X062E-X249R, X016S-X249R, X186H-X249R, X148I-X249R, X159E-X249R, X101A-X249R, X188D-X249R, X104L-X249R, X209E-X249R, X022A-X249R, X128N-X249R, X103G-X249R, X089P-X249R, X022A-X111V, X101A-X111V, X016S-X111V, X104L-X111V, X062E-X111V, X103G-X111V, X089P-X111V, X016S-X148I, X062E-X148I, X022A-X148I, X129E-X148I, X104L-X148I, X103G-X148I, X128N-X148I, X101A-X148I, X089P-X148I, X111V-X148I, X016S-X062E, X022A-X062E, X062E-X129E, X022A-X129E, X128N-X129E, X016S-X129E, X101A-X129E, X104L-X129E, X089P-X129E, X103G-X129E, X111V-X129E, X062E-X186H, X128N-X186H, X101A-X186H, X022A-X186H, X016S-X186H, X158E-X186H, X089P-X186H, X129E-X186H, X159E-X186H, X103G-X186H, X104L-X186H, X111V-X186H, X148I-X186H, X062E-X101A, X022A-X101A, X016S-X101A, X089P-X101A, X062E-X103G, X022A-X103G, X016S-X103G, X101A-X103G, X089P-X103G, X062E-X128N, X016S-X128N, X022A-X128N, X101A-X128N, X104L-X128N, X089P-X128N, X103G-X128N, X111V-X128N, X111V-X188D, X062E-X188D, X016S-X188D, X148I-X188D, X022A-X188D, X128N-X188D, X101A-X188D, X104L-X188D, X089P-X188D, X129E-X188D, X159E-X188D, X186H-X188D, X103G-X188D, X158E-X188D, X016S-X022A, X016S-X104L, X022A-X104L, X101A-X104L, X062E-X104L, X103G-X104L, X089P-X104L, X159E-X209E, X111V-X209E, X101A-X209E, X016S-X209E, X128N-X209E, X148I-X209E, X129E-X209E, X062E-X209E, X022A-X209E, X103G-X209E, X158E-X209E, X188D-X209E, X104L-X209E, X089P-X209E, e X186H-X209E, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de

B. amyloliquefaciens apresentada como SEQ ID NO:1.

[000327] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* em que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X018R-X241R, X020R-X241R, X024R-X241R, X009A-X241R, X020R-X241R, X004R-X241R, X043R-X241R, X078R-X241R, X022R-X241R, X115R-X241R, X001R-X241R, X212F-X241R, X082R-X241R, X018R-X244R, X024R-X244R, X078R-X244R, X020R-X244R, X212F-X244R, X009A-X244R, X082R-X244R, X001R-X244R, X043R-X244R, X022R-X244R, X004R-X244R, X115R-X244R, X241R-X244R, X242R-X244R, X001R-X004R, X009A-X022R, X018R-X022R, X020R-X022R, X004R-X022R, X001R-X022R, X024R-X242R, X018R-X242R, X004R-X242R, X020R-X242R, X212F-X242R, X082R-X242R, X078R-X242R, X001R-X242R, X009A-X242R, X022R-X242R, X115R-X242R, X043R-X242R, X241R-X242R, X018R-X212F, X022R-X212F, X004R-X212F, X024R-X212F, X001R-X212F, X115R-X212F, X020R-X212F, X009A-X212F, X043R-X212F, X078R-X212F, X082R-X212F, X009A-X078R, X020R-X078R, X024R-X078R, X022R-X078R, X018R-X078R, X004R-X078R, X001R-X078R, X043R-X078R, X022R-X024R, X020R-X024R, X018R-X024R, X001R-X024R, X004R-X024R, X009A-X024R, X004R-X009A, X001R-X009A, X242R-X269R, X024R-X269R, X020R-X269R, X022R-X269R, X249R-X269R, X212F-X269R, X043R-X269R, X244R-X269R, X001R-X269R, X018R-X269R, X078R-X269R, X009A-X269R, X115R-X269R, X241R-X269R, X004R-X269R, X082R-X269R, X018R-X043R, X020R-X043R, X004R-X043R, X022R-X043R, X009A-X043R, X001R-X043R, X024R-X043R, X009A-X018R, X004R-X018R, X001R-X018R, X024R-X082R, X009A-X082R, X018R-X082R, X001R-X082R, X078R-X082R, X020R-X082R, X022R-X082R, X004R-X082R, X043R-X082R, X043R-X249R,

X020R-X249R, X004R-X249R, X018R-X249R, X009A-X249R, X212F-X249R, X022R-X249R, X024R-X249R, X115R-X249R, X001R-X249R, X082R-X249R, X242R-X249R, X241R-X249R, X244R-X249R, X078R-X249R, X018R-X115R, X020R-X115R, X022R-X115R, X078R-X115R, X009A-X115R, X004R-X115R, X001R-X115R, X082R-X115R, X043R-X115R, X024R-X115R, X009A-X020R, X018R-X020R, X004R-X020R, X001R-X020R, X009A-X271L, X020R-X271L, X024R-X271L, X244R-X271L, X241R-X271L, X043R-X271L, X022R-X271L, X249R-X271L, X212F-X271L, X115R-X271L, X242R-X271L, X078R-X271L, X004R-X271L, X269R-X271L, X001R-X271L, X018R-X271L, e X082R-X271L, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000328] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X020R-X43R, X020K-X062E, X024F-X116L, X020K-X024F, X024R-X174T, X024R-X118R, X024R-X235F, X024R-X086R, X024R-X086W, X078R-X118R, X033S-X118R, X033S-X235F, X209A-X241R, X020R-X076D, X018R-X245R, X024R-X045T, X232V-X245R, X118R-X172V, X118R-X194T, X008T-X024R, X235F-X243F, X018R-X103A, X018R-X104I, X086W-X118R, X086W-X243F, X086W-X209A, X024C-X033S, X024R-X232V, X024R-X243F, X024R-X239Q, X024R-X101G, X024R-X141G, X024R-X033S, X024R-X274I, X024R-X209A, X078R-X086W, X101G-X232V, X033S-X148F, X033S-X086W, X033S-X201S, X033S-X078R, X033S-X241R, X033S-X209A, X230E-X249R, X232V-X249R, X118R-X235F, X076D-X245R, X086W-X235F, X024R-X247H, X024R-

X104A, X078R-X235F, X101G-X249R, X103A-X232V, X033S-X048T, X033S-X239T, X033S-X253A, X143A-X209A, X209A-X235F, X018R-X045T, X209A-X243F, X024R-X272P, X024R-X269C, X101G-X104I, X104I-X232V, X076D-X249R, e X024R-X076D sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000329] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X020R-X076D, X024R-X045T, X230E-X249R, X018R-X045T, X018R-X245R, X101G-X232V, X024R-X232V, X232V-X245R, X024R-X101G, X018R-X104I, X018R-X103A, X101G-X249R, X232V-X249R, X103A-X232V, X076D-X245R, X101G-X104I, X104I-X232V, X076D-X249R, X024R-X076D, X024F-X116L, X020K-X024F, X020K-X062E, X033S-X118R, X024R-X086W, X024R-X118R, X024R-X086R, X209A-X241R, X024R-X241R, X024R-X235F, X118R-X209A, X078R-X118R, X033S-X235F, X024R-X174T, X086W-X209A, X008T-X024R, X086W-X118R, X033S-X241R, X024R-X243F, X024R-X209A, X033S-X086W, X024R-X033S, X086W-X243F, X033S-X201S, X024R-X239Q, X078R-X086W, X235F-X243F, X118R-X172V, X033S-X148F, X033S-X078R, X033S-X243F, X024C-X033S, X118R-X194T, X033S-X209A, X024R-X141G, X024R-X274I, X086W-X235F, X015T-X033S, X209A-X235F, X024R-X247H, X078R-X235F, X024R-X104A, X033S-X048T, X118R-X235F, X033S-X253A, X143A-X209A, X033S-X239T, X209A-X243F, X024R-X272P, e X024R-X269C, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada

como SEQ ID NO:1.

[000330] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X004R-X009A-X020R-X242R, X020R-X043R-X241R, X020R-X242R-X269R, X004R-X009A-X020R-X043R, X004R-X020R-X249R, X018R-X024R-X244R, X009A-X022R-X212F-X241R, X020R-X043R-X269R, X018R-X024R-X242R, X004R-X009A-X043R-X241R, X020R-X043R-X244R, X020R-X022R-X242R, X004R-X020R-X043R, X004R-X009A-X020R-X043R-X242R, X020R-X043R-X242R, X020R-X043R-X242R-X249R, X020R-X212F-X249R, X004R-X009A-X241R, X001R-X009A-X043R, X020R-X043R-X249R, X009A-X020R-X043R-X241R, X020R-X022R-X043R, X020R-X249R-X269R, X020R-X022R-X241R, X004R-X009A-X024R-X043R-X241R, X009A-X043R-X078R, X004R-X020R-X024R-X244R, X020R-X022R-X078R-X242R, X020R-X024R-X242R-X249R, X004R-X009A-X078R-X241R, X009A-X043R-X078R-X242R, X004R-X020R-X024R, X009A-X043R-X212F, X020R-X043R-X212F, X024R-X078R-X212F, X009A-X020R-X024R-X043R, X009A-X022R-X043R-X078R, X020R-X022R-X212F-X241R, X020R-X043R-X212F-X241R, X009A-X043R-X241R, X020R-X043R-X271L, X020R-X022R-X078R-X241R, X020R-X024R-X043R-X242R, X020R-X022R-X043R-X241R, X009A-X020R-X043R-X212F, X004R-X009A-X020R-X024R-X242R, X020R-X043R-X249R-X271L, X020R-X022R-X024R-X242R, X009A-X022R-X078R-X212F, X020R-X043R-X242R-X271L, X009A-X022R-X078R-X212F-X241R, X004R-X020R-X024R-X249R, X020R-X022R-X271L, X020R-X022R-X043R-X212F, X004R-X020R-X024R-X043R-X242R, X004R-X020R-X024R-X043R, X004R-X009A-X022R-X078R-X212F, X020R-X022R-X078R-X212F-X241R, e X020R-X022R-X269R,

sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000331] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X018R-X020R-X043D-X045T-X230E, X018R-X043R-X045T-X242R-X249R, X024R-X043D-X249R, X018R-X020R-X045T, X020R-X024R-X076D-X249R, X024R-X043R-X230E-X242R, X018R-X024R-X043D-X230E, X020R-X076D, X018R-X024R-X043D-X076D-X249R, X024R-X043R-X076D-X249R, X018R-X024R-X045T-X242R, X020R-X043D-X076D-X230E-X249R, X020R-X043R-X045T-X242R, X018R-X024R-X076D-X249R, X018R-X020R-X024R-X043D-X045T-X233I-X242R, X024R-X043R-X230E, X018R-X020R-X043D, X043R-X242R-X249R, X020R-X043R-X045T-X230E, X043R-X076D-X242R-X249R, X020R-X024R-X045T-X230E-X242R, X024R-X045T-X076D-X230E-X242R-X249R, X024R-X045T, X024R-X043R-X045T-X076D-X230E-X249R, X018R-X024R-X043D-X045T-X249R, X018R-X043R-X045T-X249R, X024R-X043R-X242R, X018R-X020R-X043R-X076D-X249R, X020R-X024R-X043D-X249R, X020R-X043R-X230E-X242R, X020R-X043R-X242R, X018R-X043R-X076D-X230E, X020R-X024R-X043D-X242R, X020R-X043R-X230E, X018R-X020R-X043R-X076D-X242R-X249R, X043D-X045T-X076D-X249R, X018R-X043R-X242R-X249R, X018R-X020R-X043R-X045T-X242R, X018R-X020R-X043D-X230E-X242R, X020R-X024R-X043R-X045T-X249R, X024R-X043R-X249R, X020R-X024R-X27E-X043R-X076D-X230E, X024R-X043R-X045T-X242R, X018R-X020R-X024R-X043R-X045T-X076D-X230E, X020R-X043R-X076D-

X230E-X249R, X018R-X043R-X045T-X242R, X020R-X242R-X249R,
X018R-X043R-X076D-X230E-X242R-X249R, X018R-X024R-X076D,
X020R-X024R-X27R-X043D-X242R-X249R, X018R-X020R-X024R-
X043D-X076D-X242R, X018R-X043R-X076D-X242R-X249R, X018R-
X024R-X043D-X230E-X249R, X018R-X020R-X043D-X249R, X018R-
X020R-X043D-X045T-X076D-X242R, X024R-X043R-X076D-X230E-
X242R, X020R-X024R-X38I-X043R-X045T-X076D-X242R-X249R,
X018R-X020R-X043R, X018R-X024R-X045T-X230E-X242R, X018R-
X020R-X249R, X024R-X043R-X076D, X018R-X020R-X024R-X043R-
X045T-X076D-X249R, X018R-X043D-X045T-X076D-X242R-X249R,
X024R-X043D-X242R-X249R, X018R-X020R-X024R-X043D-X045T-
X242R, X020R-X024R-X043R-X076D, X018R-X020R-X043D-X045T-
X230E-X242R, X020R-X024R-X043R-X045T-X076D-X242R-X249R,
X018R-X043R-X045T-X076D-X242R, X018R-X020R-X043R-X076D-
X230E-X242R, X018R-X024R-X043D-X249R, X018R-X024R-X043R-
X045T-X230E-X249R, X018R-X020R-X043R-X045T-X076D-X249R,
X018R-X024R-X242R, X018R-X043R-X045T-X076D-X230E-X242R,
X045T-X242R-X249R, X018R-X024R-X043D-X242R, X018R-X020R-
X043D-X045T-X240P, X024R-X043R-X045T-X242R-X249R, X018R-
X024R-X30S-X31S-X32I-X33Q-X34V-X35F, X018R-X020R-X043R-
X076D, X020R-X043D-X045T-X076D-X242R-X249R, X018R-X024R-
X043D-X230E-X242R, X018R-X024R-X043D-X242R-X249R, X024R-
X043D-X045T-X242R-X249R, X043R-X230E-X249R, X024R-X043R-
X076D-X230E-X249R, X020R-X024R-X043D-X076D-X249R, X024R-
X045T-X242R-X273V, X020R-X024R-X045T-X076D-X242R-X249R,
X018R-X024R-X043D-X076D-X242R, X018R-X043R-X076D-X230E-
X249R, X018R-X020R-X043R-X045T-X249R, X018R-X043R-X045T-
X230E-X242R, X020R-X024R-X043D-X045T-X230E-X242R, X018R-
X043D-X230E-X249R, X018R-X043R-X076D-X242R, X018R-X020R-
X076D, X018R-X020R-X043D-X076D-X242R-X249R, X020R-X024R-

X043D-X076D-X242R-X249R, X043D-X242R-X249R, X018R-X020R-X024R-X043R-X076D, X018R-X020R-X043D-X045T-X076D-X249R, X018R-X020R-X043R-X045T-X076D-X230E-X249R, X018R-X076D-X242R, X020R-X043R-X249R, X018R-X076D-X242R-X249R, X018R-X024R-X045T-X230E-X249R, X230E-X249R, X018R-X045T-X249R, X020R-X043R-X076D, X043R-X045T-X249R, X018R-X043D-X076D-X242R-X249R, X043R-X076D-X249R, X018R-X045T, X020R-X076D-X230E-X242R, X020R-X024R-X043D-X045T, X024R-X043D-X076D-X242R-X249R, X020R-X045T-X249R, X043R-X076D-X153A-X249R, X043R-X076D-X230E-X249R, X018R-X043D-X076D-X249R, e X020R-X043R-X076D-X227I, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000332] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X101G-X103A-X104I-X232V-X236H-X245R-X252K, X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X248R, X101G-X103A-X104I-X159R-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248R, X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R, e X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X248D, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000333] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e com-

preende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X101G-X103A-X104I-X129E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X159E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X148I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X159E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X129E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X148I-X158E-X232V-X245R-X248D, X016S-X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X128N-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X188D-X232V-X245R-X248D, X024R-

X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D,
X022A-X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X188D-X232V-X238R-
X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X188D-X232V-
X238R-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-
X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-
X128N-X188D-X232V-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-
X129E-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-
X103A-X104I-X128N-X129E-X158E-X232V-X245R-X248D, X024R-
X101G-X103A-X104I-X159E-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-
X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X232V-X238R-X245R-X248D,
X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X159E-X232V-X245R-X248D,
X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X188D-X232V-
X238R-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-
X159E-X188D-X232V-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-
X159E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X101G-X103A-
X104I-X129E-X158E-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X024R-
X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R,
X024R-X101G-X103A-X104I-X148I-X158E-X232V-X245R-X248D,
X022A-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X188D-X232V-X245R-
X248D-X249R, X022A-X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-
X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-X129E-X188D-X232V-
X238R-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-
X159E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X024R-X101G-
X103A-X104I-X158E-X159E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D,
X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-
X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128N-X158E-X232V-X245R-
X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X188D-
X232V-X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-X129E-X159E-
X232V-X238R-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X129E-X159E-
X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X101G-X103A-X104I-X129E-

X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X148I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-X129E-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X159E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X232V-X238R-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X128N-X159E-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-X159E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X159E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-X129E-X159E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X148I-X188D-X232V-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X232V-X238R-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X148I-X158E-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-X159E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-

X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R,
X101G-X103A-X104I-X129E-X188D-X232V-X245R-X248D, X024R-
X101G-X103A-X104I-X129E-X159E-X232V-X238R-X245R-X248D,
X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X232V-X245R-X248D, X101G-
X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-
X101G-X103A-X104I-X129E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-
X103A-X104I-X129E-X159E-X232V-X238R-X245R-X248D, X101G-
X103A-X104I-X158E-X159E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D,
X024R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-
X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X148I-X232V-X245R-X248D,
X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X238R-X245R-
X248D, X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X232V-X238R-X245R-
X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-X128N-X159E-X232V-X245R-
X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X158E-X232V-
X238R-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X188D-
X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-
X128N-X129E-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-
X101G-X103A-X104I-X128N-X158E-X159E-X188D-X232V-X245R-
X248D, X022A-X024K-X101G-X103A-X104I-X128N-X158E-X159E-
X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X129E-X148I-X188D-
X232V-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X148I-X232V-
X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-X148I-X188D-X232V-
X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X188D-
X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X158E-
X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-
X129E-X148I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-
X101G-X103A-X104I-X148I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D,
X101G-X103A-X104I-X148I-X159E-X232V-X245R-X248D, X022A-
X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D, e
X101G-X103A-X104I-X128N-X129E-X158E-X232V-X245R-X248D-

X249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000334] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X232V-X238R-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X159E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X238R-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X159E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X232V-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X148I-X232V-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X148I-X158E-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X016S-X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X159E-X232V-X238R-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X101G-X103A-X104I-X129E-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X148I-X158E-X232V-X245R-X248D, X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X188D-X232V-X238R-X245R-

X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X188D-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X232V-X238R-X245R-X248D, X022A-X024R-X101G-X103A-X104I-X129E-X158E-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, e X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X159E-X232V-X245R-X248D, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000335] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X104L-X128N-X158E-X186H-X249R, X128N-X158E-X188D-X249R, X062E-X128N-X158E-X159E-X271F, X062E-X158E-X188D-X249R-X271F, X062E-X158E-X186H-X249R-X271F, X128N-X158E-X188D-X209E-X271F, X062E-X159E-X188D-X249R, X016S-X062E-X158E-X186H-X249R, X062E-X158E-X159E-X249R, X101A-X128N-X158E-X209E-X249R, X128N-X158E-X186H-X271F, X062E-X158E-X188D-X249R, X062E-X158E-X186H-X271F, X062E-X158E-X186H-X249R, X062E-X101A-X186H-X249R, X062E-X101A-X158E-X186H-X271F, X062E-X104L-X158E-X188D-X249R-X271F, X062E-X159E-X186H-X249R, X062E-X159E-X249R, X128N-X158E-X186H-X249R, X128N-X158E-X188D-X271F, X062E-X158E-X249R, X062E-X186H-X188D-X249R-X271F, X128N-X158E-X209E-, X062E-X101A-X158E-X249R, X104L-X128N-X158E-X186H-X271F, X062E-X101A-X158E-X186H-X249R-X271F, X016S-X062E-X158E-X249R, X062E-X101A-X159E-X249R, X128N-X158E-X186H-X188D-X271F, X101A-X128N-X158E-X186H-

X271F, X062E-X101A-X188D-X249R, X101A-X104L-X158E-X186H-X188D-X249R, X062E-X159E-X249R-X271F, X128N-X158E-X159E-X271F, X016S-X062E-X104L-X158E-X186H-X271F, X022A-X128N-X158E-X249R, X128N-X158E-X249R, X062E-X101A-X104L-X158E-X186H-X271F, X016S-X062E-X158E-X186H-X271F, X104L-X128N-X158E-X249R, X104L-X128N-X158E-X188D-X249R, X022A-X062E-X158E, X062E-X101A-X188D-X249R-X271F, X062E-X158E-X249R-X271F, X104L-X128N-X158E-X186H-X188D-X271F, X062E-X101A-X186H-X271F, X062E-X104L-X159E-X249R, X062E-X186H-X249R, X062E-X101A-X186H-X249R-X271F, X101A-X158E-X186H-X188D-X249R, X062E-X101A-X186H, X101A-X128N-X129E-X186H-X249R, X101A-X103G-X158E-X186H-X249R, X016S-X062E-X104L-X186H-X188D-X271F, X104L-X158E-X186H-X249R, X101A-X128N-X158E-X188D-X209E-X271F, X062E-X101A-X186H-X188D-X271F, X016S-X062E-X158E-X249R-X271F, X062E-X128N-X158E, X062E-X128N-X159E-X249R, X062E-X101A-X158E-X188D-X249R, X101A-X128N-X158E-X249R, X062E-X158E-X186H-X188D-X249R, X016S-X104L-X158E-X186H-X271F, X062E-X148I-X159E, X062E-X101A-X158E-X186H-X249R, X062E-X101A-X186H-X188D-X249R, X104L-X158E-X186H-X188D-X249R, X062E-X101A-X104L-X186H-X188D-X271F, X022A-X101A-X158E-X186H-X249R, X101A-X128N-X158E-X209E, X158E-X186H-X188D-X249R-X271F, X104L-X158E-X186H-X188D-X249R-X271F, X101A-X104L-X158E-X186H-X249R, X104L-X158E-X249R, X101A-X104L-X128N-X158E-X186H-X271F, X016S-X104L-X188D-X249R, X101A-X104L-X158E-X186H-X188D-X271F, X104L-X128N-X159E-X271F, X104L-X158E-X186H-X249R-X271F, X158E-X186H-X249R, X101A-X158E-X186H-X249R, X104L-X158E-X188D-X249R-X271F, X016S-X128N-X158E-X186H, X104L-X128N-X186H-X188D-X249R, X016S-X101A-X128N-X186H, X016S-X062E-X128N-X186H-X271F, X016S-X128N-X186H-X271F, X128N-X129E-X186H,

X158E-X186H-X249R-X271F, X016S-X158E-X249R, X016S-X158E-X186H-X249R, X016S-X022A-X158E-X186H-X271F, X089P-X101A-X129E-X186H, X022A-X128N-X158E-X186H, X101A-X104L-X128N-X158E-X186H, X022A-X128N-X186H-X188D-, X062E-X104L-X158E-X186H-X188D-X249R, X022A-X158E-X186H-X249R-X271F, X022A-X104L-X158E-X249R, X101A-X111V-X129E, X016S-X158E-X249R-X271F, X016S-X111V-X188D-, X022A-X104L-X186H-X188D-X249R, e X104L-X148I-X188D-X249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000336] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X001R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X004R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X271L, X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X004R-X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X271L, X020R-X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X024R-X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X025R-X116A-X167W, X018R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X022R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X078R-X103N-X106G-X167W-X236N, X018R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X024R-X101A-X120F-X194F-X249R, X020R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X101G-X103A-X104I-X212F-X232V-X245R, X020R-X144R-X185I-X233C-X236N, X023A-X078R-

X216F-X236N-X249R, X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R,
X101G-X103A-X104I-X115R-X232V-X245R, X052N-X078R-X103N-
X148I-X213A, X018R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-
X249R, X024R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R,
X024R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X025R-
X089I-X116A-X239S-X270C, X024R-X101G-X103A-X104I-X232V-
X245R, X148I-X213A-X252R, X024R-X025R-X183D-X192W-X239S,
X046R-X194F-X212M, X104L-X217E-X224A-X249R-X252R, X023A-
X091F-X121F-X192W-X236N, X101G-X103A-X104I-X232V-X244R-
X245R, X099F-X144R-X167W-X252R, X101G-X103A-X104I-X232V-
X245R-X249R, X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X022W-
X078R-X167W-X212M-X270C, X121F-X252R-X270C, X020R-X103N-
X216F-X236N-X252R, X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-
X249R, X023A-X052N-X192W-X198L-X252R, X025R-X046R-X121F,
X024R-X078R-X104L-X116A-X183D, X046R-X059A-X103N-X211Q-
X212M, X020R-X052N-X062Q-X091F-X192W, X023A-X052N-X144R-
X192W-X216F, X101G-X103A-X104I-X232V-X242R-X245R, X052N-
X103N-X116A-X148I-X192W, X089I-X116A-X117F-X224A-X249R,
X144R-X211Q-X238L-X239S-X249R, X043A-X062Q-X194F-X211Q,
X020R-X024R-X052N-X059A-X216F, X024R-X167W-X224A-X249R,
X057R-X167W-X249R, X025R-X103N-X186K-X194F-X224A, X105T-
X128N-X144R-X148I-X212M, X020R-X059A-X144R-X192W-X224A,
X024R-X043A-X117F-X194F-X211Q, X117F-X194F-X213A-X270C,
X078R-X091F-X121F-X233C-X252R, X057R-X099F-X105T-X198L-
X213A, X023A-X091F-X101A-X198L-X252R, X062Q-X103N-X121F-
X144R-X249R, X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X242R-X245R,
X023A-X024R-X117F-X212M-X216F, X104L-X213A-X216F, X194F-
X211Q-X236N, X062Q-X103N-X117F-X194F, X024R-X062Q-X104L-
X106G-X249R, X057R-X089I-X198L, X046R-X059A-X106G-X217E-
X249R, X117F-X213A-X215F, X101A-X120F-X192W-X215F-X224A,

X043A-X057R-X117F-X144R-X183D, X046R-X183D-X238L, X025R-X043A-X089I-X117F, X078R-X104L-X213A-X215F-X224A, X091F-X099F-X101A-X105T-X167W, X106G-X117F-X238L, X046R-X089I-X091F-X101A-X116A, X020R-X062Q-X089I-X186K-X212M, X057R-X099F-X121F-X185I-X192W, X046R-X089I-X192W-X233C-X270C, X089I-X117F-X185I-X215F-X233C, X052N-X104L-X183D-X216F-X249R, X078R-X099F-X116A-X186K-X224A, X025R-X105T-X128N-X144R-X270C, X105T-X211Q-X216F, X024R-X046R-X091F-X121F, X106G-X185I-X216F-X236N, X062Q-X101A-X236N-X252R-X270C, X025R-X043A-X091F-X198L-X270C, X020R-X023A-X104L-X192W-X233C, X024R-X043A-X105T-X106G-X198L, X020R-X089I-X217E, X024R-X091F-X198L-X215F-X239S, X046R-X089I-X099F-X186K-X212M, X104L-X120F-X186K-X216F-X252R, X022W-X194F-X213A-X233C-X238L, X099F-X105T-X106G-X194F-X212M, X089I-X105T-X116A-X215F-X216F, X025R-X116A-X120F-X224A-X270C, X043A-X059A-X101A-X216F-X224A, X057R-X183D-X236N, X025R-X062Q-X128N-X144R-X185I, X103N-X120F-X167W-X198L-X233C, X022W-X089I-X216F, X024R-X106G-X116A-X212M-X224A, X020R-X052N-X101A-X198L-X233C, X089I-X091F-X185I-X211Q-X270C, X111I-X215F-X239S, X024R-X116A-X186K-X233C-X236N, e X023A-X103N-X106G-X212M-X215F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000337] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus*, em que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X020R-X022W-X078R-X101A-X103A-X104I-X116S-X213A-X215F-X232V-

X245R, X018R-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X024R-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X022W-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X232V-X245R, X020R-X22W-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X232V-X245R, X018R-X104I-X232V-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X211Q-X249R, X018R-X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X018R-X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X043D-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X024R-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X103A-X232V-X249R, X018R-X101G-X104I-X232V-X245R, X020R-X024R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R-X249R, X018R-X22K-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043R-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X22W-X101G-X103A-X104I-X211Q-X232V-X245R, X024R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X22W-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X232V, X018R-X024R-X076D-X116A-X215F-X249R, X018R-X043R-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X024R-X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X211Q-X232V-X245R, X020R-X022W-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X213A-X215F-X232V-X245R, X043D-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X211Q-X249R, X043R-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X101G-X245R, X020R-X22W-X101A-X103A-X104I-X211Q-X213A-X232V-X245R,

X020R-X024R-X043D-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X024R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X101G-X103A-X249R, X018R-X22W-X024R-X076D-X101A-X116A-X232V-X245R, X018R-X101G-X104I-X232V-X249R, X020R-X22W-X101A-X103A-X104I-X215F-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X101G-X104I-X213A-X215F-X232V-X245R, X020R-X101G-X103A-X104I-X116A-X215F-X232V-X245R, X024R-X103A-X104I-X249R, X018R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X024R-X101G-X104I-X245R, X020R-X101G-X103A-X104I-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X024R-X103A-X104I-X232V-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X211Q-X215F-X249R, X018R-X245R, X024R-X103A-X245R, X024R-X103A-X104I-X245R, X020R-X078R-X101G-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X104I-X249R, X018R-X024R-X104I-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X211Q-X215F-X249R, X019H-X020R-X022W-X078R-X101G-X103A-X104I-X211Q-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X22W-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X103A-X104I-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X215F-X249R, X018R-X024R-X101G-X104I-X232V, X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X024R-X043R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-

X232V-X245R, X018R-X020R-X043D-X076D-X101G-X103A-X104I-
X232V-X245R, X018R-X22W-X024R-X076D-X116A-X213A-X249R,
X018R-X024R-X101G-X104I, X020R-X101A-X103A-X104I-X215F-
X232V-X245R, X018R-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-
X245R, X018R-X101G-X103A-X245R, X043R-X076D-X078R-X101G-
X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-
X211Q-X215F-X232V-X245R, X020R-X22W-X078R-X101G-X103A-
X104I-X116A-X213A-X215F-X232V-X245R, X020R-X078R-X101G-
X103A-X104I-X215F-X232V-X245R, X020R-X022W-X078R-X101G-
X103A-X104I-X116A-X183D-X232V-X245R, X076D-X101G-X103A-
X104I-X232V-X245R, X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-
X269R, X020R-X22W-X101A-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-
X101G-X103A-X232V-X245R, X020R-X022W-X078R-X101A-X103A-
X104I-X116A-X183D-X232V-X245R, X018R-X020R-X024R-X045T-
X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X043R-X045T-
X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X101G-X104I-
X249R, X020R-X22W-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-
X232V-X245R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X198L-X211Q-
X213A-X232V-X245R, X020R-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-
X183D-X213A-X232V-X245R, X024R-X076D-X104I-X232V-X245R,
X018R-X020R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-
X024R-X076D-X101G-X104I-X232V-X249R, X018R-X043D-X078R-
X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X001T-X018R-X024R-X076D-
X116A-X213A-X249R, X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-
X245R, X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X232V-X245R,
X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X045T-
X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X076D-X101G-X104I-
X232V-X245R, X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-
X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-X211Q-X213A-X215F-
X249R, X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043R-

X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X022W-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X232V-X245R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X232V-X245R, X020R-X101G-X198L-X215F-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X213A-X215F-X249R, X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X211Q-X232V-X245R, X020R-X022W-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X215F-X232V-X245R, X020R-X022W-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X232V-X245R, X024R-X232V-X245R, X018R-X024R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X024R-X076D-X101A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X213A-X249R, X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X213A-X215F-X249R, X043D-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X020R-X022W-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X215V-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X211Q-X249R, X020R-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X22W-X101A-X103A-X104I-X211Q-X215F-X232V-X245R, X024R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X101G-X103A-X104I-X116A-X232V-X245R, X018R-X22W-X024R-X076D-X198L-X215F-X249R, X020R-X022W-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X211Q-X213A-X232V-X245R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X043R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X22W-X024R-X076D-X101A-X215F-X249R, X020R-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-X180A-X232V-X245R, X020R-X022W-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X215F-X232V-X245R, X018R-

X101G-X103A-X104I, X020R-X22W-X101A-X103A-X104I-X116A-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X103A-X232V-X245R, X020R-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X211Q-X249R, X020R-X101A-X103A-X104I-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X020R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X211Q-X232V-X245R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X211Q-X215F-X232V-X245R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X211Q-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X232V-X249R, X018R-X024R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X076D-X245R, X024R-X104I-X245R, X101G-X232V, X020R-X22W-X101A-X103A-X104I-X116A-X211Q-X215F-X232V-X245R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X213A-X249R, X020R-X022W-X078R-X101A-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X022W-X078R-X101A-X103A-X104I-X198L-X232V-X245R, X024R-X245R-X249R, X020R-X101G-X103A-X104I-X116A-X211Q-X232V-X245R, X018R-X22W-X024R-X076D-X116A-X211Q-X249R, X024R-X101G-X104I-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X104I, X020R-X022W-X078R-X101A-X103A-X104I-X183D-X198L-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X020R-X22W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X213A-X249R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X232V-X245R, X012H-X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-X198L-X211Q-X213A-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-X211Q-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X213A-X249R, X024R-X104I-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X211Q-X249R, X018R-X076D-X103A-X104I-X249R, X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-X183D-X211Q-X213A-X232V-X245R-X271G, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X215F-X249R, X018R-X024R-X043D-X076D-X101G-

X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-X198L-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X213A-X215F-X249R, X020R-X043D-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X22W-X024R-X076D-X101A-X116A-X215F-X249R, X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X022W-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X116A-X211Q-X213A-X215F-X249R, X024R-X103A-X175L-X232V-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X213A-X249R, X020R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X024R-X043R-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X213A-X215F-X249R, X043R-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X245R, X020R-X024R-X043D-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X024R-X232V, X020R-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X232V-X245R, X024R-X076D-X101G-X232V-X245R, X018R-X076D-X101G-X103A-X104I-X249R, X018R-X024R-X076D-X198M-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X22W-X024R-X076D-X101A-X198L-X215F-X249R, X018R-X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X022W-X103A-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X020R-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X232V-X245R, X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X22W-X024R-X076D-X101A-X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X198L-X215F-X249R-X268G, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X211Q-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X211Q-X249R, X101G-X103A-X104I-X245R, X018R-X076D-X101G-

X232V-X245R, X018R-X020R-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X198L-X213A-X249R, X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X020R-X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X043D-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X024R-X103A-X232V, X018R-X024R-X076D-X101A-X211Q-X249R, X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X043R-X045T-X076D-X076T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X273T, X018R-X020R-X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X078R-X101A-X103A-X104I-X183D-X215F-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101G-X232V, X232V-X245R, X043R-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X234I-X245R, X024R-X076D-X103A-X104I-X245R, X020R-X078R-X101A-X103A-X104I-X211Q-X213A-X232V-X245R, X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R-X272V, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X249R, X018R-X103A-X104I-X232V, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X215F-X232V-X245R, X024R-X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X022W-X024R-X076D-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X211Q-X213A-X249R, X020R-X22W-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X232V-X245R, X020R-X022W-X078R-X101G-X103A-X104I-X211Q-X213A-X232V-X245R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X215F-X232V-X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X183D-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X117I-X183D-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X213A-X249R, X018R-X22W-X024R-X076D-X101A-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-

X245R-X249R, X018R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X198L-X232V-X245R, X018R-X043R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X024R-X076D-X116A-X198L-X209H-X213A-X249R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X232V-X245R, X024R-X076D-X101G-X175L-X232V-X245R, X018R-X043D-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X198L-X215F-X232V-X245R, X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X024R-X076D-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X198L-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X215F-X249R, X024R-X076D-X104I-X245R, X027R-X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X024R-X076D-X116A-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X198L-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X043D-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043R-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X22W-X024R-X076D-X116A-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X211Q-X215F-X249R, X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X232V-X245R, X018R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X101G-X104I, X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X020R-X078R-X101A-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X249R, X018R-X024R-

X076D-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X076D-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X211Q-X213A-X249R, X020R-X022W-X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X114T-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X22W-X024R-X076D-X116A-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X249R, X020R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X211Q-X213A-X249R, X018R-X022K-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X232V, X018R-X024R-X076D-X116A-X249R, X020R-X024R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043D-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X211Q-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X043D-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X22W-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X215F-X232V-X245R, X020R-X101G-X103A-X104I-X183D-X211Q-X232V-X245R-, X018R-X024R-X076D-X101A-X198L-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X198L-X249R, X018R-X024R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X213A-X249R, X018R-X043D-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X078R-X101G-X103A-X104I-X116A-X131V-X183D-X213A-X232V-X245R, X018R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X211Q-X249R, X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X024R-X101G-X245R, X024R-X076D-X101G-X245R, X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-

X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X183D-X211Q-X215F-
X249R, X024R-X101G, X018R-X22W-X024R-X076D-X213A-X215F-
X249R, X020R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-
X022W-X101G-X103A-X104I-X183D-X198L-X213A-X215F-X232V-
X245R, X018R-X043D-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-
X269R, X043D-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R,
X024R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R,
X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X198L-X211Q-X215F-X232V-
X245R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X215F-
X232V-X245R, X018R-X020R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-
X245R-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X215F-X249R,
X018R-X104I, X018R-X024R-X076D-X116A-X198L-X215F-X249R,
X018R-X024R-X076D-X088I-X101A-X116A-X198L-X211Q-X215F-
X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X211Q-X213A-
X249R, X043R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-
X269R, X018R-X076D-X101G-X104I-X249R, X018R-X022W-X024R-
X076D-X101A-X213A-X215F-X249R, X018R-X22W-X024R-X076D-
X101A-X116A-X198L-X215F-X249R, X018R-X020R-X101G-X103A-
X104I-X232V-X245R-X249R, X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-
X249R-X269R, X024R-X076D-X245R, X018R-X020R-X043R-X045T-
X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X020R-X024R-
X076D-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-
X198L-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X211Q-X215F-
X249R, X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X22W-
X078R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X215F-X232V-X245R,
X018R-X024R-X076D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X043R-X076D-
X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X043R-X078R-
X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X043D-X101G-
X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-
X101A-X213A-X249R, X020R-X022W-X101A-X116A-X198L-X211Q-

X213A-X215F-X249R, X043R-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X218S-X232V-X245R, X018R-X103A, X020R-X22W-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X215F-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X211Q-X213A-X249R, X024R-X043R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X232V-X245R, X020R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X027R-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X183D-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X104I, X101G-X103A-X104I-X232V-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X198L-X211Q-X249R, X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R-X275S, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X183D-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X198L-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X211Q-X249R, X004M-X018R-X024R-X076D-X116A-X198L-X211Q-X213A-X249R, X104I-X232V-X249R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X215F-X232V-X245R, X020R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X232V-X245R-X274I, X020R-X101A-X103A-X104I-X213A-X232V-X245R, X020R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X232V-X245R, X020R-X024R-X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X103A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-

X183D-X198L-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X198L-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X211Q-X213A-X215F-X249R-X270V, X018R-X043D-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X183D-X232V-X245R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X198L-X213A-X249R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X232V-X245R, X018R-X22W-X024R-X076D-X116A-X198L-X213A-X249R, X043R-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X024R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V, X101G-X249R, X024R-X076D-X101G-X103A-X104I-X175L-X249R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X232V-X245R-X269S, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X213A-X215F-X249R-X260K, X018R-X024R-X076D-X116A-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X198L-X249R, X024R-X076D-X101G-X103A-X104I-X245R, X024R-X076D-X103A-X249R, X018R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X024R-X076D-X198L-X211Q-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X213A-X249R, X020R-X024R-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X043D-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X272D, X018R-X024R-X076D-X116A-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X22W-X024R-X076D-X101A-X198L-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X198L-X249R, X024R-X076D-X101G-X103A-X232V, X024R-X103A-X104I, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X215F-X249R, X024R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X020R-X101G-X103A-X104I-X116A-

X183D-X232V-X245R, X024R-X043D-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X183D-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X020R-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X211Q-X215F-X249R, X020R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X215F-X232V-X245R, X018R-X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X024R-X076D-X198L-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X213A-X249R, X020R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X024R-X076D-X103A-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X211Q-X213A-X215F-X249R, X103A-X104I-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X211Q-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X043D-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X211Q-X213A-X215F-X249R, X016T-X043R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X215F-X249R, X043R-X076D-X101G-X103T-X104I-X232V-X245R-X249R-X269R, X020R-X078R-X101A-X103A-X104I-X115E-X116A-X183D-X211Q-X213A-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X198L-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X249R, X020R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101G, X076D-X101G-X232V-X245R, X018R-X076D-X101G-X103A-X104I-X245R, X018R-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X024R-X076D-X215F-X249R, X018R-X104I-X232V, X043D-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X024R-X076D-X101G-X232V-X249R, X103A-X232V-X245R, X020R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X020R-X024R-

X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X215F-X249R, X024R-X076D-X103A-X104I-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I, X020R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X215F-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X215F-X249R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X020R-X024R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X131T-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X198L-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X211Q-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043R-X101G-X103A-X104I-X245R-X249R, X018R-X076D-X232V-X249R, X018K-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R-X269R, X018R-X020R-X024R-X043D-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X213A-X215F-X249R-X267I, X232V-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X211Q-X213A-X215F-X249R, X076D-X104I-X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X183D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X211Q-X213A-X249R, X024R-X101G-X103A-X232V, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X215F-X249R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X215F-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X116A-X198L-X211Q-X249R, X103A-X232V-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-

X198L-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X249R, X018R-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X020R-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X198L-X213A-X215F-X249R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-X232V-X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X198L-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X211Q-X249R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X232V-X245R-X274I, X024R-X103A-X245R-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X213A-X249R, X018R-X043D-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X213A-X249R, X043D-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X024R-X076D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X183D-X213A-X249R, X103A-X232V, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X249R, X018R-X043R-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X211Q-X215F-X249R, X043R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X198L-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X211Q-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X198L-X249R,

X018R-X024R-X076D-X183D-X198L-X211Q-X249R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X232V-X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X215F-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X249R, X018R-X024R-X076D-X232V, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X249R, X020R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X232V-X245R-X263S, X024R-X076D-X101G-X104I-X232V-X249R, X043R-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X024R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X198L-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X197A-X213A-X215F-X249R, X024R-X101G-X103A, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X211Q-X215F-X249R, X043R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X024R-X104I-X232V, X018R-X024R-X076D-X183D-X211Q-X249R, X020R-X043R-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X150T-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X211Q-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X249R, X024R-X076D-X232V-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116T-X198L-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X022R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X249R, X045T-X101G-X103A-X104I-

X232V-X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X183D-X211Q-X249R, X020R-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X232V-X245R, X076D-X101G-X103A-X245R, X020R-X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X249R, X018R-X22W-X024R-X076D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X183D-X211Q-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X213A-X249R, X043R-X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X249R, X076D-X101G-X104I-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X198L-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X249R, X020R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X249R, X018R-X020R-X024R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X020R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X209H-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X198L-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X076D-X245R, X076D-X101G-X104I-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X211Q-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-

X022W-X024R-X076D-X101A-X211Q-X213A-X249R, X020R-X024R-X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X215F-X249R, X020R-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X215F-X232V-X245R, X101G-X103A-X104I, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X204D-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X198L-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X209V-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X043R-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X198L-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X211Q-X215F-X249R-X269D, X018R-X020R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X213A-X249R, X020R-X022W-X101G-X103A-X104I-X183D-X215F-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X209H-X211Q-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X249R, X076D-X232V-X245R, X043D-X045T-X078R-X101G-X103A-

X104I-X232V-X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X198L-X211Q-X215F-X245R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X213A-X249R, X020R-X024R-X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X215F-X249R, X020R-X090S-X101G-X103A-X104I-X116A-X183D-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X183D-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X249R, X043D-X045T-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X213A-X249R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X020R-X024R-X043D-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X043D-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X076D-X103A-X104I-X232V-X245R, X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X211Q-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X043D-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X076D-X103A-X104I-X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X249R, X018R-X024R-X076D-X101G-X245R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X213A-X215F-X249R,

X043R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X198L-X213A-X215F-X249R, X076D-X104I-X232V-X245R, X027R-X043R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X103A-X104I-X135I-X232V, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X183D-X198L-X211Q-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X249R, X005S-X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X198L-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X198L-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X215F-X249R, X018R-X020R-X043D-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X183D-X198L-X215F-X232V-X245R, X076D-X101G-X103A-X104I-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X183D-X198L-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-

X116A-X183D-X198L-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X211Q-X243D-X249R, X018R-X020R-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X024R-X076D-X101G, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X183D-X215F-X249R, X018R-X043D-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X213A-X245R, X020R-X024R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X020R-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X211Q-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X198L-X211Q-X215F-X249R-X269S, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X183D-X213A-X215F-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X086V-X101A-X183D-X198L-X211Q-X249R, X018R-X076D-X101G-X198T-X232V, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X183D-X249R-X248T, X018R-X076D-X104I-X245R-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-

X183D-X211Q-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-
X183D-X198L-X211Q-X213A-X249R, X043R-X045T-X078R-X101G-
X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X043R-X045T-X101G-X103A-
X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X076D-X101G-X104I, X020R-
X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R,
X043D-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X020R-
X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X249R, X018R-
X076D-X104I, X018R-X020R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-
X245R-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X183D-X211Q-
X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X211Q-X215F-
X249R, X101G-X104I, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-
X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-
X101A-X183D-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-
X076D-X116A-X183D-X215F-X249R-X263D, X018R-X022W-X024R-
X076D-X101A-X183D-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-
X183D-X198L-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-
X198L-X215F-X249R-X269H, X018R-X043D-X045T-X076D-X078R-
X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X045T-X076D-
X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X078R-X101G-
X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X018R-X020R-X022W-X024R-
X076D-X101A-X183D-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X020R-
X024R-X076D-X183D-X198L-X213A-X249R, X018R-X020R-X022W-
X024R-X076D-X116A-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-
X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X211Q-X249R, X018R-X020R-
X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-
X020R-X022W-X024R-X076D-X249R, X020R-X022W-X101G-X103A-
X104I-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X232V-X245R,
X104I-X232V, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-
X183D-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-
X101A-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X018R-

X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X213A-X215F-X249R,
X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X211Q-X213A-
X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X249R,
X043D-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-
X020R-X024R-X076D-X101A-X183D-X198L-X211Q-X249R, X018R-
X020R-X043R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R, X024R-
X043R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R,
X043R-X045T-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X166F-X176P-
X179V-X184T-X187P-X194P, X018R-X022W-X024R-X041E-X076D-
X101A-X160T-X183D-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X022W-
X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-
X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X213A-X249R,
X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X211Q-
X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X198L-X213A-X249R,
X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X211Q-
X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X183D-X211Q-X215F-X249R,
X024R-X076D-X104I, X018R-X076D-X101G-X232V, X018R-X024R-
X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R,
X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X215F-X249R,
X018R-X024R-X031F-X076D-X116A-X183D-X211Q-X213A-X215F-
X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X213A-
X249R-X269S, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-
X215F-X249R, X018R-X043R-X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-
X232V-X245R-X269R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X114T-
X198L-X211Q-X215F-X249R, X024R-X043R-X078R-X101G-X103A-
X104I-X217E-X232V-X245R, X024R-X076D-X103A-X104I-X232V,
X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X211Q-X215F-
X249R, X101G-X104I-X232V, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-
X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-
X198L-X211Q-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X183D-X213A-

X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X183D-X211Q-X215F-X249R,
X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-X116A-X211Q-X213A-X249R,
X018R-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-
X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X215F-X249R-
X260A, X076D-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X211Q-
X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X116A-X211Q-X215F-
X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X213A-X249R, X018R-X020R-
X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X249R, X018R-X020R-
X022W-X024R-X076D-X101A-X183D-X249R, X076D-X104I-X249R,
X020R-X022W-X101A-X103A-X104I-X116A-X183D-X211Q-X213A-
X215F-X232V-X245R, X024R-X043R-X045T-X078R-X101G-X103A-
X104I-X217E-X232V-X245R, X018R-X020R-X022W-X024R-X076D-
X183D-X198L-X215F-X249R, X018R-X076D-X101G-X103A, X020R-
X024R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X018R-X020R-
X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X249R, X101G-X103A-
X232V, X024R-X076D-X101G-X232V, X018R-X022W-X024R-X076D-
X101A-X183D-X198L-X211Q-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-
X101A-X183D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X024R-
X076D-X183D-X198L-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-
X116A-X183D-X198L-X211Q-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-
X116A-X156V-X183D-X211Q-X215F-X249R-X269S, X045T-X076D-
X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X018R-X020R-X024R-
X076D-X101A-X183D-X198L-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-
X076D-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X022W-X024R-
X076D-X101A-X116A-X198L-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-
X022W-X024R-X076D-X116A-X249R, X018R-X076D-X101G, X018R-
X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X213A-X215F-X249R, X018R-
X020R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X198L-X213A-X215F-
X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X211Q-
X249R, X018R-X076D-X232V, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-

X232V-X245R, X018R-X043D-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X022W-X024R-X076D-X183D-X213A-X215F-X249R, X018R-X024R-X076D-X101A-X116A-X211Q-X213A-X237D-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X211Q-X249R-X275S, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X215F-X249R, X024R-X076D, X018R-X024R-X076D-X183D-X211Q-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X116A-X183D-X198L-X213A-X215F-X249R, X076D-X104I-X232V-X249R, X018R-X076D-X103A-X232V, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X116A-X183D-X198L-X211Q-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X183D-X213A-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X101A-X175E-X183D-X211Q-X215F-X249R, X018R-X020R-X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X217E-X232V-X245R-X273E, X020R-X024R-X043D-X045T-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X005S-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X103A-X104I-X232V, X018R-X020R-X024R-X068A-X076D-X101A-X116A-X213A-X215F-X249R, X018R-X022W-X024R-X076D-X101A-X198L-X215F-X249R-X275S, X018R-X024R-X076D-X183D-X198L-X211Q-X213A-X249R, e X043D-X045T-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000338] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X018R-X024R-X043R-X076D-X249R-X269R, X018R-X022R-X024R-X043R-X076D-X249R, X018R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R,

X020R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X043D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X022R-X043R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043R-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X022R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X076D-X078R-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X043R-X076D-X249R, X018R-X024R-X076D-X242R-X249R, X018R-X024R-X076D-X249R-X269R, X018R-X022R-X024R-X076D-X249R, X018R-X024R-X076D-X078R-X249R, X018R-X024R-X043D-X076D-X249R-X269R, X018R-X022R-X024R-X043D-X076D-X249R, X018R-X024R-X043D-X076D-X078R-X249R, X020R-X101G-X103G-X104I-X232V-X245R, X020R-X101G-X103A-X104L-X232V-X245R, X020R-X101G-X103A-X104V-X232V-X245R, X020R-X101G-X103S-X104I-X232V-X245R, X020R-X101G-X103S-X104L-X232V-X245R, X020R-X101S-X103S-X104I-X232V-X245R, X020R-X101S-X103S-X104L-X232V-X245R, X020R-X101A-X103A-X104L-X232V-X245R, X020R-X101S-X103S-X104V-X232V-X245R, X020R-X101S-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X101S-X103A-X104V-X232V-X245R, X020R-X101S-X103G-X104I-X232V-X245R, X020R-X101S-X103G-X104V-X232V-X245R, X020R-X101A-X103A-X104V-X232V-X245R, X020R-X101A-X103S-X104I-X232V-X245R, X020R-X101A-X103S-X104V-X232V-X245R, X018R-X024R-X043R-X076D-X078R-X249R, X024R-X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X249R, X024R-X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X242R-X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X217E-X249R, X018R-X024R-X043R-X076D-X217E-X249R, X018R-X024R-X043D-X076D-X242R-X249R, X018R-X020R-X024R-X043R-X076D-X249R, X020R-X101A-X103G-

X104V-X232V-X245R, X043D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X076D-X217E-X249R-X269R, e X018R-X024R-X076D-X217E-X242R-X249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000339] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X020R-X101A-X103A-X104I-X118R-X232V-X245R, X020R-X024R-X116A-X213A, X043R-X101A-X116A-X215F-X269R, X024R-X043R-X101A-X116A, X024R-X043R-X101A-X116A-X215F-X269R, X020R-X101G-X103A-X104I-X215F-X232V-X245R, X043R-X101A-X269R, X024R-X043R-X116A-X213A-X269R, X020R-X024R-X043R-X045T-X101A-X213A, X024R-X043R-X116A-X215F-X269R, X020R-X024R-X213A-X215F, X020R-X116A-X269R, X024R-X116A-X213A-X269R, X043R-X101A-X116A-X269R, X101G-X103A-X104I-X116A-X213A-X232V-X245R-X269R, X024R-X043R-X045T-X101A-X116A-X215F-X269R, X020R-X043R-X101A-X269R, X101A-X103A-X104I-X213A-X232V-X245R-X269R, X024R-X215F-X269R, X043R-X101A-X116A-X213A-X215F-X269R, X043R-X101A-X213A-X269R, X020R-X024R-X043R-X045T-X116A-X213A, X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X024R-X043R-X045T-X101A-X116A-X213A-X269R, X024R-X043R-X045T-X269R, X020R-X043R-X045T-X101A-X269R, X024R-X043R-X116A-X269R, X020R-X024R-X043R-X045T, X043R-X116A-X269R, X024R-X043R-X101A-X215F-X269R, X024R-X043R-X045T-X213A-X215F-X269R, X020R-X024R-X045T-X269R, X020R-X043R-X101A-X116A-X213A-X215F, X020R-X101G-X103A-X104I-X213A-X215F-

X232V-X245R, X020R-X024R-X045T-X116A-X269R, X020R-X101A-X116A-X269R, X024R-X043R-X215F, X020R-X024R-X213A, X024R-X043R-X101A-X215F, X020R-X024R-X043R-X045T-X116A, X020R-X024R-X043R-X045T-X101A-X269R, X020R-X024R-X101A-X215F, X020R-X024R-X116A-X213A-X215F, X020R-X024R-X116A, X020R-X024R-X101A-X116A, X043R-X213A-X215F-X269R, X024R-X101A-X269R, X024R-X043R-X116A-X215F, X020R-X038A-X043R-X101A, X020R-X024R-X116A-X215F, X024R-X043R-X101A-X213A, X014L-X020R-X024R-X043R-X045T-X101A-X215F, X020R-X024R-X215F, X020R-X116A-X215F-X269R, X020R-X045T-X116A-X269R, X020R-X024R-X043R-X045T-X215F, e X020R-X024R-X043R-X045T-X116A-X213A-X215F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000340] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X043R-X076D-X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X024R-X043R-X076D-X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F-X271F, X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X076D-X101G-X103A-X104I-X114V-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X024R-X076D-X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X024R-X043R-X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X043R-X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-

X245R-X248D-X249R, X024R-X101A-X103A-X104I-X158E-X166D-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X076D-X101G-X103A-X104I-X128L-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, e X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X158E-X166D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000341] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X022A-X101G-X103A-X104I-X159D-X217E-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X043R-X101G-X103A-X104I-X159D-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X101G-X103A-X104I-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D-X271F, X043R-X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X043R-X076D-X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X183D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X022A-X076D-X101G-X103A-X104I-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X076D-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X076D-X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X043R-X101A-X103A-X104I-

X158E-X166D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X076D-X101A-X103A-X104I-X158E-X166D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X076D-X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101A-X103A-X104I-X158E-X166D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X043R-X076D-X101A-X103A-X104I-X158E-X166D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X101G-X103A-X104I-X158E-X166D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X076D-X101A-X103A-X104I-X158E-X166D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X101G-X103A-X104I-X158E-X183D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128L-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X076D-X101G-X103A-X104I-X158E-X166D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X043R-X076D-X101A-X103A-X104I-X158E-X166D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, e X076D-X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000342] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X017R-X022A-X076D-X101G-X103A-X104I-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X043R-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X101G-X103A-X104I-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X017R-X022A-X076D-X101G-

X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X076D-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, X022A-X101G-X102A-X103A-X104I-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D-X271F, e X022A-X043R-X076D-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000343] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X101S-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101S-X103G-X104V-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103S-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101A-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101A-X103A-X104L-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103G-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101S-X103G-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101S-X103S-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101S-X103S-X104V-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101A-X103S-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101A-X103S-X104I-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101S-X103A-X104I-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104L-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101A-X103A-X104L-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101A-X103S-X104L-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103S-X104L-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101S-X103A-X104L-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101A-X103G-X104V-X159E-X232V-X245R-X248D-

X249R, e X101S-X103A-X104V-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000344] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X026F-X051W-X104L-X106E, X026F-X031F-X078N-X102A-X160D, X020K-X100S-X116L-X158E-X166D-X243F, X033S-X043W-X218D-X239G-X243F, X022L-X038F-X048R-X062E-X100S-X186K, X101D-X103N-X116L-X144R-X215D, X104L-X105T-X213A-X217E-X256N, X043W-X101D-X212M-X243F, X026F-X048R-X105T-X213A-X218D-X224A, X024F-X101D-X118R-X215D-X250I-X272F, X121F-X185E-X224A-X239G, X022L-X031F-X102A-X128D-X224A-X243F, X062E-X078N-X102A-X116L-X144R-X250I, X022L-X038F-X121F-X160D-X272F, X026F-X078N-X159C-X186K-X243F, X024F-X048R-X118R-X166D-X217E, X023A-X038F-X078N-X100S-X212M-X215D, X100S-X116L-X158E-X213A, X078N-X104L-X118R-X128D, X102A-X103N-X105T-X194E, X022L-X078N-X128D-X213A, X027R-X100S-X118R-X160D-X188D-X243F, X024F-X102A-X186K-X213A-X217E-X243F, X033S-X105T-X188D-X216F, X023A-X100S-X194E-X212M, X048R-X128D-X185E-X239G, X020K-X024F-X033S-X129E-X194E, X020K-X027R-X129E-X166D-X239G, X022L-X023A-X027R-X101D-X104L-X216F, X033S-X118R-X129E-X194E-X239G, X022L-X078N-X116L-X129E-X256N, X027R-X101D-X103N-X105T-X272F, X048R-X078N-X116L-X185E-X217E-X239G, X023A-X024F-X027R-X062E, X024F-X103N-X104L-X118R-X188D, X026F-X104L-X256N-X272F, X024F-X043W-

X104L-X121F-X129E, X062E-X078N-X116L-X224A, X023A-X024F-X051W-X158E, X027R-X038F-X102A-X116L, X062E-X078N-X144R-X212M, X031F-X116L-X256N-X272F, X022L-X033S-X104L-X116L-X160D-X186K, X024F-X118R-X129E-X186K-X213A, X043W-X105T-X213A-X215D-X216F, X031F-X105T-X186K-X188D, X026F-X194E-X213A-X256N, e X103N-X160D-X250I-X256N, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000345] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X022A-X024R-X101D-X103A-X104I-X118R-X159D-X188D-X232V-X248D-X271F, X022A-X024R-X103A-X104I-X129E-X159D-X188D-X232V-X248D-X271F, X022A-X024R-X103A-X104I-X118R-X159D-X188D-X217D-X232V-X248D, X022A-X024R-X101D-X103A-X104I-X118R-X129E-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101D-X103A-X104I-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X043R-X103A-X104I-X118R-X129E-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X043R-X103A-X104I-X118R-X128I-X129E-X159D-X188D-X232V-X248D, X022A-X043R-X101D-X103A-X104I-X118R-X129E-X159D-X188D-X232V-X248D-X271F, X022A-X024R-X043R-X101D-X103A-X104I-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X103A-X104I-X159D-X188D-X232V-X248D, X022A-X024R-X103A-X104I-X118R-X129E-X159D-X188D-X232V-X248D-X271F, X022A-X024R-X103A-X104I-X159D-X188D-X217D-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X043R-X062E-X103A-X104I-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X043R-X103A-X104I-X129E-X159D-X188D-

X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X103A-X104I-X159D-X188D-X217D-X232V-X248D-X271F, X022A-X103A-X104I-X118R-X159D-X188D-X217D-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X101D-X103A-X104I-X118R-X128I-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X024R-X043R-X103A-X104I-X159D-X188D-X217D-X232V-X248D-X271F, X022A-X043R-X103A-X104I-X118R-X159D-X188D-X217D-X232V-X248D-X271F, X022A-X043R-X103A-X104I-X118R-X159D-X188D-X232V-X248D-X271F, X022A-X103A-X104I-X128I-X129E-X159D-X188D-X232V-X248D-X271F, X022A-X103A-X104I-X159D-X188D-X217D-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X043R-X103A-X104I-X128I-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X101D-X103A-X104I-X118R-X159D-X188D-X217D-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X103A-X104I-X118R-X129E-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D-X271F, X022A-X024R-X043R-X103A-X104I-X118R-X159D-X188D-X217D-X232V-X248D, X022A-X062E-X103A-X104I-X118R-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X043R-X101D-X103A-X104I-X118R-X129E-X159D-X188D-X217D-X232V, X022A-X024R-X103A-X104I-X159D-X188D-X217D-X232V-X248D, X022A-X024R-X043R-X103A-X104I-X118R-X128I-X129E-X159D-X188D-X217D-X232V-X248D-X271F, e X022A-X103A-X104I-X118R-X159D-X188D-X217D-X232V-X245R-X248D-X271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000346] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X020K-X024F-X062E-X188D-X239G, X024F-X062E-X116L-X239G, X020K-

X023A-X062E-X188D, X020K-X023A-X024F-X062E-X118R-X188D-X213A, X020K-X043W-X062E-X116L-X188D-X213A-X239G, X023A-X062E-X116L-X118R, X023A-X024F-X062E-X116L-X118R, X024F-X116L, X024F-X062E-X188D-X213A, X023A-X062E-X116L-X118R-X188D-X239G, X020K-X024F-X062E, X020K-X043W-X062E-X116L-X239G, X024F-X062E-X116L-X213A-X239G, X020K-X024F-X043W-X062E-X116L-X213A, X020K-X023A-X024F-X062E-X116L-X188D-X213A, X024F-X062E-X188D-X239G, X023A-X043W-X062E-X116L-X118R-X213A, X062E-X188D-X239G, X020K-X024F-X062E-X239G, X024F-X116L-X118R-X188D-X239G, X020K-X023A-X062E-X116L-X118R-X213A, X020K-X023A-X024F-X062E-X188D-X213A-X239G, X024F-X043W-X118R-X188D, X023A-X024F-X116L-X118R-X188D-X213A, X020K-X023A-X043W-X116L-X188D-X213A-X239G, X023A-X024F-X116L-X188D-X239G, X023A-X043W-X116L-X118R-X188D, X023A-X024F-X118R-X188D-X239G, X023A-X024F-X043W-X062E-X116L-X118R, X020K-X043W-X188D-X213A, X024F-X062E-X118R-X239G, X023A-X043W-X188D-X213A, X020K-X024F-X043W-X062E-X116L-X118R-X188D-X239G, X020K-X116L-X188D-X239G, X020K-X043W-X062E-X118R, X020K-X043W-X116L-X188D-X213A, X020K-X024F, X023A-X043W-X116L-X239G, X023A-X024F-X043W-X116L-X118R-X188D-X239G, X020K-X023A-X043W-X213A, e X023A-X024F-X062E-X118R-X213A-X239G, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000347] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X020K-

X023A-X043W-X118R-X128I-X129E-X159D-X188D, X024F-X118R-X128I-X129E-X159D, X020K-X024F-X062E-X116L-X118R-X188D, X020K-X062E-X116L-X188D, X062E-X116L-X118R-X213A, X020K-X023A-X062E-X116L-X188D, X062E-X116L-X118R-X188D, X020K-X062E-X116L-X213A, X020K-X023A-X062E-X116L, X020K-X062E-X188D-X213A, X020K-X062E, X020K-X024F-X062E-X116L-X188D, X020K-X043W-X062E-X116L-X188D, X020K-X024F-X062E-X188D-X213A, X062E-X116L-X188D-X213A, X020K-X062E-X116L, X020K-X023A-X062E-X116L-X188D-X213A, X023A-X024F-X062E-X116L-X213A, X022A-X043R-X103A-X104I-X128I-X129E-X159D-X188D-X232V-X245R-X248D, X022A-X043R-X103A-X104I-X118R-X128I-X129E-X159D-X188D-X232V-X248D-X271F, X024F-X062E-X116L-X188D, X022A-X024R-X103A-X104I-X118R-X128I-X129E-X159D-X188D-X232V-X248D, X023A-X062E-X116L-X188D, X043W-X062E-X116L, X020K-X023A-X116L-X188D, X043W-X062E-X116L-X188D, X024F-X062E-X116L, X062E-X116L-X188D, e X022A-X024R-X103A-X104I-X128I-X159D-X188D-X232V-X248D, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000348] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X087R-X101G-X103A-X104I-X109R-X212P-X232V-X245R-X271V, X101G-X103A-X104I-X109R-X232V-X245R, X101G-X103A-X104I-X109R-X212P-X232V-X245R-X271V, X101G-X103A-X104I-X109R-X212P-X232V-X245R, X076D-S87R-X103A-X104I-X212P-X271V, X076D-X103A-X104I-X109R, X076D-X103A-X104I-X212P-X271V, X076D-

X103A-X104I-X109R-X245R, e X076D-X103A-X104I-X212P-X245L-X271V, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000349] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X024R-X086W-X118R, X024R-X078R-X086W-X243F, X024R-X033S-X086S-X087N-X209A, X033S-X118R, X024R-X078R-X086W-X118R-X270T, X024R-X033S-X086W-X118R, X078R-X086W-X243F, X033S-X078R-X086W-X118R-X209A, X033S-X078R-X209A, X086W-X118R-X243F, X024R-X086W, X078R-X086W-X235F, X024R-X118R, X024R-X086R, X101G-X103A-X104I-X232V, X024R-X033S-X078R-X086W-X118R, X024R-X118R-X209A, X209A-X241R, X033S-X086W-X243F, X033S-X172V-X209A, X118R-X209A-X243F, X024R-X086S-X141G, X024R-X118R-X209A-X243F, X024R-X033S-X086S-X085N-X235F, X024R-X033S-X133V, X024R-X033S-X078R-X086W, X024R-X086W-X209A, X024R-X241R, X033S-X118R-X243F, X024R-X235F, X024R-X078R-X086W, X024R-X118R-X209A-X235F, X024R-X209A-X241R, X033S-X118R-X241R, X086W-X118R-X209A, X033S-X118R-X159D-X209A, X033S-X078R-X086W, X024R-X086W-X243F, X118R-X209A, X024R-X086W-X118R-X203I, X078R-X209A-X235F, X024R-X033S-X241R, X078R-X118R, X033S-X118R-X209A-X243F, X021M-X024R-X033S, X024R-X033S-X086W, X033S-X235F, X078R-X086W-X209A, X024R-X033S-X209A-X235F, X033S-X086W-X118R, X024R-X033S-X078R-X209A, X033S-X086W-X118R-X209A-X243F, X086W-X209A-X243F, X005S-X078R-X118R-X241R, X024R-X174T, X033S-X209A-X243F,

X086W-X118R-X133V, X024R-X033S-X118R, X024R-X086W-X209A-X235F, X086W-X209A, X008T-X024R, X086W-X118R, X033S-X241R, X005S-X024R-X033S-X243F, X024R-X209A-X242P, X024R-X033S-X078R-X118R, X024R-X033S-X194T, X024R-X243F, X024R-X209A, X024R-X033S-X118R-X209A, X033S-X086W, X024R-X033S, X024R-X033S-X078R-X243F, X086W-X243F, X033S-X118D-X138V-X209A, X033S-X209A-X235F, X024R-X086R-X118R, X033S-X201S, X024R-X239Q, X033S-X118R-X209A-, X078R-X086W, X235F-X243F, X024R-X209A-X235F, X118R-X172V, X017Y-X024R-X033S-X086W, X033S-X148F, X024R-X118R-X235F, X033S-X078R, X033S-X243F, X024C-X033S, X118R-X194T, X033S-X209A, X118R-X209A-X235F, X024R-X033S-X209A-X243F, X024R-X033S-X235F, X024R-X033S-X118R-X235F, X024R-X141G, X024R-X274I, X024R-X033S-X209A, X086W-X235F, X024R-X209A-X243F, X004E-X033S-X078R, X086W-X209A-X235F, X015T-X033S, X033S-X086W-X156L-X209A, X024R-X118R-X243F-X269H, X209A-X235F, X024R-X247H, X024R-X033S-X228T, X078R-X235F, X024R-X033S-X174V-X235F, X024R-X235F-X243F, X024R-X033S-X235F-X241R, X024R-X033S-X151V, X024R-X104A, X033S-X048T, X012H-X104A-X118R, X118R-X235F, X033S-X253A, X143A-X209A, X024R-X033S-X243F, X033S-X239T, X209A-X243F, X024R-X033S-X129H-X184D-X253M, X024R-X085V-X086W-X118R-X235F, X024R-X272P, e X024R-X269C, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000350] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X020R-

X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X020R-X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R, X018R-X020R-X024R-X076D-X087D-X249R, X018R-X020R-X024R-X076D-X150L-X249R, X018R-X024R-X043R-X076D-X087D-X249R, X018R-X024R-X043R-X076D-X150L-X249R, X018R-X024R-X076D-X078R-X087D-X249R, X018R-X024R-X076D-X078R-X150L-X249R, X018R-X024R-X076D-X087D-X249R-X269R, X018R-X024R-X076D-X087D-X242R-X249R, X018R-X024R-X076D-X087D-X150L-X249R, X018R-X024R-X076D-X150L-X249R, X018R-X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R, X018R-X022R-X024R-X076D-X087D-X249R, X018R-X022R-X024R-X076D-X150L-X249R, X043R-X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X043R-X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R, X024R-X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X024R-X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R, X078R-X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X078R-X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R, X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X269R, X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R-X249R, X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R-X269R, X022R-X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X018R-X024R-X043D-X076D-X150L-X249R, X043R-X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X022R-X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R, X018R-X024R-X043D-X076D-X087D-X249R, X018R-X024R-X076D-X087D-X249R, X018R-X024R-X076D-X150L-X242R-X249R, X043R-X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R-X269R, X076D-X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R, X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X242R-X245R, X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X245R, X076D-X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X087D-X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, e X101G-X103A-X104I-X150L-X232V-X242R-X245R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de

aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000351] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X024R-X101G-X103A-X104I-X129Q-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X130A-X158E-X183D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129Q-X158E-X183D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X130A-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129Q-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X130A-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129Q-X130A-X158E-X183D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128L-X129Q-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129Q-X130A-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X129Q-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X129Q-X130A-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128L-X129Q-X130A-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X128L-X129Q-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, e X024R-X027R-X101G-X103A-X104I-X128L-X129Q-X130A-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000352] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codifi-

cam uma variante de subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X101G-X103A-X104I-X232V-X222Q-X245R, X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X222S-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X222Q-X232V-X245R-X248D-X249R, X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X222Q-X245R, X101G-X103A-X104I-X232V-X222S-X245R, X076D-X101G-X103A-X104I-X232V-X222S-X245R, e X076D-X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X222S-X232V-X245R-X248D-X249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000353] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X024R-X101G-X103A-X104I-X128L-X129Q-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X130A-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X128L-X129Q-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X129Q-X130A-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X130A-X158E-X183D-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128L-X129Q-X130A-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X129Q-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X128L-X130A-X158E-X188D-X217E-X232V-

X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128L-X129Q-X158E-X183D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128L-X129Q-X130A-X158E-X183D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128L-X129Q-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R-X271G, X101G-X103A-X104I-X129Q-X158E-X183D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X130A-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, X024R-X101G-X103A-X104I-X128L-X158E-X183D-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X129Q-X158E-X188D-X217E-X232V-X245R-X248D-X249R, e X024R-X101G-X103A-X104I-X128L-X130A-X158E-X188D-X232V-X245R-X248D-X249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000354] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X101G-X103A-X104I, X22A-X101A-X209E, S103G-L111V-G159E, X22A-X103G-X159E, X22A-X111V-X159E, X22A-X128N-X271F-X209E, X22A-X103G-X111V, X62E-X111V-X128N, X22A-X111V-X128N, X22A-X62E-X111V, X101A-X103G-X104L-X188D, X101G-X103A-X104I-X159D, X101A-X103G-X104L-X128N, X22A-X101A-X159E, X101A-X103G-X104L, X101A-X103G-X104L-X159E, X22A-X101A-X103G-X104L, X101A-X103G-X104L-X209E, X22A-X209E-X271F, X22A-X101A-X271F, e X101A-X209E-X271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B.*

amyloliquefaciens apresentada como SEQ ID NO:1.

[000355] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam variantes de subtilisina de *Bacillus* de uma subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X103A-X104I-X159D-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X104I-X159D-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X159D-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X159D-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X159D-X232V-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X159D-X232V-X236H-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X159D-X232V-X236H-X245R-X252K, e X101G-X103A-X104L-X159D-X232V-X236H-X245R-X248D, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000356] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X238R, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X248R, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X253R, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X24R, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X76D, X101G-X103A-X104I-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-

X103A-X104I-X159E-X232V-X245R-X248D-X271F, X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X245R-X248D-X271F, X22A-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X249R, X22A-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X62E-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X249R, e X62E-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000357] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X20R-X43R-X249R, X20R-X22R-X43R, X20R-X43R-X242R, X20R-X43R-X271L, X20R-X43R-X244R, X20R-X24R-X43R-X242R, X9A-X22R-X78R-X212F-X241R, X9A-X20R-X43R-X212F, X9A-X43R-X212F, X20R-X43R-X212F, X20R-X22R-X43R-X212F, X24R-X78R-X212F, X9A-X43R-X78R, X9A-X43R-X78R-X242R, X9A-X20R-X43R-X78R, X20R-X24R-X43R-X78R-X242R, X22R-X24R-X78R-X212F, X9A-X20R-X43R-X78R-X242R, X20R-X43R-X78R-X249R, X20R-X43R-X78R, X9A-X78R-X212F, X9A-X22R-X43R-X78R, X9A-X20R-X24R-X43R, X9A-X22R-X78R-X212F, X4R-X9A-X22R-X78R-X212F, X20R-X24R-X43R, X1R-X9A-X43R, X20R-X24R-X43R-X115R, X9A-X24R-X43R, X20R-X22R-X24R-X43R, X1R-X24R-X43R, X9A-X20R-X24R-X43R-X242R, X9A-X20R-X22R-X78R-X212F, X9A-X24R-X43R-X244R, X9A-X24R-X43R-X242R, X4R-X9A-X22R-X24R-X212F, e X22R-X24R-X43R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos

da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000358] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* de uma subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R, X101G-X103A-X104I-X159R-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248R, X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X248R, X101G-X103A-X104I-X159R-X232V-X245R-X248R, e X101G, X103A, X104I, X232V, X236H, X245R, e X252K, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000359] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X16S, X22A, X24R, X62E, X76D, X89P, X101A/G, X103G/A, X104L/I, X111V, X128N, X129E, X232V, X148I, X158E, X159D/E, X166D, X186H, X188D, X209E, X236H, X238R, X245R, X248D/R, X249R, X252K/R, X253R, e X271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000360] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codifi-

cam uma subtilisina de *Bacillus*, sendo que a variante de subtilisina é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: N062E-A158E, S103G-A158E, S128N-A158E, A016S-A158E, V104L-A158E, E089P-A158E, L111V-A158E, T022A-A158E, S101A-A158E, L148I-A158E, P129E-A158E, T022A-E089P, A016S-E089P, N062E-E089P, N062E-E271F, A158E-E271F, R186H-E271F, P129E-E271F, L111V-E271F, Y209E-E271F, A016S-E271F, S188D-E271F, T022A-E271F, G159E-E271F, V104L-E271F, S101A-E271F, E089P-E271F, S128N-E271F, S103G-E271F, L148I-E271F, H249R-E271F, N062E-G159E, A016S-G159E, S128N-G159E, L148I-G159E, L111V-G159E, E089P-G159E, T022A-G159E, P129E-G159E, S103G-G159E, V104L-G159E, A158E-G159E, S101A-G159E, A158E-H249R, L111V-H249R, P129E-H249R, N062E-H249R, A016S-H249R, R186H-H249R, L148I-H249R, G159E-H249R, S101A-H249R, S188D-H249R, V104L-H249R, Y209E-H249R, T022A-H249R, S128N-H249R, S103G-H249R, E089P-H249R, T022A-L111V, S101A-L111V, A016S-L111V, V104L-L111V, N062E-L111V, S103G-L111V, E089P-L111V, A016S-L148I, N062E-L148I, T022A-L148I, P129E-L148I, V104L-L148I, S103G-L148I, S128N-L148I, S101A-L148I, E089P-L148I, L111V-L148I, A016S-N062E, T022A-N062E, N062E-P129E, T022A-P129E, S128N-P129E, A016S-P129E, S101A-P129E, V104L-P129E, E089P-P129E, S103G-P129E, L111V-P129E, N062E-R186H, S128N-R186H, S101A-R186H, T022A-R186H, A016S-R186H, A158E-R186H, E089P-R186H, P129E-R186H, G159E-R186H, S103G-R186H, V104L-R186H, L111V-R186H, L148I-R186H, N062E-S101A, T022A-S101A, A016S-S101A, E089P-S101A, N062E-S103G, T022A-S103G, A016S-S103G, S101A-S103G, E089P-S103G, N062E-S128N, A016S-S128N, T022A-S128N, S101A-S128N, V104L-S128N, E089P-S128N, S103G-S128N, L111V-S128N, L111V-S188D,

N062E-S188D, A016S-S188D, L148I-S188D, T022A-S188D, S128N-S188D, S101A-S188D, V104L-S188D, E089P-S188D, P129E-S188D, G159E-S188D, R186H-S188D, S103G-S188D, A158E-S188D, A016S-T022A, A016S-V104L, T022A-V104L, S101A-V104L, N062E-V104L, S103G-V104L, E089P-V104L, G159E-Y209E, L111V-Y209E, S101A-Y209E, A016S-Y209E, S128N-Y209E, L148I-Y209E, P129E-Y209E, N062E-Y209E, T022A-Y209E, S103G-Y209E, A158E-Y209E, S188D-Y209E, V104L-Y209E, E089P-Y209E, e R186H-Y209E, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000361] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: N018R-W241R, G020R-W241R, S024R-W241R, S009A-W241R, G020R-W241R, V004R-W241R, N043R-W241R, S078R-W241R, T022R-W241R, G115R-W241R, A001R-W241R, S212F-W241R, L082R-W241R, N018R-V244R, S024R-V244R, S078R-V244R, G020R-V244R, S212F-V244R, S009A-V244R, L082R-V244R, A001R-V244R, N043R-V244R, T022R-V244R, V004R-V244R, G115R-V244R, W241R-V244R, S242R-V244R, A001R-V004R, S009A-T022R, N018R-T022R, G020R-T022R, V004R-T022R, A001R-T022R, S024R-S242R, N018R-S242R, V004R-S242R, G020R-S242R, S212F-S242R, L082R-S242R, S078R-S242R, A001R-S242R, S009A-S242R, T022R-S242R, G115R-S242R, N043R-S242R, W241R-S242R, N018R-S212F, T022R-S212F, V004R-S212F, S024R-S212F, A001R-S212F, G115R-S212F, G020R-S212F, S009A-S212F, N043R-S212F, S078R-S212F, L082R-S212F, S009A-S078R, G020R-S078R, S024R-S078R, T022R-S078R, N018R-S078R, V004R-S078R, A001R-S078R, N043R-S078R,

T022R-S024R, G020R-S024R, N018R-S024R, A001R-S024R, V004R-S024R, S009A-S024R, V004R-S009A, A001R-S009A, S242R-N269R, S024R-N269R, G020R-N269R, T022R-N269R, H249R-N269R, S212F-N269R, N043R-N269R, V244R-N269R, A001R-N269R, N018R-N269R, S078R-N269R, S009A-N269R, G115R-N269R, W241R-N269R, V004R-N269R, L082R-N269R, N018R-N043R, G020R-N043R, V004R-N043R, T022R-N043R, S009A-N043R, A001R-N043R, S024R-N043R, S009A-N018R, V004R-N018R, A001R-N018R, S024R-L082R, S009A-L082R, N018R-L082R, A001R-L082R, S078R-L082R, G020R-L082R, T022R-L082R, V004R-L082R, N043R-L082R, N043R-H249R, G020R-H249R, V004R-H249R, N018R-H249R, S009A-H249R, S212F-H249R, T022R-H249R, S024R-H249R, G115R-H249R, A001R-H249R, L082R-H249R, S242R-H249R, W241R-H249R, V244R-H249R, S078R-H249R, N018R-G115R, G020R-G115R, T022R-G115R, S078R-G115R, S009A-G115R, V004R-G115R, A001R-G115R, L082R-G115R, N043R-G115R, S024R-G115R, S009A-G020R, N018R-G020R, V004R-G020R, A001R-G020R, S009A-E271L, G020R-E271L, S024R-E271L, V244R-E271L, W241R-E271L, N043R-E271L, T022R-E271L, H249R-E271L, S212F-E271L, G115R-E271L, S242R-E271L, S078R-E271L, V004R-E271L, N269R-E271L, A001R-E271L, N018R-E271L, e L082R-E271L, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000362] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020R-N043R, G020K-N062E, S024F-N116L, G020K-S024F, S024R-A174T, S024R-G118R, S024R-K235F, S024R-P086R, S024R-

P086W, S078R-G118R, T033S-G118R, T033S-K235F, Y209A-W241R, G020R-N076D, N018R-Q245R, S024R-R045T, A232V-Q245R, G118R-A172V, G118R-A194T, I008T-S024R, K235F-N243F, N018R-S103A, N018R-V104I, P086W-G118R, P086W-N243F, P086W-Y209A, S024C-T033S, S024R-A232V, S024R-N243F, S024R-P239Q, S024R-S101G, S024R-S141G, S024R-T033S, S024R-T274I, S024R-Y209A, S078R-P086W, S101G-A232V, T033S-L148F, T033S-P086W, T033S-P201S, T033S-S078R, T033S-W241R, T033S-Y209A, A230E-H249R, A232V-H249R, G118R-K235F, N076D-Q245R, P086W-K235F, S024R-R247H, S024R-V104A, S078R-K235F, S101G-H249R, S103A-A232V, T033S-A048T, T033S-P239T, T033S-T253A, T143A-Y209A, Y209A-K235F, N018R-R045T, Y209A-N243F, S024R-A272P, S024R-R269C, S101G-V104I, V104I-A232V, N076D-H249R, e S024R-N076D sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000363] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020R-N076D, S024R-R045T, A230E-H249R, N018R-R045T, N018R-Q245R, S101G-A232V, S024R-A232V, A232V-Q245R, S024R-S101G, N018R-V104I, N018R-S103A, S101G-H249R, A232V-H249R, S103A-A232V, N076D-Q245R, S101G-V104I, V104I-A232V, N076D-H249R, S024R-N076D, S024F-N116L, G020K-S024F, G020K-N062E, T033S-G118R, S024R-P086W, S024R-G118R, S024R-P086R, Y209A-W241R, S024R-W241R, S024R-K235F, G118R-Y209A, S078R-G118R, T033S-K235F, S024R-A174T, P086W-Y209A, I008T-S024R, P086W-G118R, T033S-W241R, S024R-N243F, S024R-

Y209A, T033S-P086W, S024R-T033S, P086W-N243F, T033S-P201S, S024R-P239Q, S078R-P086W, K235F-N243F, G118R-A172V, T033S-L148F, T033S-S078R, T033S-N243F, S024C-T033S, G118R-A194T, T033S-Y209A, S024R-S141G, S024R-T274I, P086W-K235F, A015T-T033S, Y209A-K235F, S024R-R247H, S078R-K235F, S024R-V104A, T033S-A048T, G118R-K235F, T033S-T253A, T143A-Y209A, T033S-P239T, Y209A-N243F, S024R-A272P, e S024R-R269C, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000364] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: V004R-S009A-G020R-S242R, G020R-N043R-W241R, G020R-S242R-N269R, V004R-S009A-G020R-N043R, V004R-G020R-H249R, N018R-S024R-V244R, S009A-T022R-S212F-W241R, G020R-N043R-N269R, N018R-S024R-S242R, V004R-S009A-N043R-W241R, G020R-N043R-V244R, G020R-T022R-S242R, V004R-G020R-N043R, V004R-S009A-G020R-N043R-S242R, G020R-N043R-S242R, G020R-N043R-S242R-H249R, G020R-S212F-H249R, V004R-S009A-W241R, A001R-S009A-N043R, G020R-N043R-H249R, S009A-G020R-N043R-W241R, G020R-T022R-N043R, G020R-H249R-N269R, G020R-T022R-W241R, V004R-S009A-S024R-N043R-W241R, S009A-N043R-S078R, V004R-G020R-S024R-V244R, G020R-T022R-S078R-S242R, G020R-S024R-S242R-H249R, V004R-S009A-S078R-W241R, S009A-N043R-S078R-S242R, V004R-G020R-S024R, S009A-N043R-S212F, G020R-N043R-S212F, S024R-S078R-S212F, S009A-G020R-S024R-N043R, S009A-T022R-N043R-S078R, G020R-T022R-S212F-W241R, G020R-N043R-S212F-W241R, S009A-N043R-W241R, G020R-

N043R-E271L, G020R-T022R-S078R-W241R, G020R-S024R-N043R-S242R, G020R-T022R-N043R-W241R, S009A-G020R-N043R-S212F, V004R-S009A-G020R-S024R-S242R, G020R-N043R-H249R-E271L, G020R-T022R-S024R-S242R, S009A-T022R-S078R-S212F, G020R-N043R-S242R-E271L, S009A-T022R-S078R-S212F-W241R, V004R-G020R-S024R-H249R, G020R-T022R-E271L, G020R-T022R-N043R-S212F, V004R-G020R-S024R-N043R-S242R, V004R-G020R-S024R-N043R, V004R-S009A-T022R-S078R-S212F, G020R-T022R-S078R-S212F-W241R, e G020R-T022R-N269R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000365] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: N018R-G020R-N043D-R045T-A230E, N018R-N043R-R045T-S242R-H249R, S024R-N043D-H249R, N018R-G020R-R045T, G020R-S024R-N076D-H249R, S024R-N043R-A230E-S242R, N018R-S024R-N043D-A230E, G020R-N076D, N018R-S024R-N043D-N076D-H249R, S024R-N043R-N076D-H249R, N018R-S024R-R045T-S242R, G020R-N043D-N076D-A230E-H249R, G020R-N043R-R045T-S242R, N018R-S024R-N076D-H249R, N018R-G020R-S024R-N043D-R045T-L233I-S242R, S024R-N043R-A230E, N018R-G020R-N043D, N043R-S242R-H249R, G020R-N043R-R045T-A230E, N043R-N076D-S242R-H249R, G020R-S024R-R045T-A230E-S242R, S024R-R045T-N076D-A230E-S242R-H249R, S024R-R045T, S024R-N043R-R045T-N076D-A230E-H249R, N018R-S024R-N043D-R045T-H249R, N018R-N043R-R045T-H249R, S024R-N043R-S242R, N018R-G020R-N043R-N076D-H249R, G020R-S024R-N043D-H249R, G020R-N043R-A230E-S242R, G020R-

N043R-S242R, N018R-N043R-N076D-A230E, G020R-S024R-N043D-S242R, G020R-N043R-A230E, N018R-G020R-N043R-N076D-S242R-H249R, N043D-R045T-N076D-H249R, N018R-N043R-S242R-H249R, N018R-G020R-N043R-R045T-S242R, N018R-G020R-N043D-A230E-S242R, G020R-S024R-N043R-R045T-H249R, S024R-N043R-H249R, G020R-S024R-K27E-N043R-N076D-A230E, S024R-N043R-R045T-S242R, N018R-G020R-S024R-N043R-R045T-N076D-A230E, G020R-N043R-N076D-A230E-H249R, N018R-N043R-R045T-S242R, G020R-S242R-H249R, N018R-N043R-N076D-A230E-S242R-H249R, N018R-S024R-N076D, G020R-S024R-K27R-N043D-S242R-H249R, N018R-G020R-S024R-N043D-N076D-S242R, N018R-N043R-N076D-S242R-H249R, N018R-S024R-N043D-A230E-H249R, N018R-G020R-N043D-H249R, N018R-G020R-N043D-R045T-N076D-S242R, S024R-N043R-N076D-A230E-S242R, G020R-S024R-T38I-N043R-R045T-N076D-S242R-H249R, N018R-G020R-N043R, N018R-S024R-R045T-A230E-S242R, N018R-G020R-H249R, S024R-N043R-N076D, N018R-G020R-S024R-N043R-R045T-N076D-H249R, N018R-N043D-R045T-N076D-S242R-H249R, S024R-N043D-S242R-H249R, N018R-G020R-S024R-N043D-R045T-S242R, G020R-S024R-N043R-N076D, N018R-G020R-N043D-R045T-A230E-S242R, G020R-S024R-N043R-R045T-N076D-S242R-H249R, N018R-N043R-R045T-N076D-S242R, N018R-G020R-N043R-N076D-A230E-S242R, N018R-S024R-N043D-H249R, N018R-S024R-N043R-R045T-A230E-H249R, N018R-G020R-N043R-R045T-N076D-H249R, N018R-S024R-S242R, N018R-N043R-R045T-N076D-A230E-S242R, R045T-S242R-H249R, N018R-S024R-N043D-S242R, N018R-G020R-N043D-R045T-S240P, S024R-N043R-R045T-S242R-H249R, N018R-S024R-V30S-L31S-D32I-T33Q-G34V-I35F, N018R-G020R-N043R-N076D, G020R-N043D-R045T-N076D-S242R-H249R, N018R-S024R-N043D-A230E-S242R, N018R-S024R-N043D-S242R-H249R, S024R-N043D-R045T-S242R-H249R, N043R-A230E-

H249R, S024R-N043R-N076D-A230E-H249R, G020R-S024R-N043D-N076D-H249R, S024R-R045T-S242R-A273V, G020R-S024R-R045T-N076D-S242R-H249R, N018R-S024R-N043D-N076D-S242R, N018R-N043R-N076D-A230E-H249R, N018R-G020R-N043R-R045T-H249R, N018R-N043R-R045T-A230E-S242R, G020R-S024R-N043D-R045T-A230E-S242R, N018R-N043D-A230E-H249R, N018R-N043R-N076D-S242R, N018R-G020R-N076D, N018R-G020R-N043D-N076D-S242R-H249R, G020R-S024R-N043D-N076D-S242R-H249R, N043D-S242R-H249R, N018R-G020R-S024R-N043R-N076D, N018R-G020R-N043D-R045T-N076D-H249R, N018R-G020R-N043R-R045T-N076D-A230E-H249R, N018R-N076D-S242R, G020R-N043R-H249R, N018R-N076D-S242R-H249R, N018R-S024R-R045T-A230E-H249R, A230E-H249R, N018R-R045T-H249R, G020R-N043R-N076D, N043R-R045T-H249R, N018R-N043D-N076D-S242R-H249R, N043R-N076D-H249R, N018R-R045T, G020R-N076D-A230E-S242R, G020R-S024R-N043D-R045T, S024R-N043D-N076D-S242R-H249R, G020R-R045T-H249R, N043R-N076D-S153A-H249R, N043R-N076D-A230E-H249R, N018R-N043D-N076D-H249R, e G020R-N043R-N076D-V227I, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000366] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S101G-S103A-V104I-A232V-Q236H-Q245R-N252K, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248R, S101G-S103A-V104I-G159R-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R, e S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248D,

sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000367] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D, A016S-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-

A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-

Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-
Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-
A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-
P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-
P129E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-
P129E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-
V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-
S103A-V104I-P129E-L148I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D,
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-Q245R-N248D-
H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-N238R-
Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-
A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-
A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-
V104I-S128N-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-
S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-
S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-
N248D, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D,
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-Q245R-
N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-S188D-
A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-
Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-
A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-
G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-
P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-
V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-
N248D, S101G-S103A-V104I-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D,
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-
H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-A232V-
Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-

N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-G159E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024K-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-L148I-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-S128N-

P129E-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-L148I-G159E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, e S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000368] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de:

T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, A016S-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-

S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, e S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000369] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: V104L-S128N-A158E-R186H-H249R, S128N-A158E-S188D-H249R, N062E-S128N-A158E-G159E-E271F, N062E-A158E-S188D-H249R-E271F, N062E-A158E-R186H-H249R-E271F, S128N-A158E-S188D-Y209E-E271F, N062E-G159E-S188D-H249R, A016S-N062E-A158E-R186H-H249R, N062E-A158E-G159E-H249R, S101A-S128N-A158E-Y209E-H249R, S128N-A158E-R186H-E271F, N062E-A158E-S188D-H249R, N062E-A158E-R186H-E271F, N062E-A158E-R186H-H249R, N062E-S101A-R186H-H249R, N062E-S101A-A158E-R186H-E271F, N062E-V104L-A158E-S188D-H249R-E271F, N062E-G159E-R186H-H249R, N062E-G159E-H249R, S128N-A158E-R186H-H249R,

S128N-A158E-S188D-E271F, N062E-A158E-H249R, N062E-R186H-S188D-H249R-E271F, S128N-A158E-Y209E-, N062E-S101A-A158E-H249R, V104L-S128N-A158E-R186H-E271F, N062E-S101A-A158E-R186H-H249R-E271F, A016S-N062E-A158E-H249R, N062E-S101A-G159E-H249R, S128N-A158E-R186H-S188D-E271F, S101A-S128N-A158E-R186H-E271F, N062E-S101A-S188D-H249R, S101A-V104L-A158E-R186H-S188D-H249R, N062E-G159E-H249R-E271F, S128N-A158E-G159E-E271F, A016S-N062E-V104L-A158E-R186H-E271F, T022A-S128N-A158E-H249R, S128N-A158E-H249R, N062E-S101A-V104L-A158E-R186H-E271F, A016S-N062E-A158E-R186H-E271F, V104L-S128N-A158E-H249R, V104L-S128N-A158E-S188D-H249R, T022A-N062E-A158E, N062E-S101A-S188D-H249R-E271F, N062E-A158E-H249R-E271F, V104L-S128N-A158E-R186H-S188D-E271F, N062E-S101A-R186H-E271F, N062E-V104L-G159E-H249R, N062E-R186H-H249R, N062E-S101A-R186H-H249R-E271F, S101A-A158E-R186H-S188D-H249R, N062E-S101A-R186H, S101A-S128N-P129E-R186H-H249R, S101A-S103G-A158E-R186H-H249R, A016S-N062E-V104L-R186H-S188D-E271F, V104L-A158E-R186H-H249R, S101A-S128N-A158E-S188D-Y209E-E271F, N062E-S101A-R186H-S188D-E271F, A016S-N062E-A158E-H249R-E271F, N062E-S128N-A158E, N062E-S128N-G159E-H249R, N062E-S101A-A158E-S188D-H249R, S101A-S128N-A158E-H249R, N062E-A158E-R186H-S188D-H249R, A016S-V104L-A158E-R186H-E271F, N062E-L148I-G159E, N062E-S101A-A158E-R186H-H249R, N062E-S101A-R186H-S188D-H249R, V104L-A158E-R186H-S188D-H249R, N062E-S101A-V104L-R186H-S188D-E271F, T022A-S101A-A158E-R186H-H249R, S101A-S128N-A158E-Y209E, A158E-R186H-S188D-H249R-E271F, V104L-A158E-R186H-S188D-H249R-E271F, S101A-V104L-A158E-R186H-H249R, V104L-A158E-H249R, S101A-V104L-S128N-A158E-R186H-E271F, A016S-V104L-S188D-H249R, S101A-V104L-A158E-R186H-S188D-

E271F, V104L-S128N-G159E-E271F, V104L-A158E-R186H-H249R-E271F, A158E-R186H-H249R, S101A-A158E-R186H-H249R, V104L-A158E-S188D-H249R-E271F, A016S-S128N-A158E-R186H, V104L-S128N-R186H-S188D-H249R, A016S-S101A-S128N-R186H, A016S-N062E-S128N-R186H-E271F, A016S-S128N-R186H-E271F, S128N-P129E-R186H, A158E-R186H-H249R-E271F, A016S-A158E-H249R, A016S-A158E-R186H-H249R, A016S-T022A-A158E-R186H-E271F, E089P-S101A-P129E-R186H, T022A-S128N-A158E-R186H, S101A-V104L-S128N-A158E-R186H, T022A-S128N-R186H-S188D-, N062E-V104L-A158E-R186H-S188D-H249R, T022A-A158E-R186H-H249R-E271F, T022A-V104L-A158E-H249R, S101A-L111V-P129E, A016S-A158E-H249R-E271F, A016S-L111V-S188D-, T022A-V104L-R186H-S188D-H249R, e V104L-L148I-S188D-H249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000370] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: A001R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, V004R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-E271L, S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, V004R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-E271L, G020R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-G025R-N116A-Y167W, N018R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, T022R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S078R-S103N-S106G-Y167W-Q236N, N018R-N043D-S101G-

S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-S101A-H120F-A194F-H249R, G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S101G-S103A-V104I-S212F-A232V-Q245R, G020R-S144R-N185I-L233C-Q236N, G023A-S078R-S216F-Q236N-H249R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S101G-S103A-V104I-G115R-A232V-Q245R, P052N-S078R-S103N-L148I-T213A, N018R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G025R-E089I-N116A-P239S-A270C, S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, L148I-T213A-N252R, S024R-G025R-N183D-Y192W-P239S, G046R-A194F-S212M, V104L-L217E-T224A-H249R-N252R, G023A-Y091F-V121F-Y192W-Q236N, S101G-S103A-V104I-A232V-V244R-Q245R, S099F-S144R-Y167W-N252R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, T022W-S078R-Y167W-S212M-A270C, V121F-N252R-A270C, G020R-S103N-S216F-Q236N-N252R, N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, G023A-P052N-Y192W-I198L-N252R, G025R-G046R-V121F, S024R-S078R-V104L-N116A-N183D, G046R-Q059A-S103N-G211Q-S212M, G020R-P052N-N062Q-Y091F-Y192W, G023A-P052N-S144R-Y192W-S216F, S101G-S103A-V104I-A232V-S242R-Q245R, P052N-S103N-N116A-L148I-Y192W, E089I-N116A-N117F-T224A-H249R, S144R-G211Q-N238L-P239S-H249R, N043A-N062Q-A194F-G211Q, G020R-S024R-P052N-Q059A-S216F, S024R-Y167W-T224A-H249R, T057R-Y167W-H249R, G025R-S103N-R186K-A194F-T224A, S105T-S128N-S144R-L148I-S212M, G020R-Q059A-S144R-Y192W-T224A, S024R-N043A-N117F-A194F-G211Q, N117F-A194F-T213A-A270C, S078R-Y091F-V121F-L233C-N252R, T057R-S099F-S105T-I198L-T213A, G023A-Y091F-S101A-I198L-N252R, N062Q-S103N-V121F-S144R-H249R, N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-

S242R-Q245R, G023A-S024R-N117F-S212M-S216F, V104L-T213A-S216F, A194F-G211Q-Q236N, N062Q-S103N-N117F-A194F, S024R-N062Q-V104L-S106G-H249R, T057R-E089I-I198L, G046R-Q059A-S106G-L217E-H249R, N117F-T213A-A215F, S101A-H120F-Y192W-A215F-T224A, N043A-T057R-N117F-S144R-N183D, G046R-N183D-N238L, G025R-N043A-E089I-N117F, S078R-V104L-T213A-A215F-T224A, Y091F-S099F-S101A-S105T-Y167W, S106G-N117F-N238L, G046R-E089I-Y091F-S101A-N116A, G020R-N062Q-E089I-R186K-S212M, T057R-S099F-V121F-N185I-Y192W, G046R-E089I-Y192W-L233C-A270C, E089I-N117F-N185I-A215F-L233C, P052N-V104L-N183D-S216F-H249R, S078R-S099F-N116A-R186K-T224A, G025R-S105T-S128N-S144R-A270C, S105T-G211Q-S216F, S024R-G046R-Y091F-V121F, S106G-N185I-S216F-Q236N, N062Q-S101A-Q236N-N252R-A270C, G025R-N043A-Y091F-I198L-A270C, G020R-G023A-V104L-Y192W-L233C, S024R-N043A-S105T-S106G-I198L, G020R-E089I-L217E, S024R-Y091F-I198L-A215F-P239S, G046R-E089I-S099F-R186K-S212M, V104L-H120F-R186K-S216F-N252R, T022W-A194F-T213A-L233C-N238L, S099F-S105T-S106G-A194F-S212M, E089I-S105T-N116A-A215F-S216F, G025R-N116A-H120F-T224A-A270C, N043A-Q059A-S101A-S216F-T224A, T057R-N183D-Q236N, G025R-N062Q-S128N-S144R-N185I, S103N-H120F-Y167W-I198L-L233C, T022W-E089I-S216F, S024R-S106G-N116A-S212M-T224A, G020R-P052N-S101A-I198L-L233C, E089I-Y091F-N185I-G211Q-A270C, L111I-A215F-P239S, S024R-N116A-R186K-L233C-Q236N, e G023A-S103N-S106G-S212M-A215F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000371] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica

tica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de:

G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116S-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-A232V-Q245R, G020R-T22W-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-A232V-Q245R, N018R-V104I-A232V-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-H249R, N018R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N018R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S103A-A232V-H249R, N018R-S101G-V104I-A232V-Q245R, G020R-S024R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R-H249R, N018R-T22K-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T22W-S101G-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R, S024R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T22W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V, N018R-S024R-N076D-N116A-A215F-H249R, N018R-N043R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-T213A-A215F-A232V-Q245R, N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-

T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-G211Q-H249R, N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S101G-Q245R, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-S024R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S101G-S103A-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-N116A-A232V-Q245R, N018R-S101G-V104I-A232V-H249R, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-V104I-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-A215F-A232V-Q245R, S024R-S103A-V104I-H249R, N018R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-S101G-V104I-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, S024R-S103A-V104I-A232V-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-G211Q-A215F-H249R, N018R-Q245R, S024R-S103A-Q245R, S024R-S103A-V104I-Q245R, G020R-S078R-S101G-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-V104I-H249R, N018R-S024R-V104I-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-G211Q-A215F-H249R, R019H-G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T22W-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S103A-

V104I-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-S101G-V104I-A232V, S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R, N018R-S024R-S101G-V104I, G020R-S101A-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R, N018R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S101G-S103A-Q245R, N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-T22W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S101G-V104I-H249R, G020R-T22W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-I198L-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, S024R-N076D-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101G-V104I-A232V-H249R, N018R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, A001T-N018R-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R, N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-A232V-Q245R, N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N076D-

S101G-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-A215F-H249R, R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-S101G-I198L-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-T213A-A215F-H249R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-G211Q-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, S024R-A232V-Q245R, N018R-S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-T213A-A215F-H249R, N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-A215V-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-H249R, G020R-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-G211Q-A215F-A232V-Q245R, S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-A232V-Q245R, N018R-T22W-S024R-N076D-I198L-A215F-H249R, G020R-T022W-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-

A215F-H249R, G020R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-T180A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, N018R-S101G-S103A-V104I, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S103A-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-G211Q-H249R, G020R-S101A-S103A-V104I-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-A232V-H249R, N018R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-N076D-Q245R, S024R-V104I-Q245R, S101G-A232V, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-A215F-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-I198L-A232V-Q245R, S024R-Q245R-H249R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-G211Q-A232V-Q245R, N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-G211Q-H249R, S024R-S101G-V104I-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-V104I, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N183D-I198L-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-G020R-T22W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-A232V-Q245R, Q012H-G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-I198L-G211Q-T213A-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-T213A-H249R, S024R-V104I-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-G211Q-H249R, N018R-N076D-S103A-V104I-H249R, N043R-N076D-S101G-S103A-

V104I-L217E-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R-E271G, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R, G020R-N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-N116A-A215F-H249R, N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, S024R-S103A-M175L-A232V-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R, G020R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, S024R-N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, N043R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-Q245R, G020R-S024R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-A232V, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R, S024R-N076D-S101G-A232V-Q245R, N018R-N076D-S101G-S103A-V104I-H249R, N018R-S024R-N076D-I198M-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R, N018R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T022W-S103A-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R, R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-

N076D-N116A-I198L-A215F-H249R-V268G, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-H249R, S101G-S103A-V104I-Q245R, N018R-N076D-S101G-A232V-Q245R, N018R-G020R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-H249R, S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, G020R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-S103A-A232V, N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-H249R, N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-N043R-R045T-N076D-S076T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-A273T, N018R-G020R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N183D-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101G-A232V, A232V-Q245R, N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-V234I-Q245R, S024R-N076D-S103A-V104I-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-G211Q-T213A-A232V-Q245R, N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R-A272V, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-S103A-V104I-A232V, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, S024R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-T022W-S024R-N076D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R, G020R-T22W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-

M117I-N183D-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-A232V-Q245R, N018R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-Y209H-T213A-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R, S024R-N076D-S101G-M175L-A232V-Q245R, N018R-N043D-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-A215F-A232V-Q245R, N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-A215F-H249R, S024R-N076D-V104I-Q245R, K027R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-A215F-H249R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, N018R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S101G-

V104I, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-N076D-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-H249R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-A114T-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-H249R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022K-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V, N018R-S024R-N076D-N116A-H249R, G020R-S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T22W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N183D-G211Q-A232V-Q245R-, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-H249R, N018R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-H249R, N018R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-A131V-N183D-T213A-A232V-Q245R, N018R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-

Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-H249R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S024R-S101G-Q245R, S024R-N076D-S101G-Q245R, N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-A215F-H249R, S024R-S101G, N018R-T22W-S024R-N076D-T213A-A215F-H249R, G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N183D-I198L-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-N043D-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-I198L-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, N018R-G020R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R, N018R-V104I, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-L088I-S101A-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-H249R, N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-N076D-S101G-V104I-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-T213A-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R-N269R, S024R-N076D-Q245R, N018R-G020R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-A215F-H249R, N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T22W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R,

N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-T213A-H249R, G020R-T022W-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-N218S-A232V-Q245R, N018R-S103A, G020R-T22W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-G211Q-T213A-H249R, S024R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, K027R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-V104I, S101G-S103A-V104I-A232V-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-G211Q-H249R, N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R-R275S, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-H249R, V004M-N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R, V104I-A232V-H249R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R-T274I, G020R-S101A-S103A-V104I-T213A-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R,

G020R-S024R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R,
N018R-S024R-N076D-S103A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-
S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-
N076D-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-
N116A-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-
T213A-A215F-H249R-A270V, N018R-N043D-R045T-N076D-S078R-
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T022W-S101G-
S103A-V104I-N183D-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-
N076D-S101A-N116A-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-
I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-
T213A-H249R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-
A232V-Q245R, N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-
H249R, N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-
N269R, N018R-S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V, S101G-
H249R, S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-M175L-H249R, G020R-
T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R-N269S,
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-H249R, N018R-T022W-
S024R-N076D-N116A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-
N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-T213A-A215F-
H249R-T260K, N018R-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-H249R,
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-H249R, S024R-
N076D-S101G-S103A-V104I-Q245R, S024R-N076D-S103A-H249R,
N018R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-
N076D-I198L-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-
I198L-G211Q-T213A-H249R, G020R-S024R-R045T-S101G-S103A-
V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-G211Q-
T213A-H249R, N018R-N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-
A232V-Q245R-A272D, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-
A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-I198L-H249R,
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-H249R, S024R-N076D-

S101G-S103A-A232V, S024R-S103A-V104I, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, S024R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, N018R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-H249R, G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-N076D-S103A-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, S103A-V104I-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-A215F-H249R, A016T-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-A215F-H249R, N043R-N076D-S101G-S103T-V104I-A232V-Q245R-H249R-N269R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-G115E-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-H249R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101G, N076D-S101G-A232V-Q245R, N018R-N076D-S101G-S103A-V104I-Q245R, N018R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-A215F-H249R, N018R-V104I-A232V, N043D-R045T-

N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-N076D-S101G-A232V-H249R, S103A-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-A215F-H249R, S024R-N076D-S103A-V104I-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A215F-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-A215F-H249R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-A131T-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-S101G-S103A-V104I-Q245R-H249R, N018R-N076D-A232V-H249R, N018R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R-N269R, N018R-G020R-S024R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R-L267I, A232V-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, N076D-V104I-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-H249R, S024R-S101G-S103A-A232V, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-

N183D-G211Q-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-H249R, S103A-A232V-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R, N018R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-G020R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-I198L-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R-T274I, S024R-S103A-Q245R-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-H249R, N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-H249R, S103A-A232V, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-H249R, N018R-N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-T022W-

S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-A232V, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-H249R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R-N263S, S024R-N076D-S101G-V104I-A232V-H249R, N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-V197A-T213A-A215F-H249R, S024R-S101G-S103A, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-A215F-H249R, N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, S024R-V104I-A232V, N018R-S024R-N076D-N183D-G211Q-H249R, G020R-N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-A150T-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-H249R, S024R-N076D-A232V-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-

T022W-S024R-N076D-S101A-N116T-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R, R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-H249R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, N076D-S101G-S103A-Q245R, G020R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-H249R, N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N076D-S101G-V104I-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-H249R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-Y209H-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-

T213A-A215F-H249R, N076D-Q245R, N076D-S101G-V104I-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-H249R, G020R-S024R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N204D-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A209V-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-I198L-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-G211Q-A215F-H249R-N269D, N018R-G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-H249R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N183D-A215F-A232V-

Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-Y209H-G211Q-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R, N076D-A232V-Q245R, N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-A215F-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-T213A-H249R, G020R-S024R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R, G020R-A090S-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N076D-S103A-V104I-A232V-Q245R, R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N076D-S103A-V104I-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-

N116A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-
N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-S101G-
Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-
A215F-H249R, N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-
Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-
A215F-H249R, N076D-V104I-A232V-Q245R, K027R-N043R-R045T-
N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-
N076D-S101A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-
S103A-V104I-L135I-A232V, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-
N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-
S101A-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-
S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-
N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N076D-S101G-S103A-V104I-
A232V-H249R, P005S-N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-T213A-
A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R,
N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-
S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-H249R, N018R-T022W-S024R-
N076D-N116A-N183D-G211Q-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-
N076D-S101A-N116A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-
N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-
S101A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-
N116A-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-
H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-H249R,
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-
T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-
T022W-S024R-N076D-N183D-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-
S101A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-N043D-R045T-
N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-
S103A-V104I-N183D-I198L-A215F-A232V-Q245R, N076D-S101G-
S103A-V104I-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-I198L-

A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-
A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-T213A-H249R,
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-
S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-G020R-S024R-
N076D-G211Q-N243D-H249R, N018R-G020R-R045T-N076D-S101G-
S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-
N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-
N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-
N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, S024R-N076D-
S101G, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-I198L-T213A-A215F-
H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-
H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-A215F-H249R, N018R-
N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R,
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-Q245R,
G020R-S024R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-
H249R, N018R-G020R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-
H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-H249R,
N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-
G020R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R-N269S,
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-
G211Q-A215F-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N183D-
T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-A086V-S101A-
N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-N076D-S101G-I198T-A232V,
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-
A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-
T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-
G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-H249R-
A248T, N018R-N076D-V104I-Q245R-H249R, N018R-T022W-S024R-
N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-
S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-

T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R,
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-H249R, N018R-G020R-S024R-
N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-
N076D-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-
N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N043R-R045T-
S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N043R-R045T-
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-N076D-S101G-
V104I, G020R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-
Q245R-H249R, N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R,
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-
H249R, N018R-N076D-V104I, N018R-G020R-N043D-S101G-S103A-
V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-
N183D-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-
G211Q-A215F-H249R, S101G-V104I, N018R-T022W-S024R-N076D-
N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-
S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-
G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R-N263D, N018R-
T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-
S101A-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-
N076D-N116A-I198L-A215F-H249R-R269H, N018R-N043D-R045T-
N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-
R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R,
S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N018R-G020R-
T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R,
N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-
G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R,
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-H249R,
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-
H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-H249R, G020R-
T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-

A215F-A232V-Q245R, V104I-A232V, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-H249R, N043D-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-N043R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, S024R-N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-Y166F-A176P-A179V-N184T-A187P-A194P, N018R-T022W-S024R-D041E-N076D-S101A-S160T-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-I198L-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-G211Q-A215F-H249R, S024R-N076D-V104I, N018R-N076D-S101G-A232V, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R, N018R-S024R-L031F-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R-N269S, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-A215F-H249R, N018R-N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N114T-I198L-G211Q-A215F-H249R, S024R-N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, S024R-N076D-S103A-V104I-A232V, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-

I198L-G211Q-A215F-H249R, S101G-V104I-A232V, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-H249R, N018R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R-T260A, N076D-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-H249R, N076D-V104I-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, S024R-N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-N076D-S101G-S103A, G020R-S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R, S101G-S103A-A232V, S024R-N076D-S101G-A232V, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-A156V-N183D-G211Q-A215F-H249R-N269S, R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-H249R, N018R-N076D-S101G, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-

A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-N076D-A232V, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-A232V-Q245R, N018R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-N237D-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R-R275S, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, S024R-N076D, N018R-S024R-N076D-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N076D-V104I-A232V-H249R, N018R-N076D-S103A-A232V, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-D175E-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R-A273E, G020R-S024R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, P005S-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S103A-V104I-A232V, N018R-G020R-S024R-V068A-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R-R275S, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, e N043D-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000372] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir

de: N018R-S024R-N043R-N076D-H249R-N269R, N018R-T022R-S024R-N043R-N076D-H249R, N018R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, T022R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, T022R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N043R-N076D-H249R, N018R-S024R-N076D-S242R-H249R, N018R-S024R-N076D-H249R-N269R, N018R-T022R-S024R-N076D-H249R, N018R-S024R-N076D-S078R-H249R, N018R-S024R-N043D-N076D-H249R-N269R, N018R-T022R-S024R-N043D-N076D-H249R, N018R-S024R-N043D-N076D-S078R-H249R, G020R-S101G-S103G-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104L-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104V-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103S-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103S-V104L-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103S-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103S-V104L-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104L-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103S-V104V-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103A-V104V-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103G-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103G-V104V-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104V-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103S-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103S-V104V-A232V-Q245R, N018R-S024R-N043R-N076D-S078R-H249R, S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-S242R-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-L217E-H249R, N018R-

S024R-N043R-N076D-L217E-H249R, N018R-S024R-N043D-N076D-S242R-H249R, N018R-G020R-S024R-N043R-N076D-H249R, G020R-S101A-S103G-V104V-A232V-Q245R, N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-L217E-H249R-N269R, e N018R-S024R-N076D-L217E-S242R-H249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000373] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020R-S101A-S103A-V104I-G118R-A232V-Q245R, G020R-S024R-N116A-T213A, N043R-S101A-N116A-A215F-N269R, S024R-N043R-S101A-N116A, S024R-N043R-S101A-N116A-A215F-N269R, G020R-S101G-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R, N043R-S101A-N269R, S024R-N043R-N116A-T213A-N269R, G020R-S024R-N043R-R045T-S101A-T213A, S024R-N043R-N116A-A215F-N269R, G020R-S024R-T213A-A215F, G020R-N116A-N269R, S024R-N116A-T213A-N269R, N043R-S101A-N116A-N269R, S101G-S103A-V104I-N116A-T213A-A232V-Q245R-N269R, S024R-N043R-R045T-S101A-N116A-A215F-N269R, G020R-N043R-S101A-N269R, S101A-S103A-V104I-T213A-A232V-Q245R-N269R, S024R-A215F-N269R, N043R-S101A-N116A-T213A-A215F-N269R, N043R-S101A-T213A-N269R, G020R-S024R-N043R-R045T-N116A-T213A, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-N043R-R045T-S101A-N116A-T213A-N269R, S024R-N043R-R045T-N269R, G020R-N043R-R045T-S101A-N269R, S024R-N043R-N116A-N269R, G020R-S024R-N043R-R045T, N043R-N116A-N269R, S024R-N043R-S101A-A215F-N269R, S024R-N043R-R045T-T213A-A215F-N269R, G020R-S024R-R045T-N269R, G020R-

N043R-S101A-N116A-T213A-A215F, G020R-S101G-S103A-V104I-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S024R-R045T-N116A-N269R, G020R-S101A-N116A-N269R, S024R-N043R-A215F, G020R-S024R-T213A, S024R-N043R-S101A-A215F, G020R-S024R-N043R-R045T-N116A, G020R-S024R-N043R-R045T-S101A-N269R, G020R-S024R-S101A-A215F, G020R-S024R-N116A-T213A-A215F, G020R-S024R-N116A, G020R-S024R-S101A-N116A, N043R-T213A-A215F-N269R, S024R-S101A-N269R, S024R-N043R-N116A-A215F, G020R-T038A-N043R-S101A, G020R-S024R-N116A-A215F, S024R-N043R-S101A-T213A, P014L-G020R-S024R-N043R-R045T-S101A-A215F, G020R-S024R-A215F, G020R-N116A-A215F-N269R, G020R-R045T-N116A-N269R, G020R-S024R-N043R-R045T-A215F, e G020R-S024R-N043R-R045T-N116A-T213A-A215F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000374] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S024R-N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F-E271F, S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N076D-S101G-S103A-V104I-A114V-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S024R-N043R-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-N043R-S101A-S103A-V104I-A158E-

S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, N076D-S101G-S103A-V104I-S128L-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, e N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000375] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-L217E-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, N043R-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N043R-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R,

S024R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S101G-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S101G-S103A-V104I-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, N076D-S101G-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, e N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000376] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de:

H017R-T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, H017R-T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-

H249R-E271F, T022A-S101G-G102A-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, e T022A-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000377] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S101S-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103G-V104V-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103S-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103A-V104L-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103G-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103G-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103S-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103S-V104V-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103S-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103S-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104L-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103A-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103S-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103S-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103A-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103G-V104V-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, e S101S-S103A-V104V-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequên-

cia de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000378] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: V026F-V051W-V104L-S106E, V026F-L031F-S078N-G102A-S160D, G020K-G100S-N116L-A158E-S166D-N243F, T033S-N043W-N218D-P239G-N243F, T022L-T038F-A048R-N062E-G100S-R186K, S101D-S103N-N116L-S144R-A215D, V104L-S105T-T213A-L217E-S256N, N043W-S101D-S212M-N243F, V026F-A048R-S105T-T213A-N218D-T224A, S024F-S101D-G118R-A215D-L250I-A272F, V121F-N185E-T224A-P239G, T022L-L031F-G102A-S128D-T224A-N243F, N062E-S078N-G102A-N116L-S144R-L250I, T022L-T038F-V121F-S160D-A272F, V026F-S078N-G159C-R186K-N243F, S024F-A048R-G118R-S166D-L217E, G023A-T038F-S078N-G100S-S212M-A215D, G100S-N116L-A158E-T213A, S078N-V104L-G118R-S128D, G102A-S103N-S105T-A194E, T022L-S078N-S128D-T213A, K027R-G100S-G118R-S160D-S188D-N243F, S024F-G102A-R186K-T213A-L217E-N243F, T033S-S105T-S188D-S216F, G023A-G100S-A194E-S212M, A048R-S128D-N185E-P239G, G020K-S024F-T033S-P129E-A194E, G020K-K027R-P129E-S166D-P239G, T022L-G023A-K027R-S101D-V104L-S216F, T033S-G118R-P129E-A194E-P239G, T022L-S078N-N116L-P129E-S256N, K027R-S101D-S103N-S105T-A272F, A048R-S078N-N116L-N185E-L217E-P239G, G023A-S024F-K027R-N062E, S024F-S103N-V104L-G118R-S188D, V026F-V104L-S256N-A272F, S024F-N043W-V104L-V121F-P129E, N062E-S078N-N116L-T224A, G023A-S024F-V051W-A158E, K027R-T038F-G102A-N116L, N062E-S078N-S144R-S212M, L031F-N116L-S256N-A272F, T022L-T033S-V104L-N116L-S160D-R186K, S024F-G118R-P129E-R186K-T213A,

N043W-S105T-T213A-A215D-S216F, L031F-S105T-R186K-S188D, V026F-A194E-T213A-S256N, e S103N-S160D-L250I-S256N, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000379] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de:

T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S024R-S103A-V104I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D, T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D, T022A-N043R-S101D-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S024R-N043R-S101D-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-N248D, T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S024R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-N062E-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-S103A-V104I-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F, T022A-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-S128I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-N043R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-

A232V-N248D-E271F, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S103A-V104I-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-S103A-V104I-S128I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101D-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S024R-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D, T022A-N062E-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-N043R-S101D-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-L217D-A232V, T022A-S024R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D, T022A-S024R-N043R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F, e T022A-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000380] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020K-S024F-N062E-S188D-P239G, S024F-N062E-N116L-P239G, G020K-G023A-N062E-S188D, G020K-G023A-S024F-N062E-G118R-S188D-T213A, G020K-N043W-N062E-N116L-S188D-T213A-P239G, G023A-N062E-N116L-G118R, G023A-S024F-N062E-N116L-G118R, S024F-N116L, S024F-N062E-S188D-T213A, G023A-N062E-N116L-G118R-S188D-P239G, G020K-S024F-N062E, G020K-N043W-N062E-N116L-P239G, S024F-N062E-N116L-T213A-P239G, G020K-

S024F-N043W-N062E-N116L-T213A, G020K-G023A-S024F-N062E-N116L-S188D-T213A, S024F-N062E-S188D-P239G, G023A-N043W-N062E-N116L-G118R-T213A, N062E-S188D-P239G, G020K-S024F-N062E-P239G, S024F-N116L-G118R-S188D-P239G, G020K-G023A-N062E-N116L-G118R-T213A, G020K-G023A-S024F-N062E-S188D-T213A-P239G, S024F-N043W-G118R-S188D, G023A-S024F-N116L-G118R-S188D-T213A, G020K-G023A-N043W-N116L-S188D-T213A-P239G, G023A-S024F-N116L-S188D-P239G, G023A-N043W-N116L-G118R-S188D, G023A-S024F-G118R-S188D-P239G, G023A-S024F-N043W-N062E-N116L-G118R, G020K-N043W-S188D-T213A, S024F-N062E-G118R-P239G, G023A-N043W-S188D-T213A, G020K-S024F-N043W-N062E-N116L-G118R-S188D-P239G, G020K-N116L-S188D-P239G, G020K-N043W-N062E-G118R, G020K-N043W-N116L-S188D-T213A, G020K-S024F, G023A-N043W-N116L-P239G, G023A-S024F-N043W-N116L-G118R-S188D-P239G, G020K-G023A-N043W-T213A, e G023A-S024F-N062E-G118R-T213A-P239G, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000381] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020K-G023A-N043W-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D, S024F-G118R-S128I-P129E-G159D, G020K-S024F-N062E-N116L-G118R-S188D, G020K-N062E-N116L-S188D, N062E-N116L-G118R-T213A, G020K-G023A-N062E-N116L-S188D, N062E-N116L-G118R-S188D, G020K-N062E-N116L-T213A, G020K-G023A-N062E-N116L, G020K-N062E-S188D-T213A, G020K-N062E, G020K-S024F-N062E-N116L-S188D, G020K-N043W-N062E-N116L-S188D, G020K-S024F-

N062E-S188D-T213A, N062E-N116L-S188D-T213A, G020K-N062E-N116L, G020K-G023A-N062E-N116L-S188D-T213A, G023A-S024F-N062E-N116L-T213A, T022A-N043R-S103A-V104I-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, S024F-N062E-N116L-S188D, T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D, G023A-N062E-N116L-S188D, N043W-N062E-N116L, G020K-G023A-N116L-S188D, N043W-N062E-N116L-S188D, S024F-N062E-N116L, N062E-N116L-S188D, e T022A-S024R-S103A-V104I-S128I-G159D-S188D-A232V-N248D, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000382] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S087R-S101G-S103A-V104I-Q109R-S212P-A232V-Q245R-E271V, S101G-S103A-V104I-Q109R-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-Q109R-S212P-A232V-Q245R-E271V, S101G-S103A-V104I-Q109R-S212P-A232V-Q245R, N076D-S87R-S103A-V104I-S212P-E271V, N076D-S103A-V104I-Q109R, N076D-S103A-V104I-S212P-E271V, N076D-S103A-V104I-Q109R-Q245R, e N076D-S103A-V104I-S212P-Q245L-E271V, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000383] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende

uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S024R-P086W-G118R, S024R-S078R-P086W-N243F, S024R-T033S-P086S-S087N-Y209A, T033S-G118R, S024R-S078R-P086W-G118R-A270T, S024R-T033S-P086W-G118R, S078R-P086W-N243F, T033S-S078R-P086W-G118R-Y209A, T033S-S078R-Y209A, P086W-G118R-N243F, S024R-P086W, S078R-P086W-K235F, S024R-G118R, S024R-P086R, S101G-S103A-V104I-A232V, S024R-T033S-S078R-P086W-G118R, S024R-G118R-Y209A, Y209A-W241R, T033S-P086W-N243F, T033S-A172V-Y209A, G118R-Y209A-N243F, S024R-P086S-S141G, S024R-G118R-Y209A-N243F, S024R-T033S-P086S-S085N-K235F, S024R-T033S-A133V, S024R-T033S-S078R-P086W, S024R-P086W-Y209A, S024R-W241R, T033S-G118R-N243F, S024R-K235F, S024R-S078R-P086W, S024R-G118R-Y209A-K235F, S024R-Y209A-W241R, T033S-G118R-W241R, P086W-G118R-Y209A, T033S-G118R-G159D-Y209A, T033S-S078R-P086W, S024R-P086W-N243F, G118R-Y209A, S024R-P086W-G118R-V203I, S078R-Y209A-K235F, S024R-T033S-W241R, S078R-G118R, T033S-G118R-Y209A-N243F, L021M-S024R-T033S, S024R-T033S-P086W, T033S-K235F, S078R-P086W-Y209A, S024R-T033S-Y209A-K235F, T033S-P086W-G118R, S024R-T033S-S078R-Y209A, T033S-P086W-G118R-Y209A-N243F, P086W-Y209A-N243F, P005S-S078R-G118R-W241R, S024R-A174T, T033S-Y209A-N243F, P086W-G118R-A133V, S024R-T033S-G118R, S024R-P086W-Y209A-K235F, P086W-Y209A, I008T-S024R, P086W-G118R, T033S-W241R, P005S-S024R-T033S-N243F, S024R-Y209A-S242P, S024R-T033S-S078R-G118R, S024R-T033S-A194T, S024R-N243F, S024R-Y209A, S024R-T033S-G118R-Y209A, T033S-P086W, S024R-T033S, S024R-T033S-S078R-N243F, P086W-N243F, T033S-G118D-A138V-Y209A, T033S-Y209A-K235F, S024R-P086R-G118R, T033S-P201S, S024R-P239Q, T033S-G118R-Y209A-, S078R-P086W, K235F-N243F, S024R-Y209A-K235F, G118R-A172V,

H017Y-S024R-T033S-P086W, T033S-L148F, S024R-G118R-K235F, T033S-S078R, T033S-N243F, S024C-T033S, G118R-A194T, T033S-Y209A, G118R-Y209A-K235F, S024R-T033S-Y209A-N243F, S024R-T033S-K235F, S024R-T033S-G118R-K235F, S024R-S141G, S024R-T274I, S024R-T033S-Y209A, P086W-K235F, S024R-Y209A-N243F, V004E-T033S-S078R, P086W-Y209A-K235F, A015T-T033S, T033S-P086W-S156L-Y209A, S024R-G118R-N243F-R269H, Y209A-K235F, S024R-R247H, S024R-T033S-A228T, S078R-K235F, S024R-T033S-A174V-K235F, S024R-K235F-N243F, S024R-T033S-K235F-W241R, S024R-T033S-A151V, S024R-V104A, T033S-A048T, Q012H-V104A-G118R, G118R-K235F, T033S-T253A, T143A-Y209A, S024R-T033S-N243F, T033S-P239T, Y209A-N243F, S024R-T033S-P129H-N184D-T253M, S024R-A085V-P086W-G118R-K235F, S024R-A272P, e S024R-R269C, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000384] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-S087D-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-V150L-H249R, N018R-S024R-N043R-N076D-S087D-H249R, N018R-S024R-N043R-N076D-V150L-H249R, N018R-S024R-N076D-S078R-S087D-H249R, N018R-S024R-N076D-S078R-V150L-H249R, N018R-S024R-N076D-S087D-H249R-N269R, N018R-S024R-N076D-S087D-S242R-H249R, N018R-S024R-N076D-S087D-V150L-H249R, N018R-S024R-N076D-V150L-H249R, N018R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R,

N018R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, N018R-T022R-S024R-N076D-S087D-H249R, N018R-T022R-S024R-N076D-V150L-H249R, N043R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, S024R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, S078R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S078R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R-H249R, S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R-N269R, T022R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N043D-N076D-V150L-H249R, N043R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, T022R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, N018R-S024R-N043D-N076D-S087D-H249R, N018R-S024R-N076D-S087D-H249R, N018R-S024R-N076D-V150L-S242R-H249R, N043R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R-N269R, N076D-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-S242R-Q245R, S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, N076D-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, e S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-S242R-Q245R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000385] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-

V104I-P129Q-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-S130A-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, e S024R-K027R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000386] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S101G-S103A-V104I-A232V-M222Q-Q245R, S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-M222S-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-M222Q-A232V-Q245R-N248D-H249R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-M222Q-Q245R, S101G-S103A-V104I-A232V-M222S-Q245R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-M222S-Q245R, e N076D-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-M222S-A232V-Q245R-N248D-H249R, sendo que as posições de aminoácido

da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000387] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-N183D-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S128L-S130A-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-S130A-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271G, S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, e S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, sendo que as posições de aminoácido da vari-

ante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000388] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S101G-S103A-V104I, T22A-S101A-Y209E, S103G-L111V-G159E, T22A-S103G-G159E, T22A-L111V-G159E, T22A-S128N-E271F-Y209E, T22A-S103G-L111V, N62E-L111V-S128N, T22A-L111V-S128N, T22A-N62E-L111V, S101A-S103G-V104L-S188D, S101G-S103A-V104I-G159D, S101A-S103G-V104L-S128N, T22A-S101A-G159E, S101A-S103G-V104L, S101A-S103G-V104L-G159E, T22A-S101A-S103G-V104L, S101A-S103G-V104L-Y209E, T22A-Y209E-E271F, T22A-S101A-E271F, e S101A-Y209E-E271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000389] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S103A-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N252K, e S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-

Q245R-N248D, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000390] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N238R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N248R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-T253R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-S24R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N76D, S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-E271F, T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R, e N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000391] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: A1R, A230E, E271L, G115R, G20R, H249R, K235F, K27V/F/L,

L75E, L82R, N18R, N269R, N43D, N43R, N76D, R45T, S212F, S242R, S24R, S78R, S9A, T22R, V121E, V244R, V28E, V30E, V4R, W241R, G20R-N43R-H249R, G20R-T22R-N43R, G20R-N43R-S242R, G20R-N43R-E271L, G20R-N43R-V244R, G20R-S24R-N43R-S242R, S9A-T22R-S78R-S212F-W241R, S9A-G20R-N43R-S212F, S9A-N43R-S212F, G20R-N43R-S212F, G20R-T22R-N43R-S212F, S24R-S78R-S212F, S9A-N43R-S78R, S9A-N43R-S78R-S242R, S9A-G20R-N43R-S78R, G20R-S24R-N43R-S78R-S242R, T22R-S24R-S78R-S212F, S9A-G20R-N43R-S78R-S242R, G20R-N43R-S78R-H249R, G20R-N43R-S78R, S9A-S78R-S212F, S9A-T22R-N43R-S78R, S9A-G20R-S24R-N43R, S9A-T22R-S78R-S212F, V4R-S9A-T22R-S78R-S212F, G20R-S24R-N43R, A1R-S9A-N43R, G20R-S24R-N43R-G115R, S9A-S24R-N43R, G20R-T22R-S24R-N43R, A1R-S24R-N43R, S9A-G20R-S24R-N43R-S242R, S9A-G20R-T22R-S78R-S212F, S9A-S24R-N43R-V244R, S9A-S24R-N43R-S242R, V4R-S9A-T22R-S24R-S212F, e T22R-S24R-N43R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000392] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-G159R-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248R, S101G-S103A-V104I-G159R-A232V-Q245R-N248R, S101G, S103A, V104I, A232V, Q236H, e Q245R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspon-

dência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000393] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: A16S, T22A, S24R, N62E, N76D, E89P, S101A/G, S103G/A, V104L/I, L111V, S128N, P129E, A232V, L148I, A158E, G159D/E, R186H, S188D, Y209E, Q236H, Q245R, N248D/R, H249R, N252K/R, T253R, e E271F sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000394] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de protease de protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, sendo que a protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* compreende a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:2, sendo que a variante de protease compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou 25 mutações selecionadas do grupo de G20K, G20R, G23A, S24F, S24R, N43R, N43W, R45T, N62E, N76D, S101A, N116A, N116L, G118R, S128I, P129E, S188D, T213A, A215F, L217E, P239G, e N269R, sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1 como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000395] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: A1R, Q2S, Q2M, Q2A, Q2R, Q2W, S3R, V4R, V4S, V4C, I8A, S9A, S9F, S9W, R10S, R10A, R10H, R10M, Q12F, Q12R, P14K, P14F, P14Q, A15R, A15F, A16S, H17R, H17M, H17F, N18R, N18K, G20F, G20K, G20R, T22A, T22R, T22Y, T22V, T22Q, T22L, T22W, G23A, G23S, G23F, S24R, S24F, S24W, S24Q, S24H, S24L, G25V, G25F, G25R, V26F, K27L, K27F, K27R, K27V, V28A, V28N, V28E, A29T, V30E, L31F, T33S, T33G, T33D, G34P, I35M, S36T, S36F, S36R, T38L, T38F, T38R, P40N, P40L, P40T, P40W, P40H, P40R, L42I, N43A, N43F, N43I, N43S, N43R, N43M, N43W, N43D, R45T, G46R, A48R, F50C, V51W, V51F, V51H, P52F, P52E, P52N, P55Y, T57R, Q59A, Q59F, Q59R, D60P, D60Q, D60A, N62E, N62Q, G63V, G63M, G63T, G63I, G63A, G63S, G63H, G63Q, G63D, G63E, G63P, H64F, H64T, V68A, V68C, A69N, A69T, A69P, A69W, T71G, T71G, I72C, A74C, L75A, L75F, L75E, L75R, N76D, S78R, S78N, S78I, S78R, I79W, I79Q, V81R, L82F, L82T, L82V, L82R, L82M, A85M, P86W, P86L, P86I, E89P, E89T, E89G, E89H, E89W, E89L, E89V, E89W, E89F, E89I, Y91N, Y91F, A92F, K94N, S99F, S99T, S99P, S99G, S99M, G100S, G100N, G100Q, G100I, S101A, S101N, S101G, S101D, S101T, S101D, S101E, S101P, S101F, G102A, G102T, G102N, G102H, G102E, S103G, S103N, S103D, S103A, V104L, V104I, V104E, V104D, S105T, S105E, S105Q, S106G, S106T, S106E, S106D, S106A, S106V, S106F, I107M, I107F, A108I, A108G, Q109M, L111V, L111I, E112V, E112L, E112Q, A114G, G115K, G115R, N116K, N116A, N116L, N117F, G118R, G118I, M119C, H120A, H120F, H120R, V121F, V121F, V121E, N123G, N123E, L124S, S128D, S128F, S128L, S128N, S128H, S128M, S128I, S128Q, P129E, S132A,

S132E, A138G, S144R, V147L, L148I, A158E, G159D, G159E, G159C, S160D, S166D, S166E, Y167W, M175V, V177C, D181A, Q182R, N183I, N183D, N183M, N183R, N183F, N183R, N185E, N185V, N185I, R186H, R186K, S188E, S188D, S188R, Y192H, Y192W, A194E, A194V, A194F, D197F, D197F, I198L, I198F, V203E, V203C, T208S, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, Y209L, P210R, P210V, P210L, G211Q, G211R, S212I, S212M, S212F, T213A, Y214F, A215N, A215D, A215E, A215H, A215F, S216F, S216A, L217E, L217N, L217D, N218D, N218P, N218E, T224A, T224G, V227I, A230E, A231I, A231C, A232V, L233C, V234F, K235F, Q236F, Q236N, Q236H, N238R, N238K, N238L, P239K, P239G, P239R, P239R, P239H, P239T, P239N, P239S, P239F, S240R, W241R, S242L, S242R, N243F, N243R, V244R, Q245R, I246S, N248D, N248V, N248I, N248R, H249R, H249T, L250I, K251R, K251S, N252I, N252F, N252R, N252K, N252H, T253I, T253R, T253F, A254C, S256N, G258R, T260V, T260I, L262D, L262H, Y263F, S265F, L267V, L267N, L267M, N269I, N269R, A270C, E271I, E271H, E271V, E271H, E271M, E271L, E271P, E271A, E271F, E271T, A272F, A272F, A272R, A273F, A273I, e T274G, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000396] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, sendo que a protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* compreende a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:2, e sendo que a variante de protease compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou

25 mutações nas posições de aminoácido selecionadas a partir do aminoácido 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 38, 40, 42, 43, 45, 46, 48, 50, 51, 52, 55, 57, 59, 60, 62, 63, 64, 68, 69, 71, 72, 74, 75, 76, 78, 79, 81, 82, 85, 86, 89, 91, 92, 94, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 111, 112, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 123, 124, 128, 129, 132, 138, 44, 147, 148, 158, 159, 160, 166, 167, 175, 177, 181, 182, 183, 185, 186, 188, 192, 194, 197, 198, 203, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 224, 227, 230, 231, 233, 234, 235, 236, 236, 238, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 246, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 256, 258, 260, 262, 263, 265, 267, 269, 270, 271, 272, 273, e 274, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1, sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1 como determinado por alinhamento da sequência de aminoácidos da protease variante com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000397] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, sendo que a protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* compreende a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:2, e sendo que a variante de protease compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, ou 50 mutações selecionadas do grupo de A1R, Q2S,

Q2M, Q2A, Q2R, Q2W, S3R, V4R, V4S, V4C, I8A, S9A, S9F, S9W, R10S, R10A, R10H, R10M, Q12F, Q12R, P14K, P14F, P14Q, A15R, A15F, A16S, H17R, H17M, H17F, N18R, N18K, G20F, G20K, G20R, T22A, T22R, T22Y, T22V, T22Q, T22L, T22W, G23A, G23S, G23F, S24R, S24F, S24W, S24Q, S24H, S24L, G25V, G25F, G25R, V26F, K27L, K27F, K27R, K27V, V28A, V28N, V28E, A29T, V30E, L31F, T33S, T33G, T33D, G34P, I35M, S36T, S36F, S36R, T38L, T38F, T38R, P40N, P40L, P40T, P40W, P40H, P40R, L42I, N43A, N43F, N43I, N43S, N43R, N43M, N43W, N43D, R45T, G46R, A48R, F50C, V51W, V51F, V51H, P52F, P52E, P52N, P55Y, T57R, Q59A, Q59F, Q59R, D60P, D60Q, D60A, N62E, N62Q, G63V, G63M, G63T, G63I, G63A, G63S, G63H, G63Q, G63D, G63E, G63P, H64F, H64T, V68A, V68C, A69N, A69T, A69P, A69W, T71G, T71G, I72C, A74C, L75A, L75F, L75E, L75R, N76D, S78R, S78N, S78I, S78R, I79W, I79Q, V81R, L82F, L82T, L82V, L82R, L82M, A85M, P86W, P86L, P86I, E89P, E89T, E89G, E89H, E89W, E89L, E89V, E89W, E89F, E89I, Y91N, Y91F, A92F, K94N, S99F, S99T, S99P, S99G, S99M, G100S, G100N, G100Q, G100I, S101A, S101N, S101G, S101D, S101T, S101D, S101E, S101P, S101F, G102A, G102T, G102N, G102H, G102E, S103G, S103N, S103D, S103A, V104L, V104I, V104E, V104D, S105T, S105E, S105Q, S106G, S106T, S106E, S106D, S106A, S106V, S106F, I107M, I107F, A108I, A108G, Q109M, L111V, L111I, E112V, E112L, E112Q, A114G, G115K, G115R, N116K, N116A, N116L, N117F, G118R, G118I, M119C, H120A, H120F, H120R, V121F, V121F, V121E, N123G, N123E, L124S, S128D, S128F, S128L, S128N, S128H, S128M, S128I, S128Q, P129E, S132A, S132E, A138G, S144R, V147L, L148I, A158E, G159D, G159E, G159C, S160D, S166D, S166E, Y167W, M175V, V177C, D181A, Q182R, N183I, N183D, N183M, N183R, N183F, N183R, N185E, N185V, N185I, R186H, R186K, S188E, S188D, S188R, Y192H,

Y192W, A194E, A194V, A194F, D197F, D197F, I198L, I198F, V203E, V203C, T208S, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, Y209L, P210R, P210V, P210L, G211Q, G211R, S212I, S212M, S212F, T213A, Y214F, A215N, A215D, A215E, A215H, A215F, S216F, S216A, L217E, L217N, L217D, N218D, N218P, N218E, T224A, T224G, V227I, A230E, A231I, A231C, A232V, L233C, V234F, K235F, Q236F, Q236N, Q236H, N238R, N238K, N238L, P239K, P239G, P239R, P239R, P239H, P239T, P239N, P239S, P239F, S240R, W241R, S242L, S242R, N243F, N243R, V244R, Q245R, I246S, N248D, N248V, N248I, N248R, H249R, H249T, L250I, K251R, K251S, N252I, N252F, N252R, N252K, N252H, T253I, T253R, T253F, A254C, S256N, G258R, T260V, T260I, L262D, L262H, Y263F, S265F, L267V, L267N, L267M, N269I, N269R, A270C, E271I, E271H, E271V, E271H, E271M, E271L, E271P, E271A, E271F, E271T, A272F, A272F, A272R, A273F, A273I, e T274G, sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1 como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000398] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, sendo que a protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* compreende a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:2, e sendo que a variante de protease compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25,

30, 35, 40, 45, ou 50 mutações selecionadas do grupo de A1R, Q2S, V4R, V4S, S9A, R10S, P14K, A16S, H17R, N18R, G20R, T22A, T22R, S24R, S24W, G25R, G25V, V26F, L42I, N43R, N43A, G46R, P52F, P52E, P52N, T57R, Q59A, N62E, N62Q, V68A, V68C, T71G, I72C, A74C. L75A, L75F, L75R, N76D, S78R, L82R, P86W, E89P, E89T, E89G, E89H, E89I, E89V, E89W, Y91N, K94N, G100S, S101A, S101N, S101G, S101D, S103G, S103N, V104L, V104I, S106V, S106G, A108I, L111V, E112V, G115K, G115R, N117F, G118I, V121F, S128D, S128F, S128L, S128N, P129E, S144R, L148I, A158E, G159E, S160D, S166D, N185E, N185I, R186H, S188E, S188D, D197F, V203E, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, P210R, S212I, S212F, Y214F, A215N, A215D, A215E, L217E, L217N, T224A, A230E, A231I, Q236F, N238R, N238K, P239K, P239G, P239R, P239S, W241R, S242R, S242L, N243R, V244R, N248I, N248V, H249R, L250I, N252R, T253R, L262D, Y263F, S265F, L267V, L267N. N269I, N269R, E271F, E271I, E271H, E271P, E271T, E271V, E271L e A272F, e compreende, opcionalmente, pelo menos uma mutação selecionada a partir do grupo de S103A, G159D, Q236H, Q245R, N248D e N252K, sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000399] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, sendo que a protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* compreende a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:2, e sendo que a variante de protease compreende uma

sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, ou 50 mutações selecionadas do grupo de A1R, Q2S, V4R, V4S, S9A, R10S, P14K, A16S, H17R, N18R, G20R, T22A, T22R, S24R, S24W, G25R, G25V, V26F, L42I, N43R, N43A, G46R, P52F, P52E, P52N, T57R, Q59A, N62E, N62Q, V68A, V68C, T71G, I72C, A74C, L75A, L75F, L75R, N76D, S78R, L82R, P86W, E89P, E89T, E89G, E89H, E89I, E89V, E89W, Y91N, K94N, G100S, S101A, S101N, S101G, S101D, S103G, S103N, V104L, V104I, S106V, S106G, A108I, L111V, E112V, G115K, G115R, N117F, G118I, V121F, S128D, S128F, S128L, S128N, P129E, S144R, L148I, A158E, G159E, S160D, S166D, N185E, N185I, R186H, S188E, S188D, D197F, V203E, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, P210R, S212I, S212F, Y214F, A215N, A215D, A215E, L217E, L217N, T224A, A230E, A231I, Q236F, N238R, N238K, P239K, P239G, P239R, P239S, W241R, S242R, S242L, N243R, V244R, N248I, N248V, H249R, L250I, N252R, T253R, L262D, Y263F, S265F, L267V, L267N, N269I, N269R, E271F, E271I, E271H, E271P, E271T, E271V, E271L e A272F, e, compreende, opcionalmente, pelo menos uma mutação selecionada a partir do grupo de S103A, G159D, Q236H, Q245R, N248D e N252K.

[000400] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, sendo que a protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* compreende a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:2, e sendo que a variante de protease compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25,

30, 35, 40, 45, ou 50 mutações selecionadas do grupo de A16S, T22A, S24R, N62E, N76D, E89P, S101A/G, S103G/A, V104L/I, L111V, S128N, P129E, A232V, L148I, A158E, G159D/E, R186H, S188D, Y209E, Q236H, Q245R, N248D/R, H249R, N252K/R, T253R, E271F, A1R, A230E, E271L, G115R, G20R, H249R, K235F, K27V/F/L, L75E, L82R, N18R, N269R, N43D, N43R, N76D, R45T, S212F, S242R, S24R, S78R, S9A, T22R, V121E, V244R, V28E, V30E, V4R, e W241R, e sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1 como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000401] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de protease de protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, sendo que a protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* compreende a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:2, sendo que a variante de protease compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou 25 mutações selecionadas do grupo de A16S, T22A, S24R, N62E, N76D, E89P, S101A/G, S103G/A, V104L/I, L111V, S128N, P129E, A232V, L148I, A158E, G159D/E, R186H, S188D, Y209E, Q236H, Q245R, N248D/R, H249R, N252K/R, T253R, e E271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1 como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da

variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000402] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, sendo que a protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* compreende a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:2, e sendo que a variante de protease compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, ou 50 mutações selecionadas do grupo de A16S, T22A, S24R, N62E, N76D, E89P, S101A/G, S103G/A, V104L/I, L111V, S128N, P129E, A232V, L148I, A158E, G159D/E, R186H, S188D, Y209E, Q236H, Q245R, N248D/R, H249R, N252K/R, T253R, E271F, A1R, A230E, E271L, G115R, G20R, H249R, K235F, K27V/F/L, L75E, L82R, N18R, N269R, N43D, N43R, N76D, R45T, S212F, S242R, S24R, S78R, S9A, T22R, V121E, V244R, V28E, V30E, V4R, e W241R, sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1 como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000403] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de protease de protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, sendo que a protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* compreende a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:2, sendo que a variante de protease compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas,

três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou 25 mutações selecionadas do grupo de G20K, G20R, G23A, S24F, S24R, N43R, N43W, R45T, N62E, N76D, S101A, N116A, N116L, G118R, S128I, P129E, S188D, T213A, A215F, L217E, P239G, e N269R, sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000404] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* compreendendo uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2, e sendo que a carga líquida total da variante de protease é +1, +2, +3, +4, +5, 0, -1, -2, -3, -4, ou -5 em relação à carga líquida total da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, e sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000405] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de protease que compreendem uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2, e sendo que a carga líquida total da variante de protease é 0 em relação à carga líquida total da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, e sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de

acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000406] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina de *Bacillus* que tem uma ou mais das seguintes características: a) um índice de desempenho no método de teste 2 de pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de 1,1 a cerca de 10, de 1,1 a cerca de 8, ou mesmo de 1,1 a cerca de 5; b) um índice de desempenho no método de teste 3 de pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de 1,1 a cerca de 10, de 1,1 a cerca de 8, ou mesmo de 1,1 a cerca de 5; c) um índice de desempenho no método de teste 4 de pelo menos 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de 1,0 a cerca de 10, de 1,0 a cerca de 8, ou mesmo de 1,0 a cerca de 5; e/ou d) um índice de desempenho no método de teste 6 de pelo menos 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de 1,0 a cerca de 10, de 1,0 a cerca de 8, ou mesmo de 1,0 a cerca de 5. O método de teste 2, o método de teste 3, o método de teste 4 e o método de teste 6 são explicitamente descritos abaixo na seção do Exemplo 1 intitulada "Métodos de teste".

[000407] Conforme indicado na presente invenção, as variantes de

protease para água fria adequadas são variantes de uma protease original, a dita sequência de protease original sendo pelo menos 97%, pelo menos 99% ou 100% idêntica à sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:1, a dita variante de protease tendo uma ou mais das seguintes características:

a) um índice de desempenho no método de teste 2 de pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de 1,1 a cerca de 10, de 1,1 a cerca de 8, ou mesmo de 1,1 a cerca de 5; b) um índice de desempenho no método de teste 3 de pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de 1,1 a cerca de 10, de 1,1 a cerca de 8, ou mesmo de 1,1 a cerca de 5; c) um índice de desempenho no método de teste 4 de pelo menos 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de 1,0 a cerca de 10, de 1,0 a cerca de 8, ou mesmo de 1,0 a cerca de 5; e/ou d) um índice de desempenho no método de teste 6 de pelo menos 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de 1,0 a cerca de 10, de 1,0 a cerca de 8, ou mesmo de 1,0 a cerca de 5. O método de teste 2, o método de teste 3, o método de teste 4 e o método de teste 6 são explicitamente descritos abaixo na seção do Exemplo 1 intitulada "Métodos de teste". Todas as mutações aqui mencionadas utilizam o esquema de numeração de BPN', conforme mostrado na figura 1. Em algumas modalidades, as variantes aqui mencionadas se referem a variantes que possuem sequências de aminoácido em comparação à sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2, usando o esquema de numeração de BPN'.

[000408] Em algumas modalidades, as variantes aqui fornecidas se referem a variantes de uma protease original, sendo que a sequência da protease original é pelo menos 97%, pelo menos 99% ou 100% idêntica à sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:1.

[000409] As proteases para água fria adequadas podem ser derivadas de subtilisinas, particularmente aquelas derivadas da subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* da SEQ ID NO:2 e, em algumas modalidades, compreendem uma ou mais das seguintes mutações: A1R, Q2S, V4R, V4S, S9A, R10S, P14K, A16S, H17R, N18R, G20R, T22A, T22R, S24R, S24W, G25R, G25V, V26F, L42I, N43R, N43A, G46R, P52F, P52E, P52N, T57R, Q59A, N62E, N62Q, V68A, V68C, T71G, I72C, A74C, L75A, L75F, L75R, N76D, S78R, L82R, P86W, E89P, E89T, E89G, E89H, E89I, E89V, E89W, Y91N, K94N, G100S, S101A, S101N, S101G, S101D, S103G, S103N, V104L, V104I, S106V, S106G, A108I, L111V, E112V, G115K, G115R, N117F, G118I, V121F, S128D, S128F, S128L, S128N, P129E, S144R, L148I, A158E, G159E, S160D, S166D, N185E, N185I, R186H, S188E, S188D, D197F, V203E, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, P210R, S212I, S212F, Y214F, A215N, A215D, A215E, L217E, L217N, T224A, A230E, A231I, Q236F, N238R, N238K, P239K, P239G, P239R, P239S, W241R, S242R, S242L, N243R, V244R, N248I, N248V, H249R, L250I, N252R, T253R, L262D, Y263F, S265F, L267V, L267N, N269I, N269R, E271F, E271I, E271H, E271P, E271T, E271V, E271L e/ou A272F.

[000410] Em algumas modalidades, as variantes de protease para água fria adequadas incluem subtilisinas, particularmente aquelas derivadas de GG36 de *Bacillus lentus* da SEQ ID NO:2, compreendendo um ou mais dos seguintes conjuntos de mutações: T022R-S024R, S009A-E271L, N018R-W241R, N018R-G115R, N043R-H249R, G020R-H249R, V004R-H249R, G020R-S024R, N018R-H249R,

S009A-G020R, G020R-W241R, S009A-S078R, G020R-G115R,
N018R-S024R, S024R-S242R, T022R-G115R, N018R-N043R,
G020R-N043R, N018R-S242R, S242R-N269R, N018R-V244R,
S024R-N269R, G020R-E271L, S024R-E271L, V004R-S009A, G020R-
N269R, A001R-S024R, V244R-E271L, S009A-N018R, W241R-E271L,
V004R-S024R, S009A-H249R, S009A-T022R, N062E-P129E, N062E-
G159E, A016S-L148I, A158E-H249R, A016S-N062E, L111V-S188D,
T022A-N062E, N062E-L148I, T022A-P129E, N062E-E271F, N062E-
A158E, A016S-G159E, N062E-R186H, S128N-G159E, N062E-S188D,
N062E-S128N, L148I-G159E, S103G-A158E, L111V-G159E, A158E-
E271F, A016S-S188D, T022A-L111V, S128N-A158E, A016S-A158E,
V104L-A158E, S128N-R186H, G159E-Y209E, N062E-S101A, L111V-
Y209E, L148I-S188D, S101A-Y209E, T022A-S188D, A016S-T022A,
S128N-P129E, A016S-Y209E, A016S-S128N, T022A-E089P, S128N-
Y209E, E089P-A158E, N062E-S103G, R186H-E271F, A016S-P129E,
E089P-G159E, L111V-H249R, S101A-P129E, L148I-Y209E, T022A-
G159E, P129E-H249R, P129E-Y209E, V104L-P129E, S128N-S188D,
L111V-A158E, T022A-A158E, N062E-Y209E, N062E-H249R, S101A-
R186H, E089P-P129E, P129E-E271, T22A-L111V-G159E, S101A-
S103G-V104L-Y209E, S101A-S103G-V104L-G159E, S101A-S103G-
V104L-S188D, S101G-S103A-V104I-G159D, T22A-S103G-G159E,
T22A-S128N-E271F-Y209E, T22A-Y209E-E271F, T22A-S101A-
Y209E, S101A-Y209E-E271F, T22A-L111V-S128N, T22A-S101A-
G159E, S101A-S103G-V104L, T22A-S101A-S103G-V104L, S101A-
S103G-V104L, S101G-S103A-V104I, S101A-S103G-V104L-S128N,
S103A-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-
V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-
G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-
A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-
Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-

Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D, N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-S24R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-T253R, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N238R, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N76D, e/ou S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-E271F.

[000411] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020R-N043R, G020K-N062E, S024F-N116L, G020K-S024F, S024R-A174T, S024R-G118R, S024R-K235F, S024R-P086R, S024R-P086W, S078R-G118R, T033S-G118R, T033S-K235F, Y209A-W241R, G020R-N076D, N018R-Q245R, S024R-R045T, A232V-Q245R, G118R-A172V, G118R-A194T, I008T-S024R, K235F-N243F, N018R-S103A, N018R-V104I, P086W-G118R, P086W-N243F, P086W-Y209A, S024C-T033S, S024R-A232V, S024R-N243F, S024R-P239Q, S024R-S101G, S024R-S141G, S024R-T033S, S024R-T274I, S024R-Y209A, S078R-P086W, S101G-A232V, T033S-L148F, T033S-P086W, T033S-P201S, T033S-S078R, T033S-W241R,

T033S-Y209A, A230E-H249R, A232V-H249R, G118R-K235F, N076D-Q245R, P086W-K235F, S024R-R247H, S024R-V104A, S078R-K235F, S101G-H249R, S103A-A232V, T033S-A048T, T033S-P239T, T033S-T253A, T143A-Y209A, Y209A-K235F, N018R-R045T, Y209A-N243F, S024R-A272P, S024R-R269C, S101G-V104I, V104I-A232V, N076D-H249R, e S024R-N076D sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000412] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020R-N076D, S024R-R045T, A230E-H249R, N018R-R045T, N018R-Q245R, S101G-A232V, S024R-A232V, A232V-Q245R, S024R-S101G, N018R-V104I, N018R-S103A, S101G-H249R, A232V-H249R, S103A-A232V, N076D-Q245R, S101G-V104I, V104I-A232V, N076D-H249R, S024R-N076D, S024F-N116L, G020K-S024F, G020K-N062E, T033S-G118R, S024R-P086W, S024R-G118R, S024R-P086R, Y209A-W241R, S024R-W241R, S024R-K235F, G118R-Y209A, S078R-G118R, T033S-K235F, S024R-A174T, P086W-Y209A, I008T-S024R, P086W-G118R, T033S-W241R, S024R-N243F, S024R-Y209A, T033S-P086W, S024R-T033S, P086W-N243F, T033S-P201S, S024R-P239Q, S078R-P086W, K235F-N243F, G118R-A172V, T033S-L148F, T033S-S078R, T033S-N243F, S024C-T033S, G118R-A194T, T033S-Y209A, S024R-S141G, S024R-T274I, P086W-K235F, A015T-T033S, Y209A-K235F, S024R-R247H, S078R-K235F, S024R-V104A, T033S-A048T, G118R-K235F, T033S-T253A, T143A-Y209A, T033S-P239T, Y209A-N243F, S024R-A272P, e S024R-R269C, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisi-

na são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000413] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: V004R-S009A-G020R-S242R, G020R-N043R-W241R, G020R-S242R-N269R, V004R-S009A-G020R-N043R, V004R-G020R-H249R, N018R-S024R-V244R, S009A-T022R-S212F-W241R, G020R-N043R-N269R, N018R-S024R-S242R, V004R-S009A-N043R-W241R, G020R-N043R-V244R, G020R-T022R-S242R, V004R-G020R-N043R, V004R-S009A-G020R-N043R-S242R, G020R-N043R-S242R, G020R-N043R-S242R-H249R, G020R-S212F-H249R, V004R-S009A-W241R, A001R-S009A-N043R, G020R-N043R-H249R, S009A-G020R-N043R-W241R, G020R-T022R-N043R, G020R-H249R-N269R, G020R-T022R-W241R, V004R-S009A-S024R-N043R-W241R, S009A-N043R-S078R, V004R-G020R-S024R-V244R, G020R-T022R-S078R-S242R, G020R-S024R-S242R-H249R, V004R-S009A-S078R-W241R, S009A-N043R-S078R-S242R, V004R-G020R-S024R, S009A-N043R-S212F, G020R-N043R-S212F, S024R-S078R-S212F, S009A-G020R-S024R-N043R, S009A-T022R-N043R-S078R, G020R-T022R-S212F-W241R, G020R-N043R-S212F-W241R, S009A-N043R-W241R, G020R-N043R-E271L, G020R-T022R-S078R-W241R, G020R-S024R-N043R-S242R, G020R-T022R-N043R-W241R, S009A-G020R-N043R-S212F, V004R-S009A-G020R-S024R-S242R, G020R-N043R-H249R-E271L, G020R-T022R-S024R-S242R, S009A-T022R-S078R-S212F, G020R-N043R-S242R-E271L, S009A-T022R-S078R-S212F-W241R, V004R-G020R-S024R-H249R, G020R-T022R-E271L, G020R-T022R-N043R-S212F, V004R-G020R-S024R-N043R-S242R,

V004R-G020R-S024R-N043R, V004R-S009A-T022R-S078R-S212F, G020R-T022R-S078R-S212F-W241R, e G020R-T022R-N269R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000414] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: N018R-G020R-N043D-R045T-A230E, N018R-N043R-R045T-S242R-H249R, S024R-N043D-H249R, N018R-G020R-R045T, G020R-S024R-N076D-H249R, S024R-N043R-A230E-S242R, N018R-S024R-N043D-A230E, G020R-N076D, N018R-S024R-N043D-N076D-H249R, S024R-N043R-N076D-H249R, N018R-S024R-R045T-S242R, G020R-N043D-N076D-A230E-H249R, G020R-N043R-R045T-S242R, N018R-S024R-N076D-H249R, N018R-G020R-S024R-N043D-R045T-L233I-S242R, S024R-N043R-A230E, N018R-G020R-N043D, N043R-S242R-H249R, G020R-N043R-R045T-A230E, N043R-N076D-S242R-H249R, G020R-S024R-R045T-A230E-S242R, S024R-R045T-N076D-A230E-S242R-H249R, S024R-R045T, S024R-N043R-R045T-N076D-A230E-H249R, N018R-S024R-N043D-R045T-H249R, N018R-N043R-R045T-H249R, S024R-N043R-S242R, N018R-G020R-N043R-N076D-H249R, G020R-S024R-N043D-H249R, G020R-N043R-A230E-S242R, G020R-N043R-S242R, N018R-N043R-N076D-A230E, G020R-S024R-N043D-S242R, G020R-N043R-A230E, N018R-G020R-N043R-N076D-S242R-H249R, N043D-R045T-N076D-H249R, N018R-N043R-S242R-H249R, N018R-G020R-N043R-R045T-S242R, N018R-G020R-N043D-A230E-S242R, G020R-S024R-N043R-R045T-H249R, S024R-N043R-H249R, G020R-S024R-K27E-N043R-N076D-A230E, S024R-N043R-R045T-S242R, N018R-G020R-S024R-N043R-

R045T-N076D-A230E, G020R-N043R-N076D-A230E-H249R, N018R-N043R-R045T-S242R, G020R-S242R-H249R, N018R-N043R-N076D-A230E-S242R-H249R, N018R-S024R-N076D, G020R-S024R-K27R-N043D-S242R-H249R, N018R-G020R-S024R-N043D-N076D-S242R, N018R-N043R-N076D-S242R-H249R, N018R-S024R-N043D-A230E-H249R, N018R-G020R-N043D-H249R, N018R-G020R-N043D-R045T-N076D-S242R, S024R-N043R-N076D-A230E-S242R, G020R-S024R-T38I-N043R-R045T-N076D-S242R-H249R, N018R-G020R-N043R, N018R-S024R-R045T-A230E-S242R, N018R-G020R-H249R, S024R-N043R-N076D, N018R-G020R-S024R-N043R-R045T-N076D-H249R, N018R-N043D-R045T-N076D-S242R-H249R, S024R-N043D-S242R-H249R, N018R-G020R-S024R-N043D-R045T-S242R, G020R-S024R-N043R-N076D, N018R-G020R-N043D-R045T-A230E-S242R, G020R-S024R-N043R-R045T-N076D-S242R-H249R, N018R-N043R-R045T-N076D-S242R, N018R-G020R-N043R-N076D-A230E-S242R, N018R-S024R-N043D-H249R, N018R-S024R-N043R-R045T-A230E-H249R, N018R-G020R-N043R-R045T-N076D-H249R, N018R-S024R-S242R, N018R-N043R-R045T-N076D-A230E-S242R, R045T-S242R-H249R, N018R-S024R-N043D-S242R, N018R-G020R-N043D-R045T-S240P, S024R-N043R-R045T-S242R-H249R, N018R-S024R-V30S-L31S-D32I-T33Q-G34V-I35F, N018R-G020R-N043R-N076D, G020R-N043D-R045T-N076D-S242R-H249R, N018R-S024R-N043D-A230E-S242R, N018R-S024R-N043D-S242R-H249R, S024R-N043D-R045T-S242R-H249R, N043R-A230E-H249R, S024R-N043R-N076D-A230E-H249R, G020R-S024R-N043D-N076D-H249R, S024R-R045T-S242R-A273V, G020R-S024R-R045T-N076D-S242R-H249R, N018R-S024R-N043D-N076D-S242R, N018R-N043R-N076D-A230E-H249R, N018R-G020R-N043R-R045T-H249R, N018R-N043R-R045T-A230E-S242R, G020R-S024R-N043D-R045T-A230E-S242R, N018R-N043D-A230E-H249R, N018R-N043R-N076D-S242R, N018R-G020R-N076D,

N018R-G020R-N043D-N076D-S242R-H249R, G020R-S024R-N043D-N076D-S242R-H249R, N043D-S242R-H249R, N018R-G020R-S024R-N043R-N076D, N018R-G020R-N043D-R045T-N076D-H249R, N018R-G020R-N043R-R045T-N076D-A230E-H249R, N018R-N076D-S242R, G020R-N043R-H249R, N018R-N076D-S242R-H249R, N018R-S024R-R045T-A230E-H249R, A230E-H249R, N018R-R045T-H249R, G020R-N043R-N076D, N043R-R045T-H249R, N018R-N043D-N076D-S242R-H249R, N043R-N076D-H249R, N018R-R045T, G020R-N076D-A230E-S242R, G020R-S024R-N043D-R045T, S024R-N043D-N076D-S242R-H249R, G020R-R045T-H249R, N043R-N076D-S153A-H249R, N043R-N076D-A230E-H249R, N018R-N043D-N076D-H249R, e G020R-N043R-N076D-V227I, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000415] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S101G-S103A-V104I-A232V-Q236H-Q245R-N252K, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248R, S101G-S103A-V104I-G159R-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R, e S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248D, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000416] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas

maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D, A016S-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-

P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-Q245R-N248D-

H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-

G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-G159E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-L148I-S188D-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-L148I-G159E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D, e S101G-S103A-V104I-

S128N-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000417] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, A016S-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D, S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-

S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, e S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000418] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: V104L-S128N-A158E-R186H-H249R, S128N-A158E-S188D-H249R, N062E-S128N-A158E-G159E-E271F, N062E-A158E-S188D-H249R-E271F, N062E-A158E-R186H-H249R-E271F, S128N-A158E-S188D-Y209E-E271F, N062E-G159E-S188D-H249R, A016S-N062E-A158E-R186H-H249R, N062E-A158E-G159E-H249R, S101A-S128N-A158E-Y209E-H249R, S128N-A158E-R186H-E271F, N062E-A158E-S188D-H249R, N062E-A158E-R186H-E271F, N062E-A158E-R186H-H249R, N062E-S101A-R186H-H249R, N062E-S101A-A158E-R186H-E271F, N062E-V104L-A158E-S188D-H249R-E271F, N062E-G159E-R186H-H249R, N062E-G159E-H249R, S128N-A158E-R186H-H249R, S128N-A158E-S188D-E271F, N062E-A158E-H249R, N062E-R186H-S188D-H249R-E271F, S128N-A158E-Y209E-, N062E-S101A-A158E-H249R, V104L-S128N-A158E-R186H-E271F, N062E-S101A-A158E-R186H-H249R-E271F, A016S-N062E-A158E-H249R, N062E-S101A-G159E-H249R, S128N-A158E-R186H-S188D-E271F, S101A-S128N-A158E-R186H-E271F, N062E-S101A-

S188D-H249R, S101A-V104L-A158E-R186H-S188D-H249R, N062E-G159E-H249R-E271F, S128N-A158E-G159E-E271F, A016S-N062E-V104L-A158E-R186H-E271F, T022A-S128N-A158E-H249R, S128N-A158E-H249R, N062E-S101A-V104L-A158E-R186H-E271F, A016S-N062E-A158E-R186H-E271F, V104L-S128N-A158E-H249R, V104L-S128N-A158E-S188D-H249R, T022A-N062E-A158E, N062E-S101A-S188D-H249R-E271F, N062E-A158E-H249R-E271F, V104L-S128N-A158E-R186H-S188D-E271F, N062E-S101A-R186H-E271F, N062E-V104L-G159E-H249R, N062E-R186H-H249R, N062E-S101A-R186H-H249R-E271F, S101A-A158E-R186H-S188D-H249R, N062E-S101A-R186H, S101A-S128N-P129E-R186H-H249R, S101A-S103G-A158E-R186H-H249R, A016S-N062E-V104L-R186H-S188D-E271F, V104L-A158E-R186H-H249R, S101A-S128N-A158E-S188D-Y209E-E271F, N062E-S101A-R186H-S188D-E271F, A016S-N062E-A158E-H249R-E271F, N062E-S128N-A158E, N062E-S128N-G159E-H249R, N062E-S101A-A158E-S188D-H249R, S101A-S128N-A158E-H249R, N062E-A158E-R186H-S188D-H249R, A016S-V104L-A158E-R186H-E271F, N062E-L148I-G159E, N062E-S101A-A158E-R186H-H249R, N062E-S101A-R186H-S188D-H249R, V104L-A158E-R186H-S188D-H249R, N062E-S101A-V104L-R186H-S188D-E271F, T022A-S101A-A158E-R186H-H249R, S101A-S128N-A158E-Y209E, A158E-R186H-S188D-H249R-E271F, V104L-A158E-R186H-S188D-H249R-E271F, S101A-V104L-A158E-R186H-H249R, V104L-A158E-H249R, S101A-V104L-S128N-A158E-R186H-E271F, A016S-V104L-S188D-H249R, S101A-V104L-A158E-R186H-S188D-E271F, V104L-S128N-G159E-E271F, V104L-A158E-R186H-H249R-E271F, A158E-R186H-H249R, S101A-A158E-R186H-H249R, V104L-A158E-S188D-H249R-E271F, A016S-S128N-A158E-R186H, V104L-S128N-R186H-S188D-H249R, A016S-S101A-S128N-R186H, A016S-N062E-S128N-R186H-E271F, A016S-S128N-R186H-E271F, S128N-P129E-R186H, A158E-R186H-H249R-

E271F, A016S-A158E-H249R, A016S-A158E-R186H-H249R, A016S-T022A-A158E-R186H-E271F, E089P-S101A-P129E-R186H, T022A-S128N-A158E-R186H, S101A-V104L-S128N-A158E-R186H, T022A-S128N-R186H-S188D-, N062E-V104L-A158E-R186H-S188D-H249R, T022A-A158E-R186H-H249R-E271F, T022A-V104L-A158E-H249R, S101A-L111V-P129E, A016S-A158E-H249R-E271F, A016S-L111V-S188D-, T022A-V104L-R186H-S188D-H249R, e V104L-L148I-S188D-H249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000419] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: A001R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, V004R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-E271L, S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, V004R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-E271L, G020R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-G025R-N116A-Y167W, N018R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, T022R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S078R-S103N-S106G-Y167W-Q236N, N018R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-S101A-H120F-A194F-H249R, G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S101G-S103A-V104I-S212F-A232V-Q245R, G020R-S144R-N185I-L233C-Q236N, G023A-S078R-S216F-Q236N-H249R,

S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S101G-S103A-V104I-G115R-A232V-Q245R, P052N-S078R-S103N-L148I-T213A, N018R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G025R-E089I-N116A-P239S-A270C, S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, L148I-T213A-N252R, S024R-G025R-N183D-Y192W-P239S, G046R-A194F-S212M, V104L-L217E-T224A-H249R-N252R, G023A-Y091F-V121F-Y192W-Q236N, S101G-S103A-V104I-A232V-V244R-Q245R, S099F-S144R-Y167W-N252R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, T022W-S078R-Y167W-S212M-A270C, V121F-N252R-A270C, G020R-S103N-S216F-Q236N-N252R, N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, G023A-P052N-Y192W-I198L-N252R, G025R-G046R-V121F, S024R-S078R-V104L-N116A-N183D, G046R-Q059A-S103N-G211Q-S212M, G020R-P052N-N062Q-Y091F-Y192W, G023A-P052N-S144R-Y192W-S216F, S101G-S103A-V104I-A232V-S242R-Q245R, P052N-S103N-N116A-L148I-Y192W, E089I-N116A-N117F-T224A-H249R, S144R-G211Q-N238L-P239S-H249R, N043A-N062Q-A194F-G211Q, G020R-S024R-P052N-Q059A-S216F, S024R-Y167W-T224A-H249R, T057R-Y167W-H249R, G025R-S103N-R186K-A194F-T224A, S105T-S128N-S144R-L148I-S212M, G020R-Q059A-S144R-Y192W-T224A, S024R-N043A-N117F-A194F-G211Q, N117F-A194F-T213A-A270C, S078R-Y091F-V121F-L233C-N252R, T057R-S099F-S105T-I198L-T213A, G023A-Y091F-S101A-I198L-N252R, N062Q-S103N-V121F-S144R-H249R, N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-S242R-Q245R, G023A-S024R-N117F-S212M-S216F, V104L-T213A-S216F, A194F-G211Q-Q236N, N062Q-S103N-N117F-A194F, S024R-N062Q-V104L-S106G-H249R, T057R-E089I-I198L, G046R-Q059A-S106G-L217E-H249R, N117F-T213A-A215F, S101A-H120F-Y192W-A215F-T224A, N043A-T057R-N117F-

S144R-N183D, G046R-N183D-N238L, G025R-N043A-E089I-N117F, S078R-V104L-T213A-A215F-T224A, Y091F-S099F-S101A-S105T-Y167W, S106G-N117F-N238L, G046R-E089I-Y091F-S101A-N116A, G020R-N062Q-E089I-R186K-S212M, T057R-S099F-V121F-N185I-Y192W, G046R-E089I-Y192W-L233C-A270C, E089I-N117F-N185I-A215F-L233C, P052N-V104L-N183D-S216F-H249R, S078R-S099F-N116A-R186K-T224A, G025R-S105T-S128N-S144R-A270C, S105T-G211Q-S216F, S024R-G046R-Y091F-V121F, S106G-N185I-S216F-Q236N, N062Q-S101A-Q236N-N252R-A270C, G025R-N043A-Y091F-I198L-A270C, G020R-G023A-V104L-Y192W-L233C, S024R-N043A-S105T-S106G-I198L, G020R-E089I-L217E, S024R-Y091F-I198L-A215F-P239S, G046R-E089I-S099F-R186K-S212M, V104L-H120F-R186K-S216F-N252R, T022W-A194F-T213A-L233C-N238L, S099F-S105T-S106G-A194F-S212M, E089I-S105T-N116A-A215F-S216F, G025R-N116A-H120F-T224A-A270C, N043A-Q059A-S101A-S216F-T224A, T057R-N183D-Q236N, G025R-N062Q-S128N-S144R-N185I, S103N-H120F-Y167W-I198L-L233C, T022W-E089I-S216F, S024R-S106G-N116A-S212M-T224A, G020R-P052N-S101A-I198L-L233C, E089I-Y091F-N185I-G211Q-A270C, L111I-A215F-P239S, S024R-N116A-R186K-L233C-Q236N, e G023A-S103N-S106G-S212M-A215F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000420] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116S-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-S078R-

S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-A232V-Q245R, G020R-T22W-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-A232V-Q245R, N018R-V104I-A232V-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-H249R, N018R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N018R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S103A-A232V-H249R, N018R-S101G-V104I-A232V-Q245R, G020R-S024R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R-H249R, N018R-T22K-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T22W-S101G-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R, S024R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T22W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V, N018R-S024R-N076D-N116A-A215F-H249R, N018R-N043R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-T213A-A215F-A232V-Q245R, N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-G211Q-H249R, N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S101G-Q245R, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-S024R-N043D-

N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-R045T-
N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-
S101G-S103A-V104I-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, R045T-
S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-N043D-
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S101G-S103A-
H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-N116A-A232V-Q245R,
N018R-S101G-V104I-A232V-H249R, G020R-T22W-S101A-S103A-
V104I-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-G211Q-T213A-
H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-H249R, S024R-
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-N076D-S101G-S103A-
V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-S101G-S103A-V104I-A232V-
Q245R-N269R, N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R,
G020R-S101G-V104I-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101G-
S103A-V104I-N116A-A215F-A232V-Q245R, S024R-S103A-V104I-
H249R, N018R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R,
R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R,
S024R-S101G-V104I-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-G211Q-
T213A-A215F-A232V-Q245R, S024R-S103A-V104I-A232V-H249R,
N018R-S024R-N076D-N116A-G211Q-A215F-H249R, N018R-Q245R,
S024R-S103A-Q245R, S024R-S103A-V104I-Q245R, G020R-S078R-
S101G-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-V104I-H249R, N018R-
S024R-V104I-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R,
N018R-S024R-N076D-G211Q-A215F-H249R, R019H-G020R-T022W-
S078R-S101G-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R, N018R-S024R-
N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N043D-
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T22W-S103A-V104I-
A232V-Q245R, N018R-S103A-V104I-H249R, N018R-T022W-S024R-
N076D-S101A-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-S101G-V104I-
A232V, S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-
N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-

G020R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R, N018R-S024R-S101G-V104I, G020R-S101A-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R, N018R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S101G-S103A-Q245R, N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-T22W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S101G-V104I-H249R, G020R-T22W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-I198L-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, S024R-N076D-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101G-V104I-A232V-H249R, N018R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, A001T-N018R-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R, N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-A232V-Q245R, N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N076D-S101G-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-A215F-H249R, R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-N076D-S101G-S103A-

V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-S101G-I198L-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-T213A-A215F-H249R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-G211Q-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, S024R-A232V-Q245R, N018R-S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-T213A-A215F-H249R, N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-A215V-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-H249R, G020R-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-G211Q-A215F-A232V-Q245R, S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-A232V-Q245R, N018R-T22W-S024R-N076D-I198L-A215F-H249R, G020R-T022W-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R, G020R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-T180A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, N018R-S101G-S103A-V104I,

G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S103A-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-G211Q-H249R, G020R-S101A-S103A-V104I-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-A232V-H249R, N018R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-N076D-Q245R, S024R-V104I-Q245R, S101G-A232V, G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-A215F-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-I198L-A232V-Q245R, S024R-Q245R-H249R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-G211Q-A232V-Q245R, N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-G211Q-H249R, S024R-S101G-V104I-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-V104I, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N183D-I198L-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-G020R-T22W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-A232V-Q245R, Q012H-G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-I198L-G211Q-T213A-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-T213A-H249R, S024R-V104I-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-G211Q-H249R, N018R-N076D-S103A-V104I-H249R, N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R-E271G, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-

Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R, G020R-N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-N116A-A215F-H249R, N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, S024R-S103A-M175L-A232V-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R, G020R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, S024R-N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, N043R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-Q245R, G020R-S024R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-A232V, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R, S024R-N076D-S101G-A232V-Q245R, N018R-N076D-S101G-S103A-V104I-H249R, N018R-S024R-N076D-I198M-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R, N018R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T022W-S103A-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R, R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-A215F-H249R-V268G, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-H249R, S101G-S103A-V104I-Q245R, N018R-N076D-S101G-A232V-Q245R, N018R-

G020R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-H249R, S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, G020R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-S103A-A232V, N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-H249R, N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-N043R-R045T-N076D-S076T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-A273T, N018R-G020R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N183D-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101G-A232V, A232V-Q245R, N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-V234I-Q245R, S024R-N076D-S103A-V104I-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-G211Q-T213A-A232V-Q245R, N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R-A272V, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-S103A-V104I-A232V, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, S024R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-T022W-S024R-N076D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R, G020R-T22W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-M117I-N183D-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-

N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-A232V-Q245R, N018R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-Y209H-T213A-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R, S024R-N076D-S101G-M175L-A232V-Q245R, N018R-N043D-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-A215F-A232V-Q245R, N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-A215F-H249R, S024R-N076D-V104I-Q245R, K027R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-A215F-H249R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, N018R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S101G-V104I, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-G211Q-

T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-N076D-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-H249R, G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-A114T-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-H249R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022K-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V, N018R-S024R-N076D-N116A-H249R, G020R-S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T22W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N183D-G211Q-A232V-Q245R-, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-H249R, N018R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-H249R, N018R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-A131V-N183D-T213A-A232V-Q245R, N018R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-H249R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S024R-S101G-Q245R, S024R-N076D-S101G-Q245R, N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-

G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-A215F-H249R, S024R-S101G, N018R-T22W-S024R-N076D-T213A-A215F-H249R, G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N183D-I198L-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-N043D-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-I198L-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, N018R-G020R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R, N018R-V104I, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-L088I-S101A-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-H249R, N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-N076D-S101G-V104I-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-T213A-A215F-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R-N269R, S024R-N076D-Q245R, N018R-G020R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-A215F-H249R, N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T22W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-T213A-H249R, G020R-T022W-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-

H249R, N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-N218S-A232V-Q245R, N018R-S103A, G020R-T22W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-G211Q-T213A-H249R, S024R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, K027R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-V104I, S101G-S103A-V104I-A232V-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-G211Q-H249R, N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R-R275S, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-H249R, V004M-N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R, V104I-A232V-H249R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A215F-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R-T274I, G020R-S101A-S103A-V104I-T213A-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R, G020R-S024R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S103A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-

H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-A215F-H249R,
N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-A215F-H249R-A270V,
N018R-N043D-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-
Q245R-N269R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N183D-A232V-
Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-
H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-G211Q-A215F-H249R,
N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-T213A-H249R, G020R-T022W-
S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, N018R-T22W-
S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-H249R, N043R-R045T-S078R-
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-
S101G-S103A-V104I-A232V, S101G-H249R, S024R-N076D-S101G-
S103A-V104I-M175L-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-
N116A-N183D-A232V-Q245R-N269S, N018R-S024R-N076D-S101A-
N116A-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-H249R,
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-A215F-H249R,
N018R-S024R-N076D-T213A-A215F-H249R-T260K, N018R-S024R-
N076D-N116A-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-
N076D-N116A-I198L-H249R, S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-
Q245R, S024R-N076D-S103A-H249R, N018R-S101G-S103A-V104I-
A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-G211Q-H249R,
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-H249R,
G020R-S024R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-
G020R-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-N043D-
R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-A272D, N018R-
S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-T22W-
S024R-N076D-S101A-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-
N116A-I198L-H249R, S024R-N076D-S101G-S103A-A232V, S024R-
S103A-V104I, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-
A215F-H249R, S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-
Q245R-H249R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-

Q245R, S024R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, N018R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-H249R, G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-N076D-S103A-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, S103A-V104I-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-A215F-H249R, A016T-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-A215F-H249R, N043R-N076D-S101G-S103T-V104I-A232V-Q245R-H249R-N269R, G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-G115E-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-H249R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101G, N076D-S101G-A232V-Q245R, N018R-N076D-S101G-S103A-V104I-Q245R, N018R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-A215F-H249R, N018R-V104I-A232V, N043D-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-N076D-S101G-A232V-H249R, S103A-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-

N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-A215F-H249R, S024R-N076D-S103A-V104I-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A215F-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-A215F-H249R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-A131T-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-S101G-S103A-V104I-Q245R-H249R, N018R-N076D-A232V-H249R, N018K-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R-N269R, N018R-G020R-S024R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R-L267I, A232V-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, N076D-V104I-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-H249R, S024R-S101G-S103A-A232V, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-H249R, S103A-A232V-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-

H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R, N018R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-G020R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-I198L-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R-T274I, S024R-S103A-Q245R-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-H249R, N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-H249R, S103A-A232V, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-H249R, N018R-N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-H249R, N018R-S024R-

N076D-N183D-I198L-G211Q-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-A232V, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-H249R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R-N263S, S024R-N076D-S101G-V104I-A232V-H249R, N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-V197A-T213A-A215F-H249R, S024R-S101G-S103A, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-A215F-H249R, N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, S024R-V104I-A232V, N018R-S024R-N076D-N183D-G211Q-H249R, G020R-N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-A150T-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-H249R, S024R-N076D-A232V-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116T-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R, R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R,

N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-H249R, G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R, N076D-S101G-S103A-Q245R, G020R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-H249R, N018R-T22W-S024R-N076D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-H249R, N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N076D-S101G-V104I-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-H249R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-Y209H-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N076D-Q245R, N076D-S101G-V104I-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-

N076D-S101A-G211Q-T213A-H249R, G020R-S024R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N204D-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A209V-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-I198L-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-G211Q-A215F-H249R-N269D, N018R-G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-H249R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N183D-A215F-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-Y209H-G211Q-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R, N076D-A232V-Q245R, N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-

Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-A215F-
Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-T213A-H249R, G020R-
S024R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R,
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R,
G020R-A090S-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-
A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-
G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-
N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-
I198L-G211Q-T213A-H249R, N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-
V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-
A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-
T213A-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-
I198L-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-
N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-
S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-
T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-
H249R, N018R-G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-
Q245R, N076D-S103A-V104I-A232V-Q245R, R045T-N076D-S078R-
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-T022W-S024R-
N076D-S101A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-
N076D-S101A-N116A-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-
N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-N043D-N076D-
S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N076D-S103A-
V104I-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-
T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-
H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-
A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-A215F-
H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-
H249R, N018R-S024R-N076D-S101G-Q245R, N018R-S024R-N076D-
S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N043R-R045T-

N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, N076D-V104I-A232V-Q245R, K027R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S103A-V104I-L135I-A232V, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-H249R, P005S-N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-I198L-H249R, N018R-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N183D-I198L-A215F-A232V-Q245R, N076D-S101G-S103A-V104I-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-

I198L-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-N243D-H249R,
N018R-G020R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-
H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-T213A-
H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-
T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-
T213A-A215F-H249R, S024R-N076D-S101G, N018R-G020R-S024R-
N076D-S101A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-
N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-
N076D-N183D-A215F-H249R, N018R-N043D-N076D-S078R-S101G-
S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-
N116A-N183D-G211Q-T213A-Q245R, G020R-S024R-N076D-S078R-
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-R045T-
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-S024R-N076D-
S101A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-
N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-
I198L-G211Q-A215F-H249R-N269S, N018R-G020R-T022W-S024R-
N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, G020R-
T022W-S101A-S103A-V104I-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R,
N018R-S024R-N076D-A086V-S101A-N183D-I198L-G211Q-H249R,
N018R-N076D-S101G-I198T-A232V, N018R-G020R-S024R-N076D-
S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-
S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-
T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R,
N018R-S024R-N076D-N183D-H249R-A248T, N018R-N076D-V104I-
Q245R-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-
I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-
T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-
N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-
S101A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-
A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-

A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N043R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-N076D-S101G-V104I, G020R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-N076D-V104I, N018R-G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, S101G-V104I, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R-N263D, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-A215F-H249R-R269H, N018R-N043D-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-I198L-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-H249R, G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, V104I-A232V, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-

S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-H249R, N043D-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-N043R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, S024R-N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-Y166F-A176P-A179V-N184T-A187P-A194P, N018R-T022W-S024R-D041E-N076D-S101A-S160T-N183D-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-I198L-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-G211Q-A215F-H249R, S024R-N076D-V104I, N018R-N076D-S101G-A232V, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R, N018R-S024R-L031F-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R-N269S, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-A215F-H249R, N018R-N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N114T-I198L-G211Q-A215F-H249R, S024R-N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, S024R-N076D-S103A-V104I-A232V, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-A215F-H249R, S101G-V104I-A232V, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-T213A-H249R, N018R-

S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-H249R, N018R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R-T260A, N076D-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-T213A-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-H249R, N076D-V104I-H249R, G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R, S024R-N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-A215F-H249R, N018R-N076D-S101G-S103A, G020R-S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R, S101G-S103A-A232V, S024R-N076D-S101G-A232V, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-I198L-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-A156V-N183D-G211Q-A215F-H249R-N269S, R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-H249R, N018R-N076D-S101G, N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R, N018R-N076D-A232V, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-A232V-Q245R,

N018R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-T213A-A215F-H249R, N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-N237D-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R-R275S, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R, S024R-N076D, N018R-S024R-N076D-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R, N076D-V104I-A232V-H249R, N018R-N076D-S103A-A232V, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-D175E-N183D-G211Q-A215F-H249R, N018R-G020R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R-A273E, G020R-S024R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, P005S-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S103A-V104I-A232V, N018R-G020R-S024R-V068A-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R, N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R-R275S, N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R, e N043D-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000421] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: N018R-S024R-N043R-N076D-H249R-N269R, N018R-T022R-S024R-N043R-N076D-H249R, N018R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-

Q245R-N269R, N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, T022R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, T022R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N043R-N076D-H249R, N018R-S024R-N076D-S242R-H249R, N018R-S024R-N076D-H249R-N269R, N018R-T022R-S024R-N076D-H249R, N018R-S024R-N076D-S078R-H249R, N018R-S024R-N043D-N076D-H249R-N269R, N018R-T022R-S024R-N043D-N076D-H249R, N018R-S024R-N043D-N076D-S078R-H249R, G020R-S101G-S103G-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104L-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104V-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103S-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103S-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103S-V104L-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104L-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103S-V104V-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103A-V104V-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103G-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101S-S103G-V104V-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103A-V104V-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103S-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101A-S103S-V104V-A232V-Q245R, N018R-S024R-N043R-N076D-S078R-H249R, S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R, S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-S242R-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-L217E-H249R, N018R-S024R-N043R-N076D-L217E-H249R, N018R-S024R-N043D-N076D-S242R-H249R, N018R-G020R-S024R-N043R-N076D-H249R, G020R-S101A-S103G-V104V-A232V-Q245R, N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N076D-

L217E-H249R-N269R, e N018R-S024R-N076D-L217E-S242R-H249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000422] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020R-S101A-S103A-V104I-G118R-A232V-Q245R, G020R-S024R-N116A-T213A, N043R-S101A-N116A-A215F-N269R, S024R-N043R-S101A-N116A, S024R-N043R-S101A-N116A-A215F-N269R, G020R-S101G-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R, N043R-S101A-N269R, S024R-N043R-N116A-T213A-N269R, G020R-S024R-N043R-R045T-S101A-T213A, S024R-N043R-N116A-A215F-N269R, G020R-S024R-T213A-A215F, G020R-N116A-N269R, S024R-N116A-T213A-N269R, N043R-S101A-N116A-N269R, S101G-S103A-V104I-N116A-T213A-A232V-Q245R-N269R, S024R-N043R-R045T-S101A-N116A-A215F-N269R, G020R-N043R-S101A-N269R, S101A-S103A-V104I-T213A-A232V-Q245R-N269R, S024R-A215F-N269R, N043R-S101A-N116A-T213A-A215F-N269R, N043R-S101A-T213A-N269R, G020R-S024R-N043R-R045T-N116A-T213A, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S024R-N043R-R045T-S101A-N116A-T213A-N269R, S024R-N043R-R045T-N269R, G020R-N043R-R045T-S101A-N269R, S024R-N043R-N116A-N269R, G020R-S024R-N043R-R045T, N043R-N116A-N269R, S024R-N043R-S101A-A215F-N269R, S024R-N043R-R045T-T213A-A215F-N269R, G020R-S024R-R045T-N269R, G020R-N043R-S101A-N116A-T213A-A215F, G020R-S101G-S103A-V104I-T213A-A215F-A232V-Q245R, G020R-S024R-R045T-N116A-N269R, G020R-S101A-N116A-N269R, S024R-

N043R-A215F, G020R-S024R-T213A, S024R-N043R-S101A-A215F, G020R-S024R-N043R-R045T-N116A, G020R-S024R-N043R-R045T-S101A-N269R, G020R-S024R-S101A-A215F, G020R-S024R-N116A-T213A-A215F, G020R-S024R-N116A, G020R-S024R-S101A-N116A, N043R-T213A-A215F-N269R, S024R-S101A-N269R, S024R-N043R-N116A-A215F, G020R-T038A-N043R-S101A, G020R-S024R-N116A-A215F, S024R-N043R-S101A-T213A, P014L-G020R-S024R-N043R-R045T-S101A-A215F, G020R-S024R-A215F, G020R-N116A-A215F-N269R, G020R-R045T-N116A-N269R, G020R-S024R-N043R-R045T-A215F, e G020R-S024R-N043R-R045T-N116A-T213A-A215F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000423] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S024R-N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F-E271F, S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N076D-S101G-S103A-V104I-A114V-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S024R-N043R-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-N043R-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, N076D-S101G-S103A-V104I-S128L-A158E-

S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, e N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000424] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-L217E-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, N043R-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N043R-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N076D-

S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S101G-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, S101G-S103A-V104I-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, N076D-S101G-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, e N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000425] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: H017R-T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, H017R-T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, T022A-S101G-G102A-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, e T022A-

N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000426] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S101S-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103G-V104V-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103S-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103A-V104L-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103G-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103G-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103S-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103S-V104V-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103S-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103S-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104L-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103A-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103S-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103S-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101S-S103A-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101A-S103G-V104V-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, e S101S-S103A-V104V-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN'

de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000427] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: V026F-V051W-V104L-S106E, V026F-L031F-S078N-G102A-S160D, G020K-G100S-N116L-A158E-S166D-N243F, T033S-N043W-N218D-P239G-N243F, T022L-T038F-A048R-N062E-G100S-R186K, S101D-S103N-N116L-S144R-A215D, V104L-S105T-T213A-L217E-S256N, N043W-S101D-S212M-N243F, V026F-A048R-S105T-T213A-N218D-T224A, S024F-S101D-G118R-A215D-L250I-A272F, V121F-N185E-T224A-P239G, T022L-L031F-G102A-S128D-T224A-N243F, N062E-S078N-G102A-N116L-S144R-L250I, T022L-T038F-V121F-S160D-A272F, V026F-S078N-G159C-R186K-N243F, S024F-A048R-G118R-S166D-L217E, G023A-T038F-S078N-G100S-S212M-A215D, G100S-N116L-A158E-T213A, S078N-V104L-G118R-S128D, G102A-S103N-S105T-A194E, T022L-S078N-S128D-T213A, K027R-G100S-G118R-S160D-S188D-N243F, S024F-G102A-R186K-T213A-L217E-N243F, T033S-S105T-S188D-S216F, G023A-G100S-A194E-S212M, A048R-S128D-N185E-P239G, G020K-S024F-T033S-P129E-A194E, G020K-K027R-P129E-S166D-P239G, T022L-G023A-K027R-S101D-V104L-S216F, T033S-G118R-P129E-A194E-P239G, T022L-S078N-N116L-P129E-S256N, K027R-S101D-S103N-S105T-A272F, A048R-S078N-N116L-N185E-L217E-P239G, G023A-S024F-K027R-N062E, S024F-S103N-V104L-G118R-S188D, V026F-V104L-S256N-A272F, S024F-N043W-V104L-V121F-P129E, N062E-S078N-N116L-T224A, G023A-S024F-V051W-A158E, K027R-T038F-G102A-N116L, N062E-S078N-S144R-S212M, L031F-N116L-S256N-A272F, T022L-T033S-V104L-N116L-S160D-R186K, S024F-G118R-P129E-R186K-T213A, N043W-S105T-T213A-A215D-S216F,

L031F-S105T-R186K-S188D, V026F-A194E-T213A-S256N, e S103N-S160D-L250I-S256N, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000428] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S024R-S103A-V104I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D, T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D, T022A-N043R-S101D-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S024R-N043R-S101D-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-N248D, T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S024R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-N062E-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-S103A-V104I-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F, T022A-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-S128I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S024R-N043R-S103A-

V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S103A-V104I-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N043R-S103A-V104I-S128I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101D-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S024R-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D, T022A-N062E-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-N043R-S101D-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-L217D-A232V, T022A-S024R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D, T022A-S024R-N043R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F, e T022A-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000429] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020K-S024F-N062E-S188D-P239G, S024F-N062E-N116L-P239G, G020K-G023A-N062E-S188D, G020K-G023A-S024F-N062E-G118R-S188D-T213A, G020K-N043W-N062E-N116L-S188D-T213A-P239G, G023A-N062E-N116L-G118R, G023A-S024F-N062E-N116L-G118R, S024F-N116L, S024F-N062E-S188D-T213A, G023A-N062E-N116L-G118R-S188D-P239G, G020K-

S024F-N062E, G020K-N043W-N062E-N116L-P239G, S024F-N062E-N116L-T213A-P239G, G020K-S024F-N043W-N062E-N116L-T213A, G020K-G023A-S024F-N062E-N116L-S188D-T213A, S024F-N062E-S188D-P239G, G023A-N043W-N062E-N116L-G118R-T213A, N062E-S188D-P239G, G020K-S024F-N062E-P239G, S024F-N116L-G118R-S188D-P239G, G020K-G023A-N062E-N116L-G118R-T213A, G020K-G023A-S024F-N062E-S188D-T213A-P239G, S024F-N043W-G118R-S188D, G023A-S024F-N116L-G118R-S188D-T213A, G020K-G023A-N043W-N116L-S188D-T213A-P239G, G023A-S024F-N116L-S188D-P239G, G023A-N043W-N116L-G118R-S188D, G023A-S024F-G118R-S188D-P239G, G023A-S024F-N043W-N062E-N116L-G118R, G020K-N043W-S188D-T213A, S024F-N062E-G118R-P239G, G023A-N043W-S188D-T213A, G020K-S024F-N043W-N062E-N116L-G118R-S188D-P239G, G020K-N116L-S188D-P239G, G020K-N043W-N062E-G118R, G020K-N043W-N116L-S188D-T213A, G020K-S024F, G023A-N043W-N116L-P239G, G023A-S024F-N043W-N116L-G118R-S188D-P239G, G020K-G023A-N043W-T213A, e G023A-S024F-N062E-G118R-T213A-P239G, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000430] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020K-G023A-N043W-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D, S024F-G118R-S128I-P129E-G159D, G020K-S024F-N062E-N116L-G118R-S188D, G020K-N062E-N116L-S188D, N062E-N116L-G118R-T213A, G020K-G023A-N062E-N116L-S188D, N062E-N116L-G118R-S188D, G020K-N062E-N116L-T213A,

G020K-G023A-N062E-N116L, G020K-N062E-S188D-T213A, G020K-N062E, G020K-S024F-N062E-N116L-S188D, G020K-N043W-N062E-N116L-S188D, G020K-S024F-N062E-S188D-T213A, N062E-N116L-S188D-T213A, G020K-N062E-N116L, G020K-G023A-N062E-N116L-S188D-T213A, G023A-S024F-N062E-N116L-T213A, T022A-N043R-S103A-V104I-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, S024F-N062E-N116L-S188D, T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D, G023A-N062E-N116L-S188D, N043W-N062E-N116L, G020K-G023A-N116L-S188D, N043W-N062E-N116L-S188D, S024F-N062E-N116L, N062E-N116L-S188D, e T022A-S024R-S103A-V104I-S128I-G159D-S188D-A232V-N248D, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000431] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S087R-S101G-S103A-V104I-Q109R-S212P-A232V-Q245R-E271V, S101G-S103A-V104I-Q109R-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-Q109R-S212P-A232V-Q245R-E271V, S101G-S103A-V104I-Q109R-S212P-A232V-Q245R, N076D-S87R-S103A-V104I-S212P-E271V, N076D-S103A-V104I-Q109R, N076D-S103A-V104I-S212P-E271V, N076D-S103A-V104I-Q109R-Q245R, e N076D-S103A-V104I-S212P-Q245L-E271V, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000432] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S024R-P086W-G118R, S024R-S078R-P086W-N243F, S024R-T033S-P086S-S087N-Y209A, T033S-G118R, S024R-S078R-P086W-G118R-A270T, S024R-T033S-P086W-G118R, S078R-P086W-N243F, T033S-S078R-P086W-G118R-Y209A, T033S-S078R-Y209A, P086W-G118R-N243F, S024R-P086W, S078R-P086W-K235F, S024R-G118R, S024R-P086R, S101G-S103A-V104I-A232V, S024R-T033S-S078R-P086W-G118R, S024R-G118R-Y209A, Y209A-W241R, T033S-P086W-N243F, T033S-A172V-Y209A, G118R-Y209A-N243F, S024R-P086S-S141G, S024R-G118R-Y209A-N243F, S024R-T033S-P086S-S085N-K235F, S024R-T033S-A133V, S024R-T033S-S078R-P086W, S024R-P086W-Y209A, S024R-W241R, T033S-G118R-N243F, S024R-K235F, S024R-S078R-P086W, S024R-G118R-Y209A-K235F, S024R-Y209A-W241R, T033S-G118R-W241R, P086W-G118R-Y209A, T033S-G118R-G159D-Y209A, T033S-S078R-P086W, S024R-P086W-N243F, G118R-Y209A, S024R-P086W-G118R-V203I, S078R-Y209A-K235F, S024R-T033S-W241R, S078R-G118R, T033S-G118R-Y209A-N243F, L021M-S024R-T033S, S024R-T033S-P086W, T033S-K235F, S078R-P086W-Y209A, S024R-T033S-Y209A-K235F, T033S-P086W-G118R, S024R-T033S-S078R-Y209A, T033S-P086W-G118R-Y209A-N243F, P086W-Y209A-N243F, P005S-S078R-G118R-W241R, S024R-A174T, T033S-Y209A-N243F, P086W-G118R-A133V, S024R-T033S-G118R, S024R-P086W-Y209A-K235F, P086W-Y209A, I008T-S024R, P086W-G118R, T033S-W241R, P005S-S024R-T033S-N243F, S024R-Y209A-S242P, S024R-T033S-S078R-G118R, S024R-T033S-A194T, S024R-N243F, S024R-Y209A, S024R-T033S-G118R-Y209A, T033S-P086W, S024R-T033S, S024R-T033S-

S078R-N243F, P086W-N243F, T033S-G118D-A138V-Y209A, T033S-Y209A-K235F, S024R-P086R-G118R, T033S-P201S, S024R-P239Q, T033S-G118R-Y209A-, S078R-P086W, K235F-N243F, S024R-Y209A-K235F, G118R-A172V, H017Y-S024R-T033S-P086W, T033S-L148F, S024R-G118R-K235F, T033S-S078R, T033S-N243F, S024C-T033S, G118R-A194T, T033S-Y209A, G118R-Y209A-K235F, S024R-T033S-Y209A-N243F, S024R-T033S-K235F, S024R-T033S-G118R-K235F, S024R-S141G, S024R-T274I, S024R-T033S-Y209A, P086W-K235F, S024R-Y209A-N243F, V004E-T033S-S078R, P086W-Y209A-K235F, A015T-T033S, T033S-P086W-S156L-Y209A, S024R-G118R-N243F-R269H, Y209A-K235F, S024R-R247H, S024R-T033S-A228T, S078R-K235F, S024R-T033S-A174V-K235F, S024R-K235F-N243F, S024R-T033S-K235F-W241R, S024R-T033S-A151V, S024R-V104A, T033S-A048T, Q012H-V104A-G118R, G118R-K235F, T033S-T253A, T143A-Y209A, S024R-T033S-N243F, T033S-P239T, Y209A-N243F, S024R-T033S-P129H-N184D-T253M, S024R-A085V-P086W-G118R-K235F, S024R-A272P, e S024R-R269C, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000433] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: G020R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, N018R-G020R-S024R-N076D-S087D-H249R, N018R-G020R-S024R-N076D-V150L-H249R, N018R-S024R-N043R-N076D-S087D-H249R, N018R-S024R-N043R-N076D-V150L-H249R, N018R-S024R-N076D-S078R-S087D-H249R, N018R-S024R-N076D-S078R-V150L-

H249R, N018R-S024R-N076D-S087D-H249R-N269R, N018R-S024R-N076D-S087D-S242R-H249R, N018R-S024R-N076D-S087D-V150L-H249R, N018R-S024R-N076D-V150L-H249R, N018R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, N018R-T022R-S024R-N076D-S087D-H249R, N018R-T022R-S024R-N076D-V150L-H249R, N043R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, N043R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, S024R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S024R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, S078R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S078R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R-H249R, S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R-N269R, T022R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-S024R-N043D-N076D-V150L-H249R, N043R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, T022R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, N018R-S024R-N043D-N076D-S087D-H249R, N018R-S024R-N076D-S087D-H249R, N018R-S024R-N076D-V150L-S242R-H249R, N043R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R-N269R, N076D-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-S242R-Q245R, S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R, N076D-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, e S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-S242R-Q245R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000434] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de

aminoácido selecionada a partir de: S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-S130A-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, e S024R-K027R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000435] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S101G-S103A-V104I-A232V-M222Q-Q245R, S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-M222S-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-M222Q-A232V-Q245R-N248D-H249R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-

M222Q-Q245R, S101G-S103A-V104I-A232V-M222S-Q245R, N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-M222S-Q245R, e N076D-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-M222S-A232V-Q245R-N248D-H249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000436] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina isoladas, sendo que as variantes de subtilisina são formas maduras que têm atividade proteolítica e compreendem sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-N183D-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-S128L-S130A-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-S130A-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271G, S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-A158E-N183D-S188D-A232V-

Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R, e S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000437] Em algumas modalidades, as variantes de protease para água fria adequadas incluem variantes de subtilisinas, particularmente as derivadas da GG36 de *Bacillus lentus* da SEQ ID NO:2, sendo que as variantes compreendem três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou mesmo 25 mutações dentro do grupo de posições que compreende as posições 1, 2, 4, 9, 10, 14, 16, 17, 18, 20, 22, 24, 25, 26, 42, 43, 46, 52, 57, 59, 62, 68, 71, 72, 74, 75, 76, 78, 82, 86, 89, 91, 94, 100, 101, 103, 104, 106, 108, 111, 112, 115, 117, 118, 121, 128, 129, 144, 148, 158, 159, 160, 166, 185, 186, 188, 197, 203, 209, 210, 212, 214, 215, 217, 224, 230, 231, 236, 238, 239, 241, 242, 243, 244, 248, 249, 250, 252, 253, 262, 263, 265, 267, 269, 271 e 272.

[000438] Em algumas modalidades, as variantes de protease para água fria adequadas incluem variantes de subtilisinas, particularmente, aquelas derivadas de GG36 de *Bacillus lentus* da SEQ ID NO:2, sendo que as variantes compreendem um total de três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou mesmo 25 mutações selecionadas a partir de: A1R, Q2S, V4R, V4S, S9A, R10S, P14K, A16S, H17R, N18R, G20R, T22A, T22R, S24R, S24W, G25R, G25V, V26F, L42I, N43R, N43A, G46R, P52F, P52E, P52N, T57R, Q59A, N62E, N62Q, V68A, V68C, T71G, I72C, A74C, L75A, L75F, L75R, N76D, S78R, L82R, P86W, E89P, E89T, E89G, E89H, E89I, E89V, E89W, Y91N, K94N, G100S, S101A, S101N, S101G, S101D, S103G, S103N, V104L, V104I, S106V,

S106G, A108I, L111V, E112V, G115K, G115R, N117F, G118I, V121F, S128D, S128F, S128L, S128N, P129E, S144R, L148I, A158E, G159E, S160D, S166D, N185E, N185I, R186H, S188E, S188D, D197F, V203E, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, P210R, S212I, S212F, Y214F, A215N, A215D, A215E, L217E, L217N, T224A, A230E, A231I, Q236F, N238R, N238K, P239K, P239G, P239R, P239S, W241R, S242R, S242L, N243R, V244R, N248I, N248V, H249R, L250I, N252R, T253R, L262D, Y263F, S265F, L267V, L267N, N269I, N269R, E271F, E271I, E271H, E271P, E271T, E271V, E271L e A272F; e, opcionalmente, uma ou mais das seguintes mutações: S103A, G159D, Q236H, Q245R, N248D e N252K.

[000439] Em algumas modalidades, a variante de protease para água fria compreende uma ou mais mutações, e tem uma carga líquida total de -5, -4, -3, -2, -1 ou 0 em relação à subtilisina GG36 de *B. lentus* selvagem (SEQ ID NO:2)

[000440] Em algumas modalidades, as variantes de protease para água fria são variantes de protease para água fria de baixa força iônica. Tais variantes de protease para água fria de baixa força iônica compreendem uma ou mais mutações, e têm uma carga líquida total de -5, -4, -3, -2, -1 ou 0 em relação à protease subtilisina GG36 de *B. lentus* selvagem (SEQ ID NO:2). Em algumas modalidades, estas mutações são selecionadas a partir de: duas ou mais das seguintes mutações: A1R, Q2S, V4R, V4S, S9A, R10S, P14K, A16S, T22A, T22R, S24R, G25V, V26F, L42I, P52F, P52E, P52N, N62E, N62Q, V68A, V68C, T71G, I72C, A74C, L75A, L75F, S78R, E89P, E89T, E89G, E89H, E89W, Y91N, K94N, G100S, S101A, S101N, S101G, S101D, S103G, S103N, V104L, V104I, A108I, L111V, E112V, G115K, N117F, V121F, S128D, S128F, S128L, S128N, P129E, L148I, A158E, G159E, S160D, S166D, N185E, R186H, S188E, S188D, V203E, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, P210R, S212I, S212F,

Y214F, A215N, A215D, A215E, L217E, L217N, T224A, A230E, A231I, Q236F, N238R, N238K, P239K, P239G, P239R, N248V, H249R, L250I, L262D, Y263F, S265F, L267V, L267N. N269I, N269R, E271F, E271I, E271H e A272F; e/ou um ou mais dos seguintes conjuntos de mutações: N062E-P129E, N062E-G159E, A016S-L148I, A158E-H249R, A016S-N062E, L111V-S188D, T022A-N062E, N062E-L148I, T022A-P129E, N062E-E271F, N062E-A158E, A016S-G159E, N062E-R186H, S128N-G159E, N062E-S188D, N062E-S128N, L148I-G159E, S103G-A158E, L111V-G159E, A158E-E271F, A016S-S188D, T022A-L111V, S128N-A158E, A016S-A158E, V104L-A158E, S128N-R186H, G159E-Y209E, N062E-S101A, L111V-Y209E, L148I-S188D, S101A-Y209E, T022A-S188D, A016S-T022A, S128N-P129E, A016S-Y209E, A016S-S128N, T022A-E089P, S128N-Y209E, E089P-A158E, N062E-S103G, R186H-E271F, A016S-P129E, E089P-G159E, L111V-H249R, S101A-P129E, L148I-Y209E, T022A-G159E, P129E-H249R, P129E-Y209E, V104L-P129E, S128N-S188D, L111V-A158E, T022A-A158E, N062E-Y209E, N062E-H249R, S101A-R186H, E089P-P129E, P129E-E271F, T22A-L111V-G159E, S101A-S103G-V104L-Y209E, S101A-S103G-V104L-G159E, S101A-S103G-V104L-S188D, S101G-S103A-V104I-G159D, T22A-S103G-G159E, T22A-S128N-E271F-Y209E, T22A-Y209E-E271F, T22A-S101A-Y209E, S101A-Y209E-E271F, T22A-L111V-S128N, T22A-S101A-G159E, S101A-S103G-V104L, T22A-S101A-S103G-V104L, S101A-S103G-V104L, S101G-S103A-V104I, S101A-S103G-V104L-S128N, S103A-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-N248D-N252K, S101G-S103A-

V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D, N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-S24R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-T253R, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N238R, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N76D e S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-E271F.

[000441] Em algumas modalidades, as variantes de protease para água fria de baixa força iônica acima fazem parte de uma composição detergente que é diluída em água, tipicamente, dentro de uma máquina de lavar, para formar um líquido de lavagem de detergente para lavagem de roupas cuja condutividade é de cerca de 0,1 mS/cm a cerca de 3 mS/cm, de cerca de 0,3 mS/cm a cerca de 2,5 mS/cm, ou mesmo de cerca de 0,5 mS/cm a cerca de 2 mS/cm.

[000442] Em algumas modalidades, as variantes de protease para água fria são variantes de protease para água fria de alta força iônica. Tais variantes de protease para água fria de alta força iônica compreendem duas ou mais mutações e possuem uma carga líquida total de +5, +4, +3, +2, +1 ou 0 em relação à protease subtilisina GG36 de *B. lentus* selvagem (SEQ ID NO:2). Em algumas modalidades, estas mutações são selecionadas a partir de: duas ou mais das seguintes mutações: V4R, H17R, N18R, G20R, T22R, S24R, S24W, G25R, N43R,

N43A, G46R, P52F, P52N, T57R, Q59A, N62Q, T71G, L75R, N76D, S78R, L82R, P86W, E89P, E89W, E89T, E89I, E89H, E89V, V104L, S106V, S106G, G115R, G118I, V121F, S144R, N185I, D197F, Y209N, Y209S, L217E, A231I, P239R, P239S, W241R, S242R, S242L, N243R, V244R, N248I, H249R, N252R, T253R, E271T, E271V, E271L, E271H, E271F, E271P, A1R, S9A, S212F e N269R; e/ou um ou mais dos seguintes conjuntos de mutações: T022R-S024R, S009A-E271L, N018R-W241R, N018R-G115R, N043R-H249R, G020R-H249R, V004R-H249R, G020R-S024R, N018R-H249R, S009A-G020R, G020R-W241R, S009A-S078R, G020R-G115R, N018R-S024R, S024R-S242R, T022R-G115R, N018R-N043R, G020R-N043R, N018R-S242R, S242R-N269R, N018R-V244R, S024R-N269R, G020R-E271L, S024R-E271L, V004R-S009A, G020R-N269R, A001R-S024R, V244R-E271L, S009A-N018R, W241R-E271L, V004R-S024R, S009A-H249R, S009A-T022R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-S24R, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N252K, S101G-S103A-V104L-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K

[000443] Em algumas modalidades, as variantes de protease para água fria de alta força iônica acima fazem parte de uma composição detergente que é diluída em água, tipicamente, dentro de uma máquina de lavar de roupas, para formar um líquido de lavagem de detergente para lavagem de roupas cuja condutividade é de cerca de 3 mS/cm a cerca de 30 mS/cm, de cerca de 3,5 mS/cm a cerca de 20 mS/cm, ou mesmo de cerca de 4 mS/cm a cerca de 10 mS/cm.

[000444] A carga das variantes de protease para água fria é expressa em relação à protease subtilisina GG36 de *B. lentus* selvagem que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2. Os aminoácidos

que conferem uma única carga negativa são D e E e os que conferem uma única carga positiva são R, H e K. Qualquer alteração de aminoácido em relação a SEQ ID NO:2 que muda uma carga é usada para calcular a carga da variante de protease para água fria. Por exemplo, a introdução de uma mutação de carga negativa a partir de uma posição neutra selvagem adicionará uma carga líquida de -1 à variante de protease para água fria, enquanto que a introdução de uma mutação de carga negativa (D ou E) a partir de um resíduo de aminoácido positivo selvagem (R, H ou K) adicionará uma carga líquida de -2. A soma das alterações de carga de todos os resíduos de aminoácido que são diferentes para a variante de protease para água fria em relação à protease subtilisina GG36 de *B. lentus* selvagem que possui a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 dá a alteração de carga da variante de protease para água fria. Sem se ater à teoria, acredita-se que a faixa de carga preferencial para proteases para água fria a ser usada em soluções de detergente para lavagem de roupas de baixa condutividade é -5, -4, -3, -2, -1, 0, particularmente, -2, -1; a faixa de carga preferencial para proteases para água fria a ser usada em soluções de detergente para lavagem de roupas de alta condutividade é +5, +4, +3, +2, +1, 0, particularmente, +2, +1. A seleção correta da carga, pode levar a níveis inesperadamente aprimorados de desempenho de limpeza em água fria. "Soluções de detergente para lavagem de roupas de baixa condutividade" são definidas como tendo uma condutividade de cerca de 0,1 mS/cm a cerca de 3 mS/cm, de cerca de 0,3 mS/cm a cerca de 2,5 mS/cm, ou mesmo de cerca de 0,5 mS/cm a cerca de 2 mS/cm. "Soluções de detergente para lavagem de roupas de alta condutividade" são definidas como tendo uma condutividade de cerca de 3 mS/cm a cerca de 30 mS/cm, de cerca de 3,5 mS/cm a cerca de 20 mS/cm, ou mesmo de cerca de 4 mS/cm a cerca de 10 mS/cm. Os exemplos acima não se destinam a limitar o escopo. Uma vez que mu-

tações são combinadas para otimizar o desempenho em água fria, a carga da enzima também pode ser equilibrada por mutações em posições adicionais.

[000445] Em algumas modalidades, a invenção fornece uma protease variante isolada, recombinante, substancialmente pura, ou que não tem ocorrência natural (*por exemplo*, subtilisina variante) que tem atividade proteolítica, a dita protease variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que difere de da sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:2 por não mais que 50, não mais que 45, não mais que 40, não mais que 35, não mais que 30, não mais que 25, não mais que 20, não mais que 19, não mais que 18, não mais que 17, não mais que 16, não mais que 15, não mais que 14, não mais que 13, não mais que 12, não mais que 11, não mais que 10, não mais que 9, ou não mais que 8 resíduos de aminoácido, sendo que as posições de aminoácido são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado por alinhamento da sequência de aminoácidos da protease variante com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*, sendo que a subtilisina variante inclui as substituições 101G/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K.

[000446] Em algumas modalidades, a invenção apresenta uma protease variante isolada, recombinante, substancialmente pura, ou que não tem ocorrência natural (*por exemplo*, subtilisina variante) que tem atividade proteolítica, a dita protease variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:2 por não mais que 50, não mais que 45, não mais que 40, não mais que 35, não mais que 30, não mais que 25, não mais que 20, não mais que 19, não mais que 18, não mais que 17, não mais que 16, não mais que 15, não mais que 14, não mais que 13, não

mais que 12, não mais que 11, não mais que 10, não mais que 9, não mais que 6, não mais que 5, não mais que 4, não mais que 3, não mais que 2 resíduos de aminoácido, sendo que as posições de aminoácido são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado por alinhamento da sequência de aminoácidos da protease variante com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*, sendo que a subtilisina variante inclui a substituição 87N.

[000447] Os ácidos nucleicos da invenção podem ser gerados usando quaisquer técnicas de síntese, manipulação, e/ou isolamento adequadas, ou combinações das mesmas. Por exemplo, um polinucleotídeo da invenção pode ser produzido com o uso de técnicas de síntese ácido nucleico padrão, como, por exemplo, técnicas de síntese em fase sólida que são bem conhecidas pelos versados na técnica. Nestas técnicas, fragmentos de até 50 ou mais bases de nucleotídeo são, tipicamente, sintetizados e, então, unidos (*por exemplo*, por métodos de ligação enzimática ou química, ou métodos de recombinação mediada por polimerase) para formar essencialmente qualquer sequência de ácidos nucleicos contínua desejada. A síntese dos ácidos nucleicos da invenção também pode ser facilitada (ou alternativamente executada) por meio de qualquer método adequado conhecido na técnica, incluindo, mas não se limitando à síntese química usando o método de fosforamidita clássico (*vide, por exemplo*, Beaucage *et al.* Tetrahedron Letters 22:1859-69 [1981]); ou o método descrito por Matthes *et al.* (See, Matthes *et al.*, EMBO J. 3:801-805 [1984], tal como é tipicamente praticado em métodos sintéticos automatizados. Os ácidos nucleicos da invenção podem também ser produzidos pelo uso de um sintetizador de DNA automático. Os ácidos nucleicos personalizados podem ser

comprados junto à uma variedade de fontes comerciais (*por exemplo*, The Midland Certified Reagent Company, the Great American Gene Company, Operon Technologies Inc., e DNA2.0). Outras técnicas para sintetizar ácidos nucleicos e princípios relacionados são conhecidas na técnica (*vide, por exemplo*, Itakura *et al.*, Ann. Rev. Biochem. 53:323 [1984]; e Itakura *et al.*, Science 198:1056 [1984]).

[000448] Conforme indicado acima, técnicas de DNA recombinante úteis na modificação de ácidos nucleicos são bem conhecidas na arte. Por exemplo, técnicas como, por exemplo, digestão por endonuclease de restrição, ligação, transcrição reversa e produção de cDNA, e reação em cadeia da polimerase (*por exemplo*, PCR) são conhecidas e facilmente empregadas pelos versados na técnica. Os nucleotídeos da invenção podem, também, ser obtidos pela triagem de bibliotecas de cDNA (*por exemplo*, bibliotecas de cDNA geradas com o uso de técnicas de mutagênese comumente usadas na arte, inclusive aquelas descritas aqui) com o uso de uma ou mais sondas de oligonucleotídeo que podem hibridizar ou amplificar por PCR polinucleotídeos que codificam um polipeptídeo(s) de protease variante da invenção. Os procedimentos para selecionar e isolar clones de cDNA e procedimentos de amplificação por PCR são bem conhecidos daqueles versados na técnica e são descritos em referências padrão conhecidas pelos versados na técnica. Alguns ácidos nucleicos da invenção podem ser obtidos pela alteração de uma cadeia principal de um polinucleotídeo de ocorrência natural (*por exemplo*, que codifica uma enzima ou protease original), por exemplo, por um procedimento de mutagênese conhecido (*por exemplo*, mutagênese sítio-dirigida, mutagênese por saturação do sítio, e recombinação *in vitro*).

Métodos de fabricação das proteases variantes modificadas da invenção

[000449] Vários métodos adequados são conhecidos na técnica para

gerar os polinucleotídeos modificados da invenção, que codificam as proteases variantes da invenção, incluindo, mas não se limitando a, por exemplo, mutagênese por saturação de sítio, mutagênese por varredura, mutagênese por inserção, mutagênese por deleção, mutagênese aleatória, mutagênese sítio-dirigida, e evolução dirigida, assim como várias outras abordagens recombinatórias. Os métodos de fabricação de polinucleotídeos e proteínas modificadas (*por exemplo*, proteases variantes) incluem metodologias de embaralhamento de DNA, métodos à base de recombinação não homóloga de genes, como ITCHY (*consulte*, Ostermeier *et al.*, 7:2139-44 [1999]), SCRACHY (*consulte*, Lutz *et al.* 98:11248-53 [2001]), SHIPREC (*consulte*, Sieber *et al.*, 19:456-60 [2001]), e NRR (*consulte*, Bittker *et al.*, 20:1024-9 [2001]; Bittker *et al.*, 101:7011-6 [2004]), métodos que se baseiam no uso de oligonucleotídeos para inserir mutações, deleções e/ou inserções aleatórias e direcionadas (*consulte*, Ness *et al.*, 20:1251-5 [2002]; Coco *et al.*, 20:1246-50 [2002]; Zha *et al.*, 4:34-9 [2003]; Glaser *et al.*, 149:3903-13 [1992]).

Vetores, células, e métodos para produzir as proteases variantes da invenção

[000450] A presente invenção apresenta vetores isolados ou recombinantes que compreendem pelo menos um polinucleotídeo da invenção aqui descrito (*por exemplo*, um polinucleotídeo que codifica uma protease variante da invenção aqui descrita), vetores de expressão ou cassetes de expressão isolados ou recombinantes compreendendo pelo menos um ácido nucleico ou polinucleotídeo da invenção, construtos de DNA isolados, substancialmente puros, ou recombinantes compreendendo pelo menos um ácido nucleico ou polinucleotídeo da invenção, células isoladas ou recombinantes compreendendo pelo menos um polinucleotídeo da invenção, culturas celulares compreendendo células que compreende pelo menos um polinucleotídeo da in-

venção, culturas celulares que compreende pelo menos um ácido nucleico ou polinucleotídeo da invenção, e composições que compreende um ou mais destes vetores, ácidos nucleicos, vetores de expressão, cassetes de expressão, construtos de DNA, células, culturas celulares, ou qualquer combinação ou misturas dos mesmos.

[000451] Em algumas modalidades, a invenção fornece células recombinantes compreendendo pelo menos um vetor (por exemplo, vetor de expressão ou construto de DNA) da invenção que compreende pelo menos um ácido nucleico ou polinucleotídeo da invenção. Algumas destas células recombinantes são transformadas ou transfectadas com este pelo menos um vetor. Tais células são tipicamente chamadas de células hospedeiras. Algumas de tais células compreendem células bacterianas, inclusive, mas não se limitando a células de *Bacillus sp.*, como células de *Bacillus subtilis*. A invenção também fornece células recombinantes (*por exemplo*, células hospedeiras recombinantes) compreendendo pelo menos uma protease variante da invenção.

[000452] Em algumas modalidades, a invenção apresenta um vetor que compreende um ácido nucleico ou polinucleotídeo da invenção. Em algumas modalidades, o vetor é um vetor de expressão ou cassete de expressão no qual uma sequência de polinucleotídeos da invenção, que codifica uma variante de protease da invenção, está operacionalmente ligada a um ou mais segmentos de ácido nucleico adicionais necessários para a expressão gênica eficaz (*por exemplo*, um promotor operacionalmente ligado ao polinucleotídeo da invenção, que codifica uma protease variante da invenção). Um vetor pode incluir um terminador de transcrição e/ou um gene de seleção, como, por exemplo, um gene para resistência a antibióticos que permite a manutenção contínua da cultura de células hospedeiras infectadas pelo plasmídeo por cultivo em meio contendo microbicida.

[000453] Um vetor de expressão pode ser derivado de DNA plasmí-

dial ou viral, ou em modalidades alternativas, contém elementos de ambos. Os vetores exemplificadores incluem, mas não se limitam a pXX, pC194, pJH101, pE194, pHP13 (*consulte*, Harwood e Cutting [eds.], capítulo 3, Molecular Biological Methods for *Bacillus*, John Wiley & Sons [1990]; os plasmídios de replicação adequados para *B. subtilis* incluem os mencionados na página 92; *consulte também*, Perego, Integrational Vectors for Genetic Manipulations in *Bacillus subtilis*, em Sonenshein *et al.*, [eds.] *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics, American Society for Microbiology, Washington, D.C. [1993], páginas 615-624).

[000454] Para a expressão e produção de uma proteína de interesse (*por exemplo*, protease variante) em uma célula, pelo menos um vetor de expressão compreendendo pelo menos uma cópia de um polinucleotídeo que codifica a protease modificada e, de preferência, compreendendo múltiplas cópias, é transformado na célula sob condições adequadas para expressão da protease. Em algumas modalidades da presente invenção, uma sequência de polinucleotídeos que codifica a protease variante (assim como outras sequências incluídas no vetor) é integrada no genoma da célula hospedeira, enquanto em outras modalidades, um vetor plasmidial que compreende uma sequência de polinucleotídeos que codifica a protease variante permanece como um elemento extracromossômico autônomo no interior da célula. A invenção fornece tanto os elementos de ácido nucleico extracromossômicos como as sequências de nucleotídeo de entrada que são integradas ao genoma da célula hospedeira. Os vetores aqui descritos são úteis para a produção das proteases variantes da invenção. Em algumas modalidades um construto de polinucleotídeo que codifica a protease variante está presente sobre um vetor de integração que permite a integração e, opcionalmente, a amplificação do polinucleotídeo que codifica a protease variante dentro do cromossomo bacteriano. Exemplos de sí-

tios para integração são bem conhecidos dos versados na técnica. Em algumas modalidades, a transcrição de um polinucleotídeo que codifica uma protease variante da invenção é feita por um promotor que é o promotor selvagem para a protease precursora selecionada. Em algumas outras modalidades, o promotor é heterólogo à protease precursora, mas é funcional na célula hospedeira. Especificamente, exemplos de promotores adequados para uso em células hospedeiras bacterianas incluem, mas não se limitam, por exemplo, aos promotores amyE, amyQ, amyL, pstS, sacB, pSPAC, pAprE, pVeg, pHpall promoters, o promotor do gene da amilase maltogênica de *B. stearothermophilus*, o gene da amilase de *B. amyloliquefaciens* (BAN), o gene da protease alcalina de *B. subtilis*, o gene da protease alcalina de *B. clausii*, e o gene da xilosidase de *B. pumilis*, o gene cryIIIA de *B. thuringiensis*, e o gene da alfa amilase de *B. licheniformis*. Os promotores adicionais incluem, mas não se limitam a, o promotor A4, assim como aos promotores de fago Lambda P_R ou P_L, e os promotores lac, trp ou tac de *E. coli*.

[000455] As proteases variantes da presente invenção podem ser produzidas em células hospedeiras de qualquer microrganismo Gram positivo adequado, inclusive bactérias e fungos. Por exemplo, em algumas modalidades, a protease variante é produzida em células hospedeiras de origem fúngica e/ou bacteriana. Em algumas modalidades, as células hospedeiras são *Bacillus sp.*, *Streptomyces sp.*, *Escherichia sp.* ou *Aspergillus sp.* Em algumas modalidades, as proteases variantes são produzidas por células hospedeiras de *Bacillus sp.* Exemplos de células hospedeiras de *Bacillus sp.* que podem ser usadas na produção das proteases variantes da invenção incluem, mas não se limitam a *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. pumilis*, *B. thuringiensis*, *B. clausii*, e *B. megaterium*,

assim como outros organismos dentro do gênero *Bacillus*. Em algumas modalidades, células hospedeiras de *B. subtilis* são usadas para a produção de proteases variantes. As patentes US 5.264.366 e 4.760.025 (RE 34.606) descrevem várias cepas hospedeiras de *Bacillus* que podem ser usadas para produzir as proteases variantes da invenção, embora outras cepas adequadas possam ser usadas.

[000456] Várias cepas bacterianas industriais que podem ser usadas para produzir as proteases variantes da invenção incluem cepas de *Bacillus sp.* não recombinantes (*isto é*, selvagens), assim como variantes de cepas de ocorrência natural e/ou cepas recombinantes. Em algumas modalidades, a cepa hospedeira é uma cepa recombinante, sendo que um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de interesse foi introduzido no hospedeiro. Em algumas modalidades, a cepa hospedeira é uma cepa hospedeira de *B. subtilis* e, particularmente, uma cepa hospedeira de *Bacillus subtilis* recombinante. Inúmeras cepas de *B. subtilis* são conhecidas, incluindo, mas não se limitando a, por exemplo, 1A6 (ATCC 39085), 168 (1A01), SB19, W23, Ts85, B637, PB1753 a PB1758, PB3360, JH642, 1A243 (ATCC 39,087), ATCC 21332, ATCC 6051, MI113, DE100 (ATCC 39,094), GX4931, PBT 110, e PEP 211strain (*vide, por exemplo*, Hoch *et al.*, Genetics 73:215–228 [1973]; *consulte também*, as patentes US n°s 4.450.235 e 4.302.544, e EP 0134048, cada uma das quais estando aqui incorporada a título de referência, em sua totalidade). O uso de *B. subtilis* como células hospedeiras para expressão é bem conhecido na técnica (*vide, por exemplo*, Palva *et al.*, Gene 19:81-87 [1982]; Fahnstock e Fischer, J. Bacteriol., 165:796–804 [1986]; e Wang *et al.*, Gene 69:39–47 [1988]).

[000457] Em algumas modalidades, a célula hospedeira de *Bacillus* é *Bacillus sp.* que inclui uma mutação ou deleção em pelo menos um dos seguintes genes: *degU*, *degS*, *degR* e *degQ*. De preferência, a mutação é em um gene *degU* e, com mais preferência, a mutação é

degU(Hy)32 (vide, por exemplo, Msadek et al., J. Bacteriol. 172:824-834 [1990]; e Olmos et al., Mol. Gen. Genet. 253:562–567 [1997]). Uma cepa hospedeira adequada é *Bacillus subtilis* carregando uma mutação *degU32(Hy)*. Em algumas modalidades, hospedeiro de *Bacillus* pode compreender uma mutação ou deleção em *scoC4* (vide, por exemplo, Caldwell et al., J. Bacteriol. 183:7329-7340 [2001]); *spolIE* (vide, por exemplo, Arigoni et al., Mol. Microbiol. 31:1407-1415 [1999]); e/ou *oppA* ou outros genes do operon *opp* (vide, por exemplo, Perego et al., Mol. Microbiol. 5:173-185 [1991]). De fato, contempla-se que qualquer mutação no operon *opp* que cause o mesmo fenótipo que uma mutação no gene *oppA* poderá ser usada em algumas modalidades da cepa de *Bacillus* alterada da invenção. Em algumas modalidades, estas mutações ocorrem sozinhas, enquanto em outras modalidades, combinações de mutações estão presentes. Em algumas modalidades, uma cepa alterada da célula hospedeira de *Bacillus* que pode ser usada para produzir uma protease variante da invenção é uma cepa hospedeira de *Bacillus* que já inclui uma mutação em um ou mais dos genes acima mencionados. Além disso, as células hospedeiras de *Bacillus* sp. que compreendem mutação(ões) e/ou deleções de genes de protease endógenos podem ser usados. Em algumas modalidades, a célula hospedeira de *Bacillus* compreende uma deleção dos genes *aprE* e *nprE*. Em outras modalidades, a célula hospedeira de *Bacillus* sp. compreende uma deleção de 5 genes de protease, enquanto em outras modalidades, a célula hospedeira de *Bacillus* sp. compreende uma deleção de 9 genes de protease (vide, por exemplo, a publicação de pedido de patente US nº 2005/0202535, aqui incorporada, a título de referência).

[000458] As células hospedeiras são transformadas com pelo menos um ácido nucleico que codifica pelo menos uma protease variante da invenção usando qualquer método adequado conhecido na técnica.

Quer o ácido nucleico seja incorporado em um vetor ou seja usado sem a presença de DNA plasmidial, ele é tipicamente introduzido em um microrganismo, em algumas modalidades, de preferência, uma célula de *E. coli* ou uma célula de *Bacillus* competente. Os métodos para introduzir um ácido nucleico (*por exemplo*, DNA) em células de *Bacillus* ou células de *E. coli* utilizando construtos ou vetores de DNA plasmidial e transformar tais construtos ou vetores de DNA plasmidial em tais células são bem conhecidos. Em algumas modalidades, os plasmídios são subsequentemente isolados das células de *E. coli* e transformados em células de *Bacillus*. Entretanto, não é essencial usar microrganismos intervenientes como, *por exemplo*, *E. coli* e, em algumas modalidades, um construto ou vetor de DNA é introduzido diretamente em um hospedeiro de *Bacillus*.

[000459] Os versados na técnica têm conhecimento de métodos adequados para introduzir as sequências de ácidos nucleicos ou polinucleotídeos da invenção em células de *Bacillus* (*vide, por exemplo*, Ferrari *et al.*, "Genetics", em Harwood *et al.* [eds.], Bacillus, Plenum Publishing Corp. [1989], pp. 57-72; Saunders *et al.*, J. Bacteriol. 157:718-726 [1984]; Hoch *et al.*, J. Bacteriol. 93:1925 -1937 [1967]; Mann *et al.*, Current Microbiol. 13:131-135 [1986]; Holubova, Folia Microbiol. 30:97 [1985]; Chang *et al.*, Mol. Gen. Genet. 168:11-115 [1979]; Vorobjeva *et al.*, FEMS Microbiol. Lett. 7:261-263 [1980]; Smith *et al.*, Appl. Env. Microbiol. 51:634 [1986]; Fisher *et al.*, Arch. Microbiol. 139:213-217 [1981]; e McDonald, J. Gen. Microbiol. 130:203 [1984]). De fato, métodos tais como transformação, incluindo transformação e congressão de protoplasto, transdução, e fusão de protoplasto são bem conhecidos e adequados ao uso na presente invenção. Métodos de transformação são usados para introduzir um construto ou vetor de DNA compreendendo um ácido nucleico que codifica uma protease variante da presente invenção em uma célula hospedeira. Métodos

conhecidos na técnica para transformar células de *Bacillus* incluem métodos tais como transformação por resgate de marcador plasmidial, que envolve a absorção de um plasmídio doador por células competentes carregando o plasmídio residente parcialmente homólogo (*consulte*, Contente *et al.*, Plasmid 2:555-571 [1979]; Haima *et al.*, Mol. Gen. Genet. 223:185-191 [1990]; Weinrauch *et al.*, J. Bacteriol. 154:1077-1087 [1983]; e Weinrauch *et al.*, J. Bacteriol. 169:1205-1211 [1987]). Neste método, o plasmídio de entrada se recombina com a região homóloga do plasmídio "auxiliar" residente em um processo que imita a transformação cromossômica.

[000460] Em adição aos métodos comumente usados, em algumas modalidades, as células hospedeiras são transformadas diretamente com um construto de DNA ou vetor que compreende um ácido nucleico que codifica uma protease variante da invenção (*isto é*, uma célula intermediária não é usada para amplificar, ou processar de outro modo o construto de DNA ou vetor antes da introdução na célula hospedeira). A introdução do construto de DNA ou vetor da invenção na célula hospedeira inclui os métodos físicos e químicos conhecidos na técnica para introduzir uma sequência de ácidos nucleicos (*por exemplo*, sequência de DNA) em uma célula hospedeira sem inserção em um plasmídio ou vetor. Tais métodos incluem, mas não se limitam a, precipitação com cloreto de cálcio, eletroporação, DNA nu, lipossomas e similares. Em modalidades adicionais, os construtos de DNA ou vetores são cotransformados com um plasmídio, sem serem inseridos no plasmídio. Em modalidades adicionais, um marcador seletivo é deletado da cepa de *Bacillus* alterada por métodos conhecidos na técnica (*videm* Stahl *et al.*, J. Bacteriol. 158:411-418 [1984]; e Palmeros *et al.*, Gene 247:255-264 [2000]).

[000461] Em algumas modalidades, as células transformadas da presente invenção são cultivadas em meios nutrientes convencionais.

As condições de cultivo adequadas específicas, como, por exemplo, temperatura, pH e similares são conhecidas pelos versados na técnica e são bem descritas na literatura científica. Em algumas modalidades, a invenção fornece uma cultura (*por exemplo*, cultura celular) que compreende pelo menos uma protease variante ou pelo menos um ácido nucleico da invenção. Também são fornecidas composições que compreendem pelo menos um ácido nucleico, vetor, ou construto de DNA da invenção.

[000462] Em algumas modalidades, as células hospedeiras transformadas com pelo menos uma sequência de polinucleotídeos que codifica pelo menos uma protease variante da invenção são cultivadas em um meio nutriente adequado sob condições que permitem a expressão da presente protease, após o que a protease resultante é recuperada da cultura. O meio usado para cultivar as células compreende qualquer meio convencional adequado para o cultivo das células hospedeiras, como, por exemplo, meio mínimo ou complexo contendo suplementos adequados. Os meios adequados estão disponíveis junto a fornecedores comerciais ou podem ser preparados de acordo com protocolos publicados (*vide, por exemplo*, os catálogos da American Type Culture Collection). Em algumas modalidades, a protease produzida pelas células é recuperada a partir do meio de cultura por procedimentos convencionais, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, à separação das células hospedeiras do meio por centrifugação ou filtração, precipitação dos componentes proteináceos do sobrenadante ou filtrado através de um sal (*por exemplo*, sulfato de amônio), purificação cromatografia (*por exemplo*, troca iônica, filtração em gel, afinidade, etc.). Qualquer método adequado para recuperar ou purificar uma protease variante pode ser usado na presente invenção.

[000463] Em algumas modalidades, uma protease variante produzida por uma célula hospedeira recombinante é secretada no meio de cultu-

ra. Uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um domínio facilitador de purificação pode ser usada para facilitar a purificação das proteínas solúveis. Um vetor ou construto de DNA que compreende uma sequência de polinucleotídeos que codifica uma protease variante pode compreender, adicionalmente, uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um domínio facilitador de purificação para facilitar a purificação da protease variante (*vide, por exemplo*, Kroll, D.J. *et al.*, DNA Cell Biol. 12:441-53 [1993]). Tais domínios facilitadores de purificação incluem, mas não se limitam, por exemplo, a peptídeos quelantes de metal como módulos de histidina-triptofano que permitem a purificação sobre metais imobilizados (*consulte*, Porath, Protein Expr. Purif. 3:263-281 [1992]), domínios de proteína A que permitem a purificação sobre imunoglobulina imobilizada, e o domínio utilizado no sistema de purificação por extensão/afinidade FLAGS (*por exemplo*, domínios de proteína A disponíveis junto à Immunex Corp., Seattle, WA, EUA). A inclusão de uma sequência ligante clivável como, por exemplo, o fator XA ou enteroquinase (*por exemplo*, as sequências disponíveis junto à Invitrogen, San Diego, CA, EUA) entre o domínio de purificação e a proteína heteróloga também pode ser usada para facilitar a purificação.

[000464] Testes para detectar e medir a atividade enzimática de uma enzima, como, por exemplo, uma protease variante da invenção, são bem conhecidos. Vários testes para detectar e medir a atividade de proteases (*por exemplo*, as proteases variantes da invenção), também são conhecidos dos versados na técnica. Em particular, testes para medir a atividade da protease estão disponíveis, os quais se baseiam na liberação de peptídeos solúveis em ácido a partir de caseína ou hemoglobina, medido como absorbância a 280 nm ou colorimetricamente usando o método de Folin, bem conhecido daqueles versados na técnica. Outros testes exemplificadores envolvem a solubilização de substratos cromogênicos (*vide, por exemplo*, Ward, "Proteinases", em

Fogarty (ed.). Microbial Enzymes and Biotechnology, Applied Science, London, [1983], páginas 251-317). Outros exemplos de testes incluem, mas não se limitam ao teste de succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-para nitroanilida (suc-AAPF-pNA) e o teste do sal de sódio de sulfonato de 2,4,6-trinitrobenzeno (teste de TNBS). Várias referências adicionais conhecidas dos versados na técnica fornecem métodos adequados (*vide, por exemplo*, Wells *et al.*, Nucleic Acids Res. 11:7911-7925 [1983]; Christanson *et al.*, Anal. Biochem. 223:119 -129 [1994]; e Hsia *et al.*, Anal Biochem. 242:221-227 [1999]).

[000465] Uma variedade de métodos pode ser usada para determinar o nível de produção de uma protease madura (*por exemplo*, proteases variantes maduras da presente invenção) em uma célula hospedeira. Tais métodos incluem, mas não se limitam a, por exemplo, métodos que usam anticorpos policlonais ou monoclonais específicos para a protease. Exemplos de métodos incluem, mas não se limitam a, ensaios imunossorvente ligados à enzima (ELISA), radioimunoensaios (RIA), imunoensaios fluorescentes (FIA), e seleção de célula ativada por fluorescente (FACS). Estes e outros testes são bem conhecidos na técnica (*vide, por exemplo*, Maddox *et al.*, J. Exp. Med. 158:1211 [1983]).

[000466] Em algumas outras modalidades, a invenção fornece métodos para fabricar ou produzir uma protease variante madura da invenção. Uma protease variante madura não inclui um peptídeo de sinal ou uma sequência de pró-peptídeo. Alguns métodos compreendem fazer ou produzir uma protease variante da invenção em uma célula hospedeira bacteriana recombinante, como, por exemplo, uma célula de *Bacillus sp.* (*por exemplo*, uma célula de *B. subtilis*). Em algumas modalidades, a invenção fornece um método de produzir uma protease variante da invenção, o método compreendendo cultivar uma célula hospedeira recombinante que compreende um vetor de expressão recom-

binante compreendendo um ácido nucleico que codifica uma protease variante da invenção sob condições propícias para a produção da protease variante. Alguns destes métodos compreendem adicionalmente recuperar a protease variante a partir da cultura.

[000467] Em algumas modalidades, a invenção apresenta métodos para produzir uma protease variante da invenção, sendo que os métodos compreendem: (a) introduzir um vetor de expressão recombinante que compreende um ácido nucleico que codifica uma protease variante da invenção em uma população de células (*por exemplo*, células bacterianas, como células de *B. subtilis*); e (b) cultivar as células em um meio de cultura sob condições propícias para a produção da protease variante codificada pelo vetor de expressão. Alguns destes métodos compreendem adicionalmente: (c) isolar a protease variante das células ou do meio de cultura.

Produtos para cuidados com tecidos e com a casa

[000468] Em algumas modalidades, as variantes de protease da presente invenção podem ser usadas em composições que compreendem um material auxiliar e uma variante de protease, sendo que a composição é um produto para cuidados de tecidos e da casa.

[000469] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa compreendem pelo menos uma variante de protease que compreende uma ou mais, de preferência, duas ou mais das seguintes mutações: X1R, X2S, X4R, X4S, X9A, X10S, X14K, X16S, X17R, X18R, X20R, X22A, X22R, X24R, X24W, X25R, X25V, X26F, X42I, X43R, X43A, X46R, X52F, X52E, X52N, X57R, X59A, X62E, X62Q, X68A, X68C, X71G, X72C, X74C, X75A, X75F, X75R, X76D, X78R, X82R, X86W, X89P, X89T, X89G, X89H, X89I, X89V, X89W, X91N, X94N, X100S, X101A, X101N, X101G, X101D, X103G, X103N, X104L, X104I, X106V, X106G, X108I, X111V, X112V, X115K, X115R, X117F, X118I, X121F, X128D, X128F, X128L, X128N,

X129E, X144R, X148I, X158E, X159E, X160D, X166D, X185E, X185I, X186H, X188E, X188D, X197F, X203E, X209S, X209N, X209F, X209T, X209E, X209H, X209G, X210R, X212I, X212F, X214F, X215N, X215D, X215E, X217E, X217N, X224A, X230E, X231I, X236F, X238R, X238K, X239K, X239G, X239R, X239S, X241R, X242R, X242L, X243R, X244R, X248I, X248V, X249R, X250I, X252R, X253R, X262D, X263F, X265F, X267V, X267N, X269I, X269R, X271F, X271I, X271H, X271P, X271T, X271V, X271L e X272F.

[000470] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa compreendem pelo menos uma variante de protease que compreende um ou mais dos seguintes conjuntos de mutações: X022R-X024R, X009A-X271L, X018R-X241R, X018R-X115R, X043R-X249R, X020R-X249R, X004R-X249R, X020R-X024R, X018R-X249R, X009A-X020R, X020R-X241R, X009A-X078R, X020R-X115R, X018R-X024R, X024R-X242R, X022R-X115R, X018R-X043R, X020R-X043R, X018R-X242R, X242R-X269R, X018R-X244R, X024R-X269R, X020R-X271L, X024R-X271L, X004R-X009A, X020R-X269R, X001R-X024R, X244R-X271L, X009A-X018R, X241R-X271L, X004R-X024R, X009A-X249R, X009A-X022R, X062E-X129E, X062E-X159E, X016S-X148I, X158E-X249R, X016S-X062E, X111V-X188D, X022A-X062E, X062E-X148I, X022A-X129E, X062E-X271F, X062E-X158E, X016S-X159E, X062E-X186H, X128N-X159E, X062E-X188D, X062E-X128N, X148I-X159E, X103G-X158E, X111V-X159E, X158E-X271F, X016S-X188D, X022A-X111V, X128N-X158E, X016S-X158E, X104L-X158E, X128N-X186H, X159E-X209E, X062E-X101A, X111V-X209E, X148I-X188D, X101A-X209E, X022A-X188D, X016S-X022A, X128N-X129E, X016S-X209E, X016S-X128N, X022A-X089P, X128N-X209E, X089P-X158E, X062E-X103G, X186H-X271F, X016S-X129E, X089P-X159E, X111V-X249R, X101A-X129E, X148I-X209E, X022A-X159E, X129E-X249R, X129E-X209E, X104L-X129E, X128N-X188D, X111V-

X158E, X022A-X158E, X062E-X209E, X062E-X249R, X101A-X186H, X089P-X129E, X129E-X271F, X22A-X111V-X159E, X101A-X103G-X104L-X209E, X101A-X103G-X104L-X159E, X101A-X103G-X104L-X188D, X101G-X103A-X104I-X159D, X22A-X103G-X159E, X22A-X128N-X271F-X209E, X22A-X209E-X271F, X22A-X101A-X209E, X101A-X209E-X271F, X22A-X111V-X128N, X22A-X101A-X159E, X101A-X103G-X104L, X22A-X101A-X103G-X104L, X101A-X103G-X104L, X101G-X103A-X104I, X101A-X103G-X104L-X128N, X103A-X104I-X159D-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X104I-X159D-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X159D-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X159D-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X159D-X232V-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X159D-X232V-X236H-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X159D-X232V-X236H-X245R-X252K, X101G-X103A-X104L-X159D-X232V-X236H-X245R-X248D, X62E-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X62E-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X249R, X22A-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X24R, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X253R, X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X22A-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X101G-X103A-X104I-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X238R, X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X245R-X248D-X271F, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X76D e X101G-X103A-X104I-X159E-X232V-X245R-X248D-X271F.

[000471] Em algumas modalidades, as composições de produto para

cuidados de tecidos e da casa compreendem pelo menos uma variante de protease que compreende um ou mais dos seguintes conjuntos de mutações: X022R-X024R, X009A-X271L, X018R-X241R, X018R-X115R, X043R-X249R, X020R-X249R, X004R-X249R, X020R-X024R, X018R-X249R, X009A-X020R, X020R-X241R, X009A-X078R, X020R-X115R, X018R-X024R, X024R-X242R, X022R-X115R, X018R-X043R, X020R-X043R, X018R-X242R, X242R-X269R, X018R-X244R, X024R-X269R, X020R-X271L, X024R-X271L, X004R-X009A, X020R-X269R, X001R-X024R, X244R-X271L, X009A-X018R, X241R-X271L, X004R-X024R, X009A-X249R, X009A-X022R, X062E-X129E, X062E-X159E, X016S-X148I, X158E-X249R, X016S-X062E, X111V-X188D, X022A-X062E, X062E-X148I, X022A-X129E, X062E-X271F, X062E-X158E, X016S-X159E, X062E-X186H, X128N-X159E, X062E-X188D, X062E-X128N, X148I-X159E, X103G-X158E, X111V-X159E, X158E-X271F, X016S-X188D, X022A-X111V, X128N-X158E, X016S-X158E, X104L-X158E, X128N-X186H, X159E-X209E, X062E-X101A, X111V-X209E, X148I-X188D, X101A-X209E, X022A-X188D, X016S-X022A, X128N-X129E, X016S-X209E, X016S-X128N, X022A-X089P, X128N-X209E, X089P-X158E, X062E-X103G, X186H-X271F, X016S-X129E, X089P-X159E, X111V-X249R, X101A-X129E, X148I-X209E, X022A-X159E, X129E-X249R, X129E-X209E, X104L-X129E, X128N-X188D, X111V-X158E, X022A-X158E, X062E-X209E, X062E-X249R, X101A-X186H, X089P-X129E, X129E-X271, X22A-X111V-X159E, X101A-X103G-X104L-X209E, X101A-X103G-X104L-X159E, X101A-X103G-X104L-X188D, X101G-X103A-X104I-X159D, X22A-X103G-X159E, X22A-X128N-X271F-X209E, X22A-X209E-X271F, X22A-X101A-X209E, X101A-X209E-X271F, X22A-X111V-X128N, X22A-X101A-X159E, X101A-X103G-X104L, X22A-X101A-X103G-X104L, X101A-X103G-X104L, X101G-X103A-X104I, X101A-X103G-X104L-X128N, X103A-X104I-X159D-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X104I-

X159D-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X159D-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X159D-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X159D-X232V-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X159D-X232V-X236H-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X159D-X232V-X236H-X245R-X252K, X101G-X103A-X104L-X159D-X232V-X236H-X245R-X248D, X62E-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X62E-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X249R, X22A-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X24R, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X253R, X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X22A-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X101G-X103A-X104I-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X238R, X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X245R-X248D-X271F, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X76D e X101G-X103A-X104I-X159E-X232V-X245R-X248D-X271F.

[000472] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa compreendem pelo menos uma variante de protease que compreende um total de três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou mesmo 25 mutações selecionadas a partir de: X1R, X2S, V4R, V4S, X9A, X10S, X14K, X16S, H17R, X18R, X20R, X22A, X22R, X24R, X24W, X25R, X25V, X26F, X42I, X43R, X43A, G46R, X52F, X52E, X52N, T57R, Q59A, X62E, X62Q, X68A, X68C, X71G, X72C, X74C, X75A, X75F, X75R, X76D, X78R, L82R, P86W, X89P, X89T, X89G, X89H, X89I, X89V, X89W, X91N, X94N, X100S, X101A, X101N,

X101G, X101D, X103G, X103N, X104L, X104I, X106V, X106G, X108I, X111V, X112V, X115K, X115R, X117F, X118I, X121F, X128D, X128F, X128L, X128N, X129E, X144R, X148I, X158E, X159E, X160D, X166D, X185E, X185I, X186H, X188E, X188D, D197F, X203E, X209S, X209N, X209F, X209T, X209E, X209H, X209G, X210R, X212I, X212F, X214F, X215N, X215D, X215E, X217E, X217N, X224A, X230E, X231I, X236F, X238R, X238K, X239K, X239G, X239R, X239S, X241R, X242R, X242L, X243R, X244R, X248I, X248V, X249R, X250I, X252R, X253R, X262D, X263F, X265F, X267V, X267N, X269I, X269R, X271F, X271I, X271H, X271P, X271T, X271V, X271L e X272F; e, opcionalmente, uma ou mais das seguintes mutações: X103A, X159D, X236H, X245R, X248D e X252K.

[000473] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa compreendem pelo menos uma variante de protease que compreende: duas ou mais das seguintes mutações: X1R, X2S, V4R, V4S, X9A, X10S, X14K, X16S, X22A, X22R, X24R, X25V, X26F, X42I, X52F, X52E, X52N, X62E, X62Q, X68A, X68C, X71G, X72C, X74C, X75A, X75F, X78R, X89P, X89T, X89G, X89H, X89W, X91N, X94N, X100S, X101A, X101N, X101G, X101D, X103G, X103N, X104L, X104I, X108I, X111V, X112V, X115K, X117F, X121F, X128D, X128F, X128L, X128N, X129E, X148I, X158E, X159E, X160D, X166D, X185E, X186H, X188E, X188D, X203E, X209S, X209N, X209F, X209T, X209E, X209H, X209G, X210R, X212I, X212F, X214F, X215N, X215D, X215E, X217E, X217N, X224A, X230E, X231I, X236F, X238R, X238K, X239K, X239G, X239R, X248V, X249R, X250I, X262D, X263F, X265F, X267V, X267N, X269I, X269R, X271F, X271I, X271H e X272F; e/ou um ou mais dos seguintes conjuntos de mutações: X062E-X129E, X062E-X159E, X016S-X148I, X158E-X249R, X016S-X062E, X111V-X188D, X022A-X062E, X062E-X148I, X022A-X129E, X062E-X271F, X062E-X158E, X016S-X159E, X062E-X186H,

X128N-X159E, X062E-X188D, X062E-X128N, X148I-X159E, X103G-X158E, X111V-X159E, X158E-X271F, X016S-X188D, X022A-X111V, X128N-X158E, X016S-X158E, X104L-X158E, X128N-X186H, X159E-X209E, X062E-X101A, X111V-X209E, X148I-X188D, X101A-X209E, X022A-X188D, X016S-X022A, X128N-X129E, X016S-X209E, X016S-X128N, X022A-X089P, X128N-X209E, X089P-X158E, X062E-X103G, X186H-X271F, X016S-X129E, X089P-X159E, X111V-X249R, X101A-X129E, X148I-X209E, X022A-X159E, X129E-X249R, X129E-X209E, X104L-X129E, X128N-X188D, X111V-X158E, X022A-X158E, X062E-X209E, X062E-X249R, X101A-X186H, X089P-X129E, X129E-X271F, X22A-X111V-X159E, X101A-X103G-X104L-X209E, X101A-X103G-X104L-X159E, X101A-X103G-X104L-X188D, X101G-X103A-X104I-X159D, X22A-X103G-X159E, X22A-X128N-X271F-X209E, X22A-X209E-X271F, X22A-X101A-X209E, X101A-X209E-X271F, X22A-X111V-X128N, X22A-X101A-X159E, X101A-X103G-X104L, X22A-X101A-X103G-X104L, X101A-X103G-X104L, X101G-X103A-X104I, X101A-X103G-X104L-X128N, X103A-X104I-X159D-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X104I-X159D-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X159D-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X159D-X236H-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X159D-X232V-X245R-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X159D-X232V-X236H-X248D-X252K, X101G-X103A-X104L-X159D-X232V-X236H-X245R-X252K, X101G-X103A-X104L-X159D-X232V-X236H-X245R-X248D, X62E-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X62E-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X249R, X22A-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X24R, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X253R, X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X245R-X248D-

X249R, X22A-X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X101G-X103A-X104I-X159E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X238R, X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X245R-X248D-X271F, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X76D e X101G-X103A-X104I-X159E-X232V-X245R-X248D-X271F; sendo que a pelo menos uma variante de protease tem uma carga líquida total de 0, -1, -2, -3, -4 ou -5 em relação à protease subtilisina GG36 de *B. lentus* que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2.

[000474] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa compreendem pelo menos uma variante de protease que compreende duas ou mais das seguintes mutações: X4R, X17R, X18R, X20R, X22R, X24R, X24W, X25R, X43R, X43A, X46R, X52F, X52N, X57R, X59A, X62Q, X71G, X75R, X76D, X78R, X82R, X86W, X89P, X89W, X89T, X89I, X89H, X89V, X104L, X106V, X106G, X115R, X118I, X121F, X144R, X185I, X197F, X209N, X209S, X217E, X231I, X239R, X239S, X241R, X242R, X242L, X243R, X244R, X248I, X249R, X252R, X253R, X271T, X271V, X271L, X271H, X271F, X271P, X1R, X9A, X212F e X269R; e/ou um ou mais dos seguintes conjuntos de mutações: X022R-X024R, X009A-X271L, X018R-X241R, X018R-X115R, X043R-X249R, X020R-X249R, X004R-X249R, X020R-X024R, X018R-X249R, X009A-X020R, X020R-X241R, X009A-X078R, X020R-X115R, X018R-X024R, X024R-X242R, X022R-X115R, X018R-X043R, X020R-X043R, X018R-X242R, X242R-X269R, X018R-X244R, X024R-X269R, X020R-X271L, X024R-X271L, X004R-X009A, X020R-X269R, X001R-X024R, X244R-X271L, X009A-X018R, X241R-X271L, X004R-X024R, X009A-X249R, X009A-X022R, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X271F, X101G-X103A-X104I-X158E-

X232V-X245R-X248D-X271F, X101G-X103A-X104I-X158E-X232V-X245R-X248D-X249R, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248D-X24R, X101G-X103A-X104L-X159D-X232V-X236H-X245R-X252K, X101G-X103A-X104L-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K; sendo que a pelo menos uma variante de protease tem uma carga líquida total de 0, +1, +2, +3, +4 ou +5 em relação à protease subtilisina GG36 de *B. lentus* que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2.

[000475] Em algumas modalidades, a(s) variante(s) de protease das composições de produto para cuidados de tecidos e da casa são derivadas de uma protease original que está disponível para comercialização (*por exemplo*, SAVINASE®, POLARZYME®, KANNASE®, LIQUINASE®, LIQUINASE ULTRA®, SAVINASE ULTRA®, ou OVOZYME® por Novozymes A/S); MAXACAL®, PROPERASE®, PURAFECT®, FN3®, FN4® e PURAFECT OXP®, PURAFAST™, PURAFECT® PRIME, ou PURAMAX® por Genencor International) e aquelas disponíveis junto à Henkel/ Kemira, especificamente BLAP (sequência mostrada na figura 29 do documento US 5.352.604 com as seguintes mutações: S99D + S101 R + S103A + V104I + G159S, deste ponto em diante no presente documento chamada de BLAP) e BLAP X (BLAP com S3T + V4I + V205I).

[000476] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa compreendem pelo menos uma variante de protease cujo original tem atividade proteolítica, sendo que a protease variante compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:2 por não mais que 50, não mais que 40, não mais que 35, não mais que 30, não mais que 25, não mais que 20, não mais que 19, não mais que 18, não mais que 17, não mais que 16, não mais que 15, não mais que 14, não mais que 13, não mais que 12, não mais que 11, não mais que 10, não mais

que 9, ou não mais que 8 resíduos de aminoácido, sendo que as posições de aminoácido são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado por alinhamento da sequência de aminoácidos da protease variante com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*, sendo que a subtilisina variante inclui um dos seguintes conjuntos de substituições: X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X236H-X245R-X248D-X252K; ou X87N; ou X87N-S101G-V104N; ou X76D, X103A- X104I.; ou Y167A-R170S-A194P; ou X87N-G118V-X129Q-X130A

[000477] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa compreendem pelo menos uma variante de protease que compreende uma ou mais, ou mesmo duas ou mais das seguintes mutações: A1R, Q2S, V4R, V4S, S9A, R10S, P14K, A16S, H17R, N18R, G20R, T22A, T22R, S24R, S24W, G25R, G25V, V26F, L42I, N43R, N43A, G46R, P52F, P52E, P52N, T57R, Q59A, N62E, N62Q, V68A, V68C, T71G, I72C, A74C. L75A, L75F, L75R, N76D, S78R, L82R, P86W, E89P, E89T, E89G, E89H, E89I, E89V, E89W, Y91N, K94N, G100S, S101A, S101N, S101G, S101D, S103G, S103N, V104L, V104I, S106V, S106G, A108I, L111V, E112V, G115K, G115R, N117F, G118I, V121F, S128D, S128F, S128L, S128N, P129E, S144R, L148I, A158E, G159E, S160D, S166D, N185E, N185I, R186H, S188E, S188D, D197F, V203E, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, P210R, S212I, S212F, Y214F, A215N, A215D, A215E, L217E, L217N, T224A, A230E, A231I, Q236F, N238R, N238K, P239K, P239G, P239R, P239S, W241R, S242R, S242L, N243R, V244R, N248I, N248V, H249R, L250I, N252R, T253R, L262D, Y263F, S265F, L267V, L267N, N269I, N269R, E271F, E271I, E271H, E271P, E271T, E271V, E271L e A272F

[000478] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa compreendem pelo menos uma variante de protease que compreende um ou mais dos seguintes conjuntos de mutações T022R-S024R, S009A-E271L, N018R-W241R, N018R-G115R, N043R-H249R, G020R-H249R, V004R-H249R, G020R-S024R, N018R-H249R, S009A-G020R, G020R-W241R, S009A-S078R, G020R-G115R, N018R-S024R, S024R-S242R, T022R-G115R, N018R-N043R, G020R-N043R, N018R-S242R, S242R-N269R, N018R-V244R, S024R-N269R, G020R-E271L, S024R-E271L, V004R-S009A, G020R-N269R, A001R-S024R, V244R-E271L, S009A-N018R, W241R-E271L, V004R-S024R, S009A-H249R, S009A-T022R, N062E-P129E, N062E-G159E, A016S-L148I, A158E-H249R, A016S-N062E, L111V-S188D, T022A-N062E, N062E-L148I, T022A-P129E, N062E-E271F, N062E-A158E, A016S-G159E, N062E-R186H, S128N-G159E, N062E-S188D, N062E-S128N, L148I-G159E, S103G-A158E, L111V-G159E, A158E-E271F, A016S-S188D, T022A-L111V, S128N-A158E, A016S-A158E, V104L-A158E, S128N-R186H, G159E-Y209E, N062E-S101A, L111V-Y209E, L148I-S188D, S101A-Y209E, T022A-S188D, A016S-T022A, S128N-P129E, A016S-Y209E, A016S-S128N, T022A-E089P, S128N-Y209E, E089P-A158E, N062E-S103G, R186H-E271F, A016S-P129E, E089P-G159E, L111V-H249R, S101A-P129E, L148I-Y209E, T022A-G159E, P129E-H249R, P129E-Y209E, V104L-P129E, S128N-S188D, L111V-A158E, T022A-A158E, N062E-Y209E, N062E-H249R, S101A-R186H, E089P-P129E, P129E-E271, T22A-L111V-G159E, S101A-S103G-V104L-Y209E, S101A-S103G-V104L-G159E, S101A-S103G-V104L-S188D, S101G-S103A-V104I-G159D, T22A-S103G-G159E, T22A-S128N-E271F-Y209E, T22A-Y209E-E271F, T22A-S101A-Y209E, S101A-Y209E-E271F, T22A-L111V-S128N, T22A-S101A-G159E, S101A-S103G-V104L, T22A-S101A-S103G-V104L, S101A-S103G-V104L, S101G-S103A-V104I, S101A-

S103G-V104L-S128N, S103A-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D, N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-S24R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-T253R, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N238R, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N76D e S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-E271F.

[000479] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa compreendem pelo menos uma variante de protease que compreendem um ou mais dos seguintes conjuntos de mutações: T022R-S024R, S009A-E271L, N018R-W241R, N018R-G115R, N043R-H249R, G020R-H249R, V004R-H249R, G020R-S024R, N018R-H249R, S009A-G020R, G020R-W241R, S009A-S078R, G020R-G115R, N018R-S024R, S024R-S242R, T022R-G115R, N018R-N043R, G020R-N043R, N018R-S242R, S242R-

N269R, N018R-V244R, S024R-N269R, G020R-E271L, S024R-E271L, V004R-S009A, G020R-N269R, A001R-S024R, V244R-E271L, S009A-N018R, W241R-E271L, V004R-S024R, S009A-H249R, S009A-T022R, N062E-P129E, N062E-G159E, A016S-L148I, A158E-H249R, A016S-N062E, L111V-S188D, T022A-N062E, N062E-L148I, T022A-P129E, N062E-E271F, N062E-A158E, A016S-G159E, N062E-R186H, S128N-G159E, N062E-S188D, N062E-S128N, L148I-G159E, S103G-A158E, L111V-G159E, A158E-E271F, A016S-S188D, T022A-L111V, S128N-A158E, A016S-A158E, V104L-A158E, S128N-R186H, G159E-Y209E, N062E-S101A, L111V-Y209E, L148I-S188D, S101A-Y209E, T022A-S188D, A016S-T022A, S128N-P129E, A016S-Y209E, A016S-S128N, T022A-E089P, S128N-Y209E, E089P-A158E, N062E-S103G, R186H-E271F, A016S-P129E, E089P-G159E, L111V-H249R, S101A-P129E, L148I-Y209E, T022A-G159E, P129E-H249R, P129E-Y209E, V104L-P129E, S128N-S188D, L111V-A158E, T022A-A158E, N062E-Y209E, N062E-H249R, S101A-R186H, E089P-P129E, P129E-E271, T22A-L111V-G159E, S101A-S103G-V104L-Y209E, S101A-S103G-V104L-G159E, S101A-S103G-V104L-S188D, S101G-S103A-V104I-G159D, T22A-S103G-G159E, T22A-S128N-E271F-Y209E, T22A-Y209E-E271F, T22A-S101A-Y209E, S101A-Y209E-E271F, T22A-L111V-S128N, T22A-S101A-G159E, S101A-S103G-V104L, T22A-S101A-S103G-V104L, S101A-S103G-V104L, S101G-S103A-V104I, S101A-S103G-V104L-S128N, S103A-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-

Q236H-Q245R-N248D, N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-
 Q245R-N248D-E271F, N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-
 Q245R-N248D-H249R, T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-
 Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-
 N248D-S24R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-
 T253R, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R,
 T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F,
 S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-
 S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N238R, S101G-S103A-
 V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-
 G159D-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-
 Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-
 N248D-N76D e S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-
 E271F

[000480] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa compreendem pelo menos uma variante de protease que compreende três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou mesmo 25 mutações dentro do grupo de posições que compreende as posições 1, 2, 4, 9, 10, 14, 16, 17, 18, 20, 22, 24, 25, 26, 42, 43, 46, 52, 57, 59, 62, 68, 71, 72, 74, 75, 76, 78, 82, 86, 89, 91, 94, 100, 101, 103, 104, 106, 108, 111, 112, 115, 117, 118, 121, 128, 129, 144, 148, 158, 159, 160, 166, 185, 186, 188, 197, 203, 209, 210, 212, 214, 215, 217, 224, 230, 231, 236, 238, 239, 241, 242, 243, 244, 248, 249, 250, 252, 253, 262, 263, 265, 267, 269, 271 e 272.

[000481] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa compreendem pelo menos uma variante de protease que compreende um total de três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou mesmo 25 mutações selecionadas a partir de: A1R, Q2S, V4R, V4S,

S9A, R10S, P14K, A16S, H17R, N18R, G20R, T22A, T22R, S24R, S24W, G25R, G25V, V26F, L42I, N43R, N43A, G46R, P52F, P52E, P52N, T57R, Q59A, N62E, N62Q, V68A, V68C, T71G, I72C, A74C, L75A, L75F, L75R, N76D, S78R, L82R, P86W, E89P, E89T, E89G, E89H, E89I, E89V, E89W, Y91N, K94N, G100S, S101A, S101N, S101G, S101D, S103G, S103N, V104L, V104I, S106V, S106G, A108I, L111V, E112V, G115K, G115R, N117F, G118I, V121F, S128D, S128F, S128L, S128N, P129E, S144R, L148I, A158E, G159E, S160D, S166D, N185E, N185I, R186H, S188E, S188D, D197F, V203E, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, P210R, S212I, S212F, Y214F, A215N, A215D, A215E, L217E, L217N, T224A, A230E, A231I, Q236F, N238R, N238K, P239K, P239G, P239R, P239S, W241R, S242R, S242L, N243R, V244R, N248I, N248V, H249R, L250I, N252R, T253R, L262D, Y263F, S265F, L267V, L267N. N269I, N269R, E271F, E271I, E271H, E271P, E271T, E271V, E271L e A272F; e, opcionalmente, uma ou mais das seguintes mutações: S103A, G159D, Q236H, Q245R, N248D e N252K.

[000482] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa compreendem pelo menos uma variante de protease que compreende duas ou mais das seguintes mutações: A1R, Q2S, V4R, V4S, S9A, R10S, P14K, A16S, T22A, T22R, S24R, G25V, V26F, L42I, P52F, P52E, P52N, N62E, N62Q, V68A, V68C, T71G, I72C, A74C. L75A, L75F, S78R, E89P, E89T, E89G, E89H, E89W, Y91N, K94N, G100S, S101A, S101N, S101G, S101D, S103G, S103N, V104L, V104I, A108I, L111V, E112V, G115K, N117F, V121F, S128D, S128F, S128L, S128N, P129E, L148I, A158E, G159E, S160D, S166D, N185E, R186H, S188E, S188D, V203E, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, P210R, S212I, S212F, Y214F, A215N, A215D, A215E, L217E, L217N, T224A, A230E, A231I, Q236F, N238R, N238K, P239K, P239G, P239R, N248V, H249R, L250I,

L262D, Y263F, S265F, L267V, L267N, N269I, N269R, E271F, E271I, E271H e A272F; e/ou um ou mais dos seguintes conjuntos de mutações: N062E-P129E, N062E-G159E, A016S-L148I, A158E-H249R, A016S-N062E, L111V-S188D, T022A-N062E, N062E-L148I, T022A-P129E, N062E-E271F, N062E-A158E, A016S-G159E, N062E-R186H, S128N-G159E, N062E-S188D, N062E-S128N, L148I-G159E, S103G-A158E, L111V-G159E, A158E-E271F, A016S-S188D, T022A-L111V, S128N-A158E, A016S-A158E, V104L-A158E, S128N-R186H, G159E-Y209E, N062E-S101A, L111V-Y209E, L148I-S188D, S101A-Y209E, T022A-S188D, A016S-T022A, S128N-P129E, A016S-Y209E, A016S-S128N, T022A-E089P, S128N-Y209E, E089P-A158E, N062E-S103G, R186H-E271F, A016S-P129E, E089P-G159E, L111V-H249R, S101A-P129E, L148I-Y209E, T022A-G159E, P129E-H249R, P129E-Y209E, V104L-P129E, S128N-S188D, L111V-A158E, T022A-A158E, N062E-Y209E, N062E-H249R, S101A-R186H, E089P-P129E, P129E-E271F, T22A-L111V-G159E, S101A-S103G-V104L-Y209E, S101A-S103G-V104L-G159E, S101A-S103G-V104L-S188D, S101G-S103A-V104I-G159D, T22A-S103G-G159E, T22A-S128N-E271F-Y209E, T22A-Y209E-E271F, T22A-S101A-Y209E, S101A-Y209E-E271F, T22A-L111V-S128N, T22A-S101A-G159E, S101A-S103G-V104L, T22A-S101A-S103G-V104L, S101A-S103G-V104L, S101G-S103A-V104I, S101A-S103G-V104L-S128N, S103A-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D, N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-

A232V-Q245R-N248D-E271F, N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-S24R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-T253R, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N238R, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N76D e S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-E271F; sendo que a pelo menos uma variante de protease tem uma carga líquida total de 0, +1, +2, +3, +4 ou +5 em relação à protease subtilisina GG36 de *B. lentus* que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2.

[000483] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa compreendem pelo menos uma variante de protease, sendo que pelo menos uma variante de protease é uma forma madura que tem atividade proteolítica e que compreende sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação das substituições de aminoácido selecionadas a partir de: X1R, X230E, X271L, X115R, X20R, X249R, X235F, X27V/F/L, X75E, X82R, X18R, X269R, X43D, X43R, X76D, X45T, X212F, X242R, X24R, X78R, X9A, X22R, X121E, X244R, X28E, X30E, X4R, e X241R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000484] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa compreendem pelo menos uma variante

de protease, sendo que pelo menos uma variante de protease compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou 25 mutações selecionadas do grupo de A1R, A230E, E271L, G115R, G20R, H249R, K235F, K27V/F/L, L75E, L82R, N18R, N269R, N43D, N43R, N76D, R45T, S212F, S242R, S24R, S78R, S9A, T22R, V121E, V244R, V28E, V30E, V4R, e W241R, sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000485] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa compreendem pelo menos uma variante de protease, sendo que pelo menos uma variante de protease compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou 25 mutações selecionadas do grupo de A1R, A230E, E271L, G115R, G20R, H249R, K235F, K27V/F/L, L75E, L82R, N18R, N269R, N43D, N43R, N76D, R45T, S212F, S242R, S24R, S78R, S9A, T22R, V121E, V244R, V28E, V30E, V4R, e W241R, e, compreende, opcionalmente, pelo menos uma mutação selecionada a partir do grupo de S103A, G159D, Q236H, Q245R, N248D e N252K, sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus*

amyloliquefaciens mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000486] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa compreendem pelo menos uma variante de protease, sendo que a pelo menos uma variante de protease é uma forma madura que tem atividade proteolítica e que compreende sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação das substituições de aminoácido selecionadas a partir de: X16S, X18R, X20R, X22A, X24R, X43R/D, X45T, X76D, X101A, X103G, X104L, X111V, X128N, X148I, X230E, X242R, e X249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000487] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa compreendem pelo menos uma variante de protease, sendo que a pelo menos uma variante de protease é uma forma madura que tem atividade proteolítica e que compreende sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação das substituições de aminoácido selecionadas a partir de: A16S, N18R, G20R, T22A, S24R, N43R, N43D, R45T, N76D, S101A, S103G, V104L, L111V, S128N, L148I, A230E, S242R, e H249R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000488] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa compreendem pelo menos uma variante de protease, sendo que a pelo menos uma variante de protease é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma se-

quência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X20R-X43R-X249R, X20R-X22R-X43R, X20R-X43R-X242R, X20R-X43R-X271L, X20R-X43R-X244R, X20R-X24R-X43R-X242R, X9A-X22R-X78R-X212F-X241R, X9A-X20R-X43R-X212F, X9A-X43R-X212F, X20R-X43R-X212F, X20R-X22R-X43R-X212F, X24R-X78R-X212F, X9A-X43R-X78R, X9A-X43R-X78R-X242R, X9A-X20R-X43R-X78R, X20R-X24R-X43R-X78R-X242R, X22R-X24R-X78R-X212F, X9A-X20R-X43R-X78R-X242R, X20R-X43R-X78R-X249R, X20R-X43R-X78R, X9A-X78R-X212F, X9A-X22R-X43R-X78R, X9A-X20R-X24R-X43R, X9A-X22R-X78R-X212F, X4R-X9A-X22R-X78R-X212F, X20R-X24R-X43R, X1R-X9A-X43R, X20R-X24R-X43R-X115R, X9A-X24R-X43R, X20R-X22R-X24R-X43R, X1R-X24R-X43R, X9A-X20R-X24R-X43R-X242R, X9A-X20R-X22R-X78R-X212F, X9A-X24R-X43R-X244R, X9A-X24R-X43R-X242R, X4R-X9A-X22R-X24R-X212F, e X22R-X24R-X43R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000489] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa compreendem pelo menos uma variante de protease, sendo que a pelo menos uma variante de protease é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: A1R, A230E, E271L, G115R, G20R, H249R, K235F, K27V/F/L, L75E, L82R, N18R, N269R, N43D, N43R, N76D, R45T, S212F, S242R, S24R, S78R, S9A, T22R, V121E, V244R, V28E, V30E, V4R, W241R, G20R-N43R-H249R, G20R-T22R-N43R, G20R-N43R-S242R, G20R-N43R-E271L, G20R-N43R-V244R, G20R-S24R-N43R-S242R, S9A-T22R-S78R-S212F-

W241R, S9A-G20R-N43R-S212F, S9A-N43R-S212F, G20R-N43R-S212F, G20R-T22R-N43R-S212F, S24R-S78R-S212F, S9A-N43R-S78R, S9A-N43R-S78R-S242R, S9A-G20R-N43R-S78R, G20R-S24R-N43R-S78R-S242R, T22R-S24R-S78R-S212F, S9A-G20R-N43R-S78R-S242R, G20R-N43R-S78R-H249R, G20R-N43R-S78R, S9A-S78R-S212F, S9A-T22R-N43R-S78R, S9A-G20R-S24R-N43R, S9A-T22R-S78R-S212F, V4R-S9A-T22R-S78R-S212F, G20R-S24R-N43R, A1R-S9A-N43R, G20R-S24R-N43R-G115R, S9A-S24R-N43R, G20R-T22R-S24R-N43R, A1R-S24R-N43R, S9A-G20R-S24R-N43R-S242R, S9A-G20R-T22R-S78R-S212F, S9A-S24R-N43R-V244R, S9A-S24R-N43R-S242R, V4R-S9A-T22R-S24R-S212F, e T22R-S24R-N43R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000490] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa compreendem pelo menos uma variante de protease, sendo que a pelo menos uma variante de protease é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R, X101G-X103A-X104I-X159R-X232V-X245R-X248D, X101G-X103A-X104I-X159D-X232V-X245R-X248R, X101G-X103A-X104I-X232V-X245R, X101G-X103A-X104I-X232V-X245R-X248R, X101G-X103A-X104I-X159R-X232V-X245R-X248R, e X101G, X103A, X104I, X232V, X236H, X245R, e X252K, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000491] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa compreendem pelo menos uma variante de protease, sendo que a pelo menos uma variante de protease é uma forma madura que tem atividade proteolítica e que compreende sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação das substituições de aminoácido selecionadas a partir de: S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-G159R-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248R, S101G-S103A-V104I-G159R-A232V-Q245R-N248R, S101G, S103A, V104I, A232V, Q236H, e Q245R, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000492] Em um aspecto da dita composição, a dita composição compreende uma variante de protease para água fria, sendo que a dita variante de protease para água fria é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende sequências de aminoácidos que compreendem uma combinação das substituições de aminoácido selecionada a partir de: X16S, X22A, X24R, X62E, X76D, X89P, X101A/G, X103G/A, X104L/I, X111V, X128N, X129E, X232V, X148I, X158E, X159D/E, X166D, X186H, X188D, X209E, X236H, X238R, X245R, X248D/R, X249R, X252K/R, X253R, e X271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000493] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa compreendem pelo menos uma variante de protease, sendo que a pelo menos uma variante de protease é uma

forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos que compreende uma combinação de substituições de aminoácido selecionada a partir de: A16S, T22A, S24R, N62E, N76D, E89P, S101A/G, S103G/A, V104L/I, L111V, S128N, P129E, A232V, L148I, A158E, G159D/E, R186H, S188D, Y209E, Q236H, Q245R, N248D/R, H249R, N252K/R, T253R, e E271F sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID NO:1.

[000494] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de protease de protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, sendo que a protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* compreende a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:2, sendo que a variante de protease compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou 25 mutações selecionadas do grupo de A16S, T22A, S24R, N62E, N76D, E89P, S101A/G, S103G/A, V104L/I, L111V, S128N, P129E, A232V, L148I, A158E, G159D/E, R186H, S188D, Y209E, Q236H, Q245R, N248D/R, H249R, N252K/R, T253R, e E271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000495] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa compreendem pelo menos uma variante de protease que compreende uma sequência de aminoácidos que dife-

re da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou 25 mutações selecionadas do grupo de A16S, T22A, S24R, N62E, N76D, E89P, S101A/G, S103G/A, V104L/I, L111V, S128N, P129E, A232V, L148I, A158E, G159D/E, R186H, S188D, Y209E, Q236H, Q245R, N248D/R, H249R, N252K/R, T253R, e E271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000496] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de protease de protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, sendo que a protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* compreende a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:2, sendo que a variante de protease compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou 25 mutações selecionadas do grupo de A16S, T22A, S24R, N62E, N76D, E89P, S101A/G, S103G/A, V104L/I, L111V, S128N, P129E, A232V, L148I, A158E, G159D/E, R186H, S188D, Y209E, Q236H, Q245R, N248D/R, H249R, N252K/R, T253R, e E271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina

BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000497] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa compreendem pelo menos uma variante de protease que compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 e sendo que a carga líquida total da variante de protease é 0, +1, +2, +3, +4, +5, -1, -2, -3, -4, ou -5 em relação à carga líquida total da protease subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, e sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000498] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa compreendem pelo menos uma variante de protease que compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou 25 mutações selecionadas do grupo de A1R, Q2S, V4R, V4S, S9A, R10S, P14K, A16S, H17R, N18R, G20R, T22A, T22R, S24R, S24W, G25R, G25V, V26F, L42I, N43R, N43A, G46R, P52F, P52E, P52N, T57R, Q59A, N62E, N62Q, V68A, V68C, T71G, I72C, A74C, L75A, L75F, L75R, N76D, S78R, L82R, P86W, E89P, E89T, E89G, E89H, E89I, E89V, E89W, Y91N, K94N, G100S, S101A, S101N, S101G, S101D, S103G, S103N, V104L, V104I, S106V, S106G, A108I, L111V, E112V, G115K, G115R, N117F, G118I, V121F, S128D, S128F, S128L, S128N, P129E, S144R, L148I, A158E, G159E, S160D, S166D, N185E, N185I, R186H, S188E, S188D, D197F, V203E, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E,

Y209H, Y209G, P210R, S212I, S212F, Y214F, A215N, A215D, A215E, L217E, L217N, T224A, A230E, A231I, Q236F, N238R, N238K, P239K, P239G, P239R, P239S, W241R, S242R, S242L, N243R, V244R, N248I, N248V, H249R, L250I, N252R, T253R, L262D, Y263F, S265F, L267V, L267N, N269I, N269R, E271F, E271I, E271H, E271P, E271T, E271V, E271L e A272F, e, compreende, opcionalmente, pelo menos uma mutação selecionada a partir do grupo de S103A, G159D, Q236H, Q245R, N248D e N252K, sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000499] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa compreendem pelo menos uma variante de protease que compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou 25 mutações selecionadas do grupo de A16S, T22A, S24R, N62E, N76D, E89P, S101A/G, S103G/A, V104L/I, L111V, S128N, P129E, A232V, L148I, A158E, G159D/E, R186H, S188D, Y209E, Q236H, Q245R, N248D/R, H249R, N252K/R, T253R, e E271F, sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000500] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa compreendem pelo menos uma variante de protease que compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou 25 mutações selecionadas do grupo de A1R, A230E, E271L, G115R, G20R, H249R, K235F, K27V/F/L, L75E, L82R, N18R, N269R, N43D, N43R, N76D, R45T, S212F, S242R, S24R, S78R, S9A, T22R, V121E, V244R, V28E, V30E, V4R, e W241R, sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000501] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa compreendem pelo menos uma variante de protease que compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2, sendo que a dita variante de protease compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou 25 mutações selecionadas do grupo de A1R, A230E, E271L, G115R, G20R, H249R, K235F, K27V/F/L, L75E, L82R, N18R, N269R, N43D, N43R, N76D, R45T, S212F, S242R, S24R, S78R, S9A, T22R, V121E, V244R, V28E, V30E, V4R, e W241R, e compreende, opcionalmente, pelo menos uma mutação selecionada a partir do grupo de S103A, G159D, Q236H, Q245R, N248D e N252K, sendo que as posições de aminoácido da variante de

protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO:1, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[000502] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa compreendem pelo menos uma variante de protease que compreende duas ou mais das seguintes mutações: V4R, H17R, N18R, G20R, T22R, S24R, S24W, G25R, N43R, N43A, G46R, P52F, P52N, T57R, Q59A, N62Q, T71G, L75R, N76D, S78R, L82R, P86W, E89P, E89W, E89T, E89I, E89H, E89V, V104L, S106V, S106G, G115R, G118I, V121F, S144R, N185I, D197F, Y209N, Y209S, L217E, A231I, P239R, P239S, W241R, S242R, S242L, N243R, V244R, N248I, H249R, N252R, T253R, E271T, E271V, E271L, E271H, E271F, E271P, A1R, S9A, S212F e N269R; e/ou um ou mais dos seguintes conjuntos de mutações: T022R-S024R, S009A-E271L, N018R-W241R, N018R-G115R, N043R-H249R, G020R-H249R, V004R-H249R, G020R-S024R, N018R-H249R, S009A-G020R, G020R-W241R, S009A-S078R, G020R-G115R, N018R-S024R, S024R-S242R, T022R-G115R, N018R-N043R, G020R-N043R, N018R-S242R, S242R-N269R, N018R-V244R, S024R-N269R, G020R-E271L, S024R-E271L, V004R-S009A, G020R-N269R, A001R-S024R, V244R-E271L, S009A-N018R, W241R-E271L, V004R-S024R, S009A-H249R, S009A-T022R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-S24R, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N252K e S101G-S103A-V104L-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K; sendo que a pelo menos uma

variante de protease tem uma carga líquida total de 0, -1, -2, -3, -4 ou -5 em relação à protease subtilisina GG36 de *B. lentus* que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2.

[000503] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa compreendendo pelo menos uma variante de protease compreendem pelo menos um material auxiliar selecionado a partir de um encapsulado que compreende um perfume, um agente de matiz, tensoativos, builders, agentes quelantes, agentes inibidores de transferência de corantes, dispersantes, enzimas adicionais, estabilizantes de enzimas, materiais catalíticos, ativadores de alveamento, peróxido de hidrogênio, fontes de peróxido de hidrogênio, perácidos pré-formados, agentes poliméricos dispersantes, agentes de remoção de sujeira/antirredeposição de argila, alvejantes, supressores de espuma, corantes, perfumes, agentes elastificantes de estrutura, amaciantes de tecido, veículos, hidrótropos, elementos auxiliares ao processamento, solventes, pigmentos e misturas dos mesmos.

[000504] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa compreendem pelo menos um material auxiliar selecionado a partir de encapsulados de perfume, agentes de matiz de tecido, alvejantes solúveis em água fria, um catalisador de alveamento que pode compreender um material selecionado de cátions de imínio, políons de imínio; zwitteríons de imínio; aminas modificadas; óxidos de amina modificados; N-sulfonil iminas; N-fosfonil iminas; N-acil iminas; dióxidos de tiadiazol; perfluoroiminas; cetonas de açúcar cíclico e misturas dos mesmos; lipases de primeira lavagem; celulasas bacterianas de limpeza; tensoativos não iônicos de Guerbet; e misturas dos mesmos.

[000505] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa que compreendem pelo menos uma variante de protease compreendem, adicionalmente, pelo menos uma

protease não-imunoequivalente adicional selecionada a partir de subtilisinas (EC 3.4.21.62); proteases semelhantes à tripsina ou semelhantes à quimotripsina; metaloproteases; e misturas dos mesmos.

[000506] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa que compreendem pelo menos uma variante de protease compreendem, adicionalmente, pelo menos uma protease não-imunoequivalente adicional selecionada a partir de: subtilisinas (EC 3.4.21.62) derivadas de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* e *B. gibsonii*; proteases de tripsina e/ou proteases de quimotripsina derivadas de *Cellulomonas*; metaloproteases derivadas de *Bacillus amyloliquefaciens*; e misturas dos mesmos.

[000507] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa que compreendem pelo menos uma variante de protease compreendem, adicionalmente, pelo menos uma enzima adicional selecionada a partir de hemicelulases, peroxidases, proteases, Celulases, celobiose desidrogenases, xiloglucanases, xilanasases, lipases, fosfolipases, esterases, cutinases, pectinases, mananases, pectato liases, queratinases, redutases, oxidases, fenoloxidasases, lipoxigenases, ligninases, pululanases, tanases, pentosanases, liquenases glucanases, arabinosidases, hialuronidasases, condroitinasases, lacases, amilases, e misturas das mesmas.

[000508] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa que compreendem pelo menos uma variante de protease compreendem, adicionalmente, pelo menos uma enzima adicional selecionada a partir de lipases de primeira lavagem; alfa-amilases; celulases bacterianas de limpeza; e misturas das mesmas.

[000509] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa que compreendem pelo menos uma variante de protease compreendem, adicionalmente, pelo menos um dos

seguintes: um encapsulado compreendendo um perfume que compreende uma microcápsula de perfume; um agente de matiz que compreende um material selecionado de corantes básicos, ácidos, hidrofóbicos, diretos e poliméricos, e conjugados de corante que possuem um comprimento de onda de absorção de pico de 550 nm a 650 nm e misturas dos mesmos; um tensoativo deterativo que compreende um material selecionado de tensoativos deterativos aniônicos, tensoativos deterativos não iônicos, tensoativos deterativos catiônicos, tensoativos detergentes zwitteriônicos e tensoativos deterativos anfotéricos e misturas dos mesmos; um builder que compreende um material selecionado de zeólitos, fosfatos e misturas dos mesmos; um sal de silicato que compreende um material selecionado de silicato de sódio, silicato de potássio e misturas dos mesmos; um alvejante que compreende um material selecionado de alvejantes solúveis em água fria e misturas dos mesmos; um polímero de carboxilato que compreende um material selecionado de copolímero aleatório de maleato/acrilato ou homopolímero de poliácrlato e misturas dos mesmos; um polímero para liberação de sujeiras que compreende um material selecionado de copolímeros de tereftalato e misturas dos mesmos; um polímero celulósico que compreende um material selecionado de alquil celulose, alquil alcóxi alquil celulose, carbóxi alquil celulose, alquil carbóxi alquil celulose e misturas dos mesmos; um catalisador de alvejamento que compreende um material selecionado de cátions de imínio, políons de imínio; zwitteríons de imínio; aminas modificadas; óxidos de amina modificados; N-sulfonil iminas; N-fosfonil iminas; N-acil iminas; dióxidos de tiadiazol; perfluoroiminas; cetonas de açúcar cíclico e misturas dos mesmos; um ativador de alvejamento que compreende um material selecionado de sulfonato de dodecanoil oxibenzeno, sulfonato de decanoil oxibenzeno, ácido decanoil oxibenzoico ou seus sais, 3,5,5-trimetil hexanoilóxi benzeno sulfonato, tetra acetil etileno diamina (TAED), sulfonato de

nonanoiloxibenzeno (NOBS) e misturas dos mesmos; uma fonte de peróxido de hidrogênio que compreende um material selecionado de sais de peridrato inorgânico, incluindo sais de metais alcalinos como sais de sódio de perborato (geralmente mono- ou tetra-hidrato), percarbonato, persulfato, perfosfato, sais de persilicato e misturas dos mesmos; um quelante compreendendo um material selecionado de DTPA (ácido dietileno triamina penta-acético), HEDP (ácido hidroxietano difosfônico), DTPMP (dietileno triamina penta(ácido metileno fosfônico)), ácido etilenodiamina dissuccínico (EDDS), hidrato de sal dissódico de ácido 1,2-di-hidroxibenzeno-3,5-dissulfônico, derivados dos ditos quelantes; e misturas dos mesmos.

[000510] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa que compreendem pelo menos uma variante de protease compreendem um agente de matiz de tecido selecionado do grupo consistindo em corantes; conjugados corante-argila que compreendem pelo menos um corante catiônico básico e uma argila esmectita; e misturas dos mesmos.

[000511] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa que compreendem pelo menos uma variante de protease compreendem pelo menos um agente de matiz de tecidos selecionado a partir de corantes de pequenas moléculas; corantes poliméricos e misturas dos mesmos; conjugados corante-argila que compreendem pelo menos um corante catiônico básico e uma argila esmectita; e misturas dos mesmos.

[000512] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa que compreendem pelo menos uma variante de protease são fornecidas em doses unitárias com compartimentos únicos ou múltiplos. Em algumas modalidades, a composição é uma dose unitária com múltiplos compartimentos, sendo que a variante de protease está em um compartimento diferente do que qualquer

fonte de peróxido de hidrogênio e/ou quelante e/ou enzima adicional.

[000513] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa que compreendem pelo menos uma variante de protease compreendem um líquido de lavagem, sendo que pelo menos uma variante de protease compreende duas ou mais das seguintes mutações: A1R, Q2S, V4R, V4S, S9A, R10S, P14K, A16S, T22A, T22R, S24R, G25V, V26F, L42I, P52F, P52E, P52N, N62E, N62Q, V68A, V68C, T71G, I72C, A74C, L75A, L75F, S78R, E89P, E89T, E89G, E89H, E89W, Y91N, K94N, G100S, S101A, S101N, S101G, S101D, S103G, S103N, V104L, V104I, A108I, L111V, E112V, G115K, N117F, V121F, S128D, S128F, S128L, S128N, P129E, L148I, A158E, G159E, S160D, S166D, N185E, R186H, S188E, S188D, V203E, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, P210R, S212I, S212F, Y214F, A215N, A215D, A215E, L217E, L217N, T224A, A230E, A231I, Q236F, N238R, N238K, P239K, P239G, P239R, N248V, H249R, L250I, L262D, Y263F, S265F, L267V, L267N, N269I, N269R, E271F, E271I, E271H e A272F; e/ou um ou mais dos seguintes conjuntos de mutações: N062E-P129E, N062E-G159E, A016S-L148I, A158E-H249R, A016S-N062E, L111V-S188D, T022A-N062E, N062E-L148I, T022A-P129E, N062E-E271F, N062E-A158E, A016S-G159E, N062E-R186H, S128N-G159E, N062E-S188D, N062E-S128N, L148I-G159E, S103G-A158E, L111V-G159E, A158E-E271F, A016S-S188D, T022A-L111V, S128N-A158E, A016S-A158E, V104L-A158E, S128N-R186H, G159E-Y209E, N062E-S101A, L111V-Y209E, L148I-S188D, S101A-Y209E, T022A-S188D, A016S-T022A, S128N-P129E, A016S-Y209E, A016S-S128N, T022A-E089P, S128N-Y209E, E089P-A158E, N062E-S103G, R186H-E271F, A016S-P129E, E089P-G159E, L111V-H249R, S101A-P129E, L148I-Y209E, T022A-G159E, P129E-H249R, P129E-Y209E, V104L-P129E, S128N-S188D, L111V-A158E, T022A-A158E, N062E-Y209E, N062E-H249R, S101A-R186H,

E089P-P129E, P129E-E271F, T22A-L111V-G159E, S101A-S103G-V104L-Y209E, S101A-S103G-V104L-G159E, S101A-S103G-V104L-S188D, S101G-S103A-V104I-G159D, T22A-S103G-G159E, T22A-S128N-E271F-Y209E, T22A-Y209E-E271F, T22A-S101A-Y209E, S101A-Y209E-E271F, T22A-L111V-S128N, T22A-S101A-G159E, S101A-S103G-V104L, T22A-S101A-S103G-V104L, S101A-S103G-V104L, S101G-S103A-V104I, S101A-S103G-V104L-S128N, S103A-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D, N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-S24R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-T253R, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N238R, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N76D e S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-E271F; a dita variante de protease para água fria tendo uma carga líquida total de +1, 0, -1, -2, -3, -4 ou -5 em relação à protease subtilisina GG36 de *B. lentus* que tem a

sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:1 e; sendo que o líquido de lavagem tem uma condutividade de cerca de 0,1 mS/cm a cerca de 3 mS/cm, de cerca de 0,3 mS/cm a cerca de 2,5 mS/cm, ou mesmo de cerca de 0,5 mS/cm a cerca de 2 mS/cm.

[000514] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa que compreendem pelo menos uma variante de protease compreendem um líquido de lavagem que compreende um material auxiliar, sendo que pelo menos uma variante de protease compreende duas ou mais das seguintes mutações: V4R, H17R, N18R, G20R, T22R, S24R, S24W, G25R, N43R, N43A, G46R, P52F, P52N, T57R, Q59A, N62Q, T71G, L75R, N76D, S78R, L82R, P86W, E89P, E89W, E89T, E89I, E89H, E89V, V104L, S106V, S106G, G115R, G118I, V121F, S144R, N185I, D197F, Y209N, Y209S, L217E, A231I, P239R, P239S, W241R, S242R, S242L, N243R, V244R, N248I, H249R, N252R, T253R, E271T, E271V, E271L, E271H, E271F, E271P, A1R, S9A, S212F e N269R; e/ou um ou mais dos seguintes conjuntos de mutações: T022R-S024R, S009A-E271L, N018R-W241R, N018R-G115R, N043R-H249R, G020R-H249R, V004R-H249R, G020R-S024R, N018R-H249R, S009A-G020R, G020R-W241R, S009A-S078R, G020R-G115R, N018R-S024R, S024R-S242R, T022R-G115R, N018R-N043R, G020R-N043R, N018R-S242R, S242R-N269R, N018R-V244R, S024R-N269R, G020R-E271L, S024R-E271L, V004R-S009A, G020R-N269R, A001R-S024R, V244R-E271L, S009A-N018R, W241R-E271L, V004R-S024R, S009A-H249R, S009A-T022R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-S24R, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N252K e S101G-S103A-V104L-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, a dita variante de protease para água fria ten-

do uma carga líquida total de 0, +1, +2, +3, +4 ou +5 em relação à protease subtilisina GG36 de *B. lentus* que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2; e o dito líquido de lavagem de detergente para lavagem de roupas tendo uma condutividade de cerca de 3 mS/cm a cerca de 30 mS/cm, de cerca de 3,5 mS/cm a cerca de 20 mS/cm, ou mesmo de cerca de 4 mS/cm a cerca de 10 mS/cm.

[000515] Em algumas modalidades, as composições de produto para cuidados de tecidos e da casa que compreende pelo menos uma variante de protease compreendem um ou mais dos seguintes ingredientes (com base no peso do total da composição): de cerca de 0,0005 % a cerca de 0,1 %, em peso, de cerca de 0,001 % a cerca de 0,05 %, em peso, ou mesmo de cerca de 0,002 % a cerca de 0,03 %, em peso da dita variante de protease para água fria; e um ou mais dos seguintes: de cerca de 0,00003 % a cerca de 0,1 %, em peso, de agente de matiz de tecidos; de cerca de 0,001 % a cerca de 5%, em peso, de cápsulas de perfume; de cerca de 0,001 % a cerca de 1 %, em peso, de alvejantes solúveis em água fria; de cerca de 0,00003 % a cerca de 0,1 %, em peso, de catalisadores de alvejamento; de cerca de 0,00003 % a cerca de 0,1 %, em peso, de lipases de primeira lavagem; de cerca de 0,00003 % a cerca de 0,1 %, em peso, de celulasas bacterianas de limpeza; e/ou de cerca de 0,05 % a cerca de 20%, em peso, de tensoativos não iônicos de Guerbet.

[000516] Em algumas modalidades, a composição de produto para cuidados de tecidos e da casa é um detergente para lavagem de roupas granular ou em pó que não compreende uma protease para água fria.

[000517] Em algumas modalidades, a composição de produto para cuidados de tecidos e da casa é um detergente para lavagem de roupas líquido, um detergente para lavagem de louças.

[000518] Pretende-se que o produto para cuidados de tecidos e da

casa seja fornecido em qualquer forma adequada, incluindo um fluido ou sólido. O produto para cuidados de tecidos e da casa pode estar sob a forma de um saco com uma dose unitária, especialmente quando está sob a forma de um líquido e, tipicamente, o produto para cuidados de tecidos e da casa é pelo menos parcialmente, ou mesmo completamente, encerrado por um saco solúvel em água. Além disso, em algumas modalidades dos produtos para cuidados com tecidos e com a casa que compreendem pelo menos uma variante de protease, o produto para cuidados de tecidos e da casa pode ter qualquer combinação de parâmetros e/ou características detalhadas acima.

Composições de limpeza

[000519] Exceto onde especificado em contrário, todos os níveis de componente ou composição aqui fornecidos são com relação ao teor de ativo daquele componente ou composição, e não incluem impurezas, por exemplo, solventes residuais ou subprodutos, que podem estar presente em fontes comercialmente disponíveis. Os pesos dos componentes enzimáticos são com base na proteína ativa total. Todas as porcentagens e razões são calculadas em peso, exceto onde indicado em contrário. Todas as porcentagens e razões são calculadas com base na composição total exceto onde indicado em contrário. Nas composições detergentes exemplificadas, os teores de enzimas são expressos como enzima pura em peso do total da composição e, exceto onde especificado em contrário, os ingredientes detergentes são expressos em peso total das composições.

[000520] Conforme indicado na presente invenção, em algumas modalidades, as composições de limpeza da presente invenção compreendem, ainda, materiais auxiliares incluindo, mas não se limitando a, tensoativos, builders, alvejantes, ativadores de alvejamento, catalisadores de alvejamento, outras enzimas, sistemas estabilizantes de enzimas, quelantes, alvejantes ópticos, polímeros para liberação de sujei-

ras, agentes para transferência de corantes, dispersantes, supressores de espuma, corantes, perfumes, corantes, sais de carga, hidrótropos, fotoativadores, fluorescedores, condicionadores de tecido, tensoativos hidrolisáveis, conservantes, antioxidantes, agentes antiencolhimento, agentes antiamarrotamento, germicidas, fungicidas, pontos de cor, agentes para tratamento de prata, agentes antiembaciamento e/ou anticorrosão, fontes de alcalinidade, agentes solubilizantes, veículos, elementos auxiliares ao processamento, pigmentos, e agentes de controle de pH (*vide, por exemplo*, patentes US n°s 6.610.642, 6.605.458, 5.705.464, 5.710.115, 5.698.504, 5.695.679, 5.686.014 e 5.646.101, todas as quais estão aqui incorporadas a título de referência). As modalidades de materiais específicos para composições de limpeza são exemplificadas com detalhes, abaixo. Em modalidades nas quais os materiais auxiliares de limpeza não são compatíveis com as proteases variantes da presente invenção nas composições de limpeza, então, métodos adequados de manter os materiais auxiliares de limpeza e a(s) protease(s) separado(s) (*isto é*, fora de contato uns com os outros) até a combinação dos dois componentes são adequadamente usados. Tais métodos de separação incluem qualquer método adequado conhecido na técnica (*por exemplo*, cápsulas de gel, encapsulação, tabletes, separação física, etc.).

[000521] As composições de limpeza da presente invenção são empregadas vantajosamente, por exemplo, em aplicações para lavanderia, limpeza de superfícies duras, aplicações para lavagem de louças assim como aplicações cosméticas, como, por exemplo, para dentaduras, dentes, cabelo e pele. Além disso, devido às vantagens únicas de eficácia aumentada em soluções a temperaturas mais baixas, as enzimas da presente invenção são idealmente usadas para aplicações de lavanderia. Além disso, as enzimas da presente invenção podem ser usadas em composições granulares e líquidas.

[000522] As proteases variantes da presente invenção também podem ser usadas em produtos aditivos de limpeza. Em algumas modalidades, podem ser usadas aplicações para limpeza com solução em baixa temperatura. Em algumas modalidades, a presente invenção apresenta produtos aditivos de limpeza que incluem pelo menos uma enzima da presente invenção e que são idealmente adequados para inclusão em um processo de lavagem quando se deseja eficácia de branqueamento adicional. Essas instâncias incluem, mas não se limitam a, aplicações para limpeza em solução com baixa temperatura. Em algumas modalidades, o produto aditivo está em sua forma mais simples, uma ou mais proteases. Em algumas modalidades, o aditivo é embalado sob a forma de dosagem para adição a um processo de limpeza. Em algumas modalidades, o aditivo é embalado sob a forma de dosagem para adição a um processo de limpeza no qual é usada uma fonte de peróxigênio e no qual se deseja eficácia de alvejamento aumentada. Qualquer forma unitária de dosagem única adequada pode ser usada com a presente invenção, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a pílulas, tabletes, cápsulas de gel, ou outras unidades de dosagem única, como, por exemplo, pós ou líquidos pré-medidos. Em algumas modalidades, são incluídos um ou mais cargas ou materiais carreadores para aumentar o volume dessas composições. Os materiais adequados como carga ou carreador incluem, mas não se limitam a, vários sais de sulfato, carbonato e silicato bem como talco, argila e similares. Os materiais adequados como carga ou carreador para composições líquidas incluem, mas não se limitam a, água ou alcoóis primários e secundários com baixo peso molecular inclusive polióis e dióis. Exemplos desses alcoóis incluem, mas não se limitam a, metanol, etanol, propanol e isopropanol. Em algumas modalidades, as composições contêm de cerca de 5% a cerca de 90% desses materiais. As cargas ácidas podem ser usadas para reduzir o pH. Alternati-

vamente, em algumas modalidades o aditivo de limpeza inclui ingredientes auxiliares, conforme descrito com mais detalhes abaixo.

[000523] As presentes composições de limpeza e aditivos de limpeza exigem uma quantidade eficaz de pelo menos uma das variantes de protease aqui fornecidas, sozinha ou em combinação com outras proteases e/ou enzimas adicionais. O nível necessário de enzima é obtido pela adição de uma ou mais variantes de protease da presente invenção. Tipicamente, as presentes composições de limpeza compreendem pelo menos cerca de 0,0001 por cento, em peso, de cerca de 0,0001 a cerca de 10, de cerca de 0,001 a cerca de 1, ou mesmo de cerca de 0,01 a cerca de 0,1 por cento, em peso, de pelo menos uma das proteases variantes da presente invenção.

[000524] As composições de limpeza da presente invenção são tipicamente formuladas de modo que, durante o uso em operações de limpeza aquosa, a água de lavagem tenha um pH de cerca de 5,0 a cerca de 11,5 ou mesmo de cerca de 7,5 a cerca de 10,5. As formulações de produto líquido são tipicamente formuladas para ter um pH puro de cerca de 3,0 a cerca de 9,0, ou mesmo de cerca de 3 a cerca de 5. Os produtos de lavanderia granulares são tipicamente formulados para ter um pH de cerca de 9 a cerca de 11. As técnicas para controlar o pH nos níveis de uso recomendados incluem o usar de tampões, álcalis, ácidos, etc., e são bem conhecidos dos versados na técnica.

[000525] As "composições de limpeza com baixo pH" adequadas possuem tipicamente um pH puro de cerca de 3 a cerca de 5, e são tipicamente isentas de tensoativos que sofrem hidrólise em tal pH do ambiente. Tais tensoativos incluem tensoativos de alquil sulfato de sódio que compreendem pelo menos uma porção de óxido de etileno ou mesmo de cerca de 1 a cerca de 16 mols de óxido de etileno. Essas composições de limpeza tipicamente compreendem uma quantidade

suficiente de um modificador de pH, como hidróxido de sódio, monoe-tanol amina ou ácido clorídrico, para conferir a essa composição de limpeza um pH puro de cerca de 3 a cerca de 5. Tais composições compreendem, tipicamente, pelo menos uma enzima estável em relação a ácidos. Em algumas modalidades, as composições são líquidas, enquanto em outras modalidades as mesmas são sólidas. O pH destas composições líquidas é, tipicamente, medido como pH puro. O pH destas composições sólidas é medido como uma solução de sólidos a 10% da dita composição sendo que o solvente é água destilada. Nessas modalidades, todas as medições de pH são tomadas a 20°C, exceto onde indicado em contrário.

[000526] Em algumas modalidades, quando a(s) protease(s) variante(s) da invenção é/são empregada(s) em uma composição granular ou líquida, é desejável que a protease variante esteja sob a forma de uma partícula encapsulada para proteger a protease variante de outros componentes da composição granular durante o armazenamento. Além disso, a encapsulação também é uma forma de controlar a disponibilidade da protease variante durante o processo de limpeza. Em algumas modalidades, a encapsulação intensifica o desempenho da(s) protease(s) variante(s) e/ou enzimas adicionais. Nesse sentido, as proteases variantes da presente invenção são encapsuladas com qualquer material de encapsulação adequado conhecido na técnica. Em algumas modalidades, o material de encapsulação encapsula, tipicamente, pelo menos parte do catalisador para a(s) protease(s) variante(s) da presente invenção. Tipicamente, o material de encapsulação é solúvel em água e/ou dispersível em água. Em algumas modalidades, o material de encapsulação tem uma temperatura de transição vítrea (tg) de 0°C ou mais. A temperatura de transição vítrea é descrita em mais detalhes no documento WO 97/11151. O material de encapsulação é tipicamente selecionado a partir de carboidratos, gomas naturais

ou sintéticas, quitina, quitosano, celulose e derivados de celulose, silicatos, fosfatos, boratos, álcool polivinílico, polietileno glicol, ceras de parafina, e combinações dos mesmos. Quando o material de encapsulação é um carboidrato, ele é selecionado, tipicamente, a partir de monossacarídeos, oligossacarídeos, polissacarídeos, e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades típicas, o material de encapsulação é um amido (*consulte por exemplo*, EP 0 922 499, US 4.977.252, US 5.354.559, e US 5.935.826). Em algumas modalidades, o material de encapsulação é uma microesfera produzida a partir de plástico, como termoplástico, acrilonitrilo, metacrilonitrilo, poliacrilonitrilo, poli-metacrilonitrilo e misturas dos mesmos, sendo que as microesferas disponíveis comercialmente que podem ser usadas incluem, mas não se limitam a, aquelas disponíveis junto à EXPANCEL® (Stockviksverken, Suécia), e PM 6545, PM 6550, PM 7220, PM 7228, EXTENDOSPHERES®, LUXSIL®, Q-CEL®, e SPHERICEL® (PQ Corp., Valley Forge, PA, EUA).

[000527] Conforme descrito na presente invenção, as proteases variantes da presente invenção encontram uso particular na indústria de limpeza, incluindo, mas não se limitando a detergentes de lavanderia e louças. Estas aplicações colocam as enzimas sob vários estresses ambientais. As proteases variantes da presente invenção fornecem vantagens sobre muitas enzimas atualmente usadas, devido à sua estabilidade sob várias condições.

[000528] De fato, há uma variedade de condições de lavagem, por exemplo, formulações detergentes, volumes de água de lavagem, temperaturas da água de lavagem, e duração do tempo de lavagem diferentes, às quais as proteases envolvidas na lavagem são expostas. Além disso, as formulações detergentes usadas em diferentes áreas geográficas possuem diferentes concentrações de seus componentes relevantes presentes na água de lavagem. Por exemplo, os detergen-

tes europeus possuem tipicamente cerca de 4500 a 5000 ppm de componentes detergentes na água de lavagem, enquanto que detergentes japoneses possuem tipicamente aproximadamente 667 ppm de componentes detergentes na água de lavagem. Na América do Norte, particularmente nos Estados Unidos, os detergentes possuem tipicamente cerca de 975 ppm de componentes detergentes presentes na água de lavagem.

[000529] Um sistema com baixa concentração de detergente inclui detergentes nos quais menos que cerca de 800 ppm dos componentes detergentes estão presentes na água de lavagem. Os detergentes japoneses são tipicamente considerados como um sistema com baixa concentração de detergente uma vez que eles possuem aproximadamente 667 ppm de componentes detergentes presentes na água de lavagem.

[000530] Uma concentração de detergente média inclui detergentes nos quais entre cerca de 800 ppm e cerca 2000 ppm dos componentes detergentes estão presentes na água de lavagem. Os detergentes norte-americanos são geralmente considerados como sistemas de média concentração de detergente uma vez que eles possuem aproximadamente 975 ppm de componentes detergentes presentes na água de lavagem. O Brasil tem, tipicamente, aproximadamente, 1500 ppm de componentes detergentes presentes na água de lavagem.

[000531] Um sistema de alta concentração de detergente inclui detergentes nos quais mais de cerca 2000 ppm dos componentes detergentes estão presentes na água de lavagem. Os detergentes europeus são geralmente considerados como sistemas de alta concentração de detergente uma vez que eles possuem aproximadamente 4500 a 5000 ppm de componentes detergentes na água de lavagem.

[000532] Os detergentes latino americanos são geralmente detergentes com builder à base de fosfato que produzem muita espuma e a fai-

xa de detergentes usada na América Latina pode estar tanto nas concentrações médias de detergente quanto altas, uma vez que eles variam de 1500 ppm a 6000 ppm de componentes detergentes na água de lavagem. Conforme mencionado acima, o Brasil tem, tipicamente, aproximadamente, 1500 ppm de componentes detergentes presentes na água de lavagem. Entretanto, outras regiões com detergentes com builder à base de fosfato que produzem muita espuma, não se limitando a outros países latino americanos, podem ter sistemas com alta concentração de detergente de até cerca de 6000 ppm de componentes detergentes presentes na água de lavagem.

[000533] Em vista do exposto, é evidente que as concentrações de composições detergentes nas soluções de lavagem típicas ao redor do mundo variam de menos que cerca de 800 ppm de composição detergente ("regiões com baixa concentração de detergente"), por exemplo, cerca de 667 ppm no Japão, a entre cerca de 800 ppm a cerca de 2000 ppm ("regiões com concentração de detergente média"), por exemplo, cerca de 975 ppm nos EUA e cerca de 1500 ppm no Brasil, até mais que cerca de 2000 ppm ("regiões com alta concentração de detergente"), por exemplo, cerca de 4500 ppm a cerca de 5000 ppm na Europa e cerca de 6000 ppm em regiões com builder à base de fosfato que produzem muita espuma.

[000534] As concentrações das soluções de lavagem típicas são determinadas empiricamente. Por exemplo, nos EUA, uma máquina de lavar típica retém um volume de cerca de 64,4 L de solução de lavagem. Consequentemente, de modo a obter uma concentração de cerca de 975 ppm de detergente na solução de lavagem, cerca de 62,79 g de composição detergente precisam ser adicionados a 64,4 L da solução de lavagem. Esta quantidade é a quantidade típica medida na água de lavagem pelo consumidor que usa o copo de medida fornecido com o detergente.

[000535] Como um exemplo adicional, diferentes regiões usam diferentes temperaturas de lavagem. A temperatura da água de lavagem no Japão é tipicamente menor que a usada na Europa. Por exemplo, a temperatura da água de lavagem na América do Norte e no Japão está tipicamente entre cerca de 10 e cerca de 30°C (*por exemplo*, cerca de 20°C), enquanto que a temperatura da água de lavagem na Europa está tipicamente entre cerca de 30 e cerca de 60°C (*por exemplo*, cerca de 40°C). Entretanto, de modo a economizar energia, muitos consumidores estão trocando e usando água fria na lavagem. Além disso, em algumas outras regiões, a água fria é tipicamente usada para lavanderia, bem como para aplicações de lavagem de pratos. Em algumas modalidades, a "lavagem em água fria" da presente invenção usa "detergente para água fria" adequado para lavagem a temperaturas de cerca de 10°C a cerca de 40°C, ou de cerca de 20°C a cerca de 30°C, ou de cerca de 15°C a cerca de 25°C, assim como todas as outras combinações dentro da faixa de cerca de 15°C a cerca de 35°C, e todas as faixas dentro de 10°C a 40°C.

[000536] Como um exemplo adicional, diferentes regiões possuem tipicamente dureza da água diferente. A dureza da água é geralmente expressa em grãos por galão de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ misturados. A dureza é uma medida da quantidade de cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}) na água. A maior parte da água nos Estados Unidos é dura, mas o grau de dureza varia. Água moderadamente dura (60 a 120 ppm) a dura (121 a 181 ppm) tem 60 a 181 partes por milhão (partes por milhão convertido para grãos por galão americano é n° de ppm dividido por 17,1 que é igual a grãos por galão) de minerais de dureza.

Água	Grãos por galão	Partes por milhão
Mole	menos de 1,0	menos de 17
Levemente dura	1,0 a 3,5	17 a 60
Moderadamente dura	3,5 a 7,0	60 a 120

Dura	7,0 a 10,5	120 a 180
Muito dura	mais de 10,5	mais de 180

[000537] A dureza da água europeia é tipicamente maior que cerca de 179,6 (por exemplo, cerca de 179,6 a cerca de 342,0) ppm (10,5 (*por exemplo*, cerca de 10,5 a cerca de 20,0) grãos por galão) de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mistos (por exemplo, cerca de 256,5 ppm (15 grãos por galão) de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mistos). A dureza da água norte-americana é tipicamente maior que a dureza da água japonesa, mas menor que a dureza da água europeia. Por exemplo, a dureza da água norte-americana pode estar entre cerca de 51,3 a cerca de 171,0 ppm (3 a cerca de 10 grãos), cerca de 51,3 a cerca de 136,8 ppm (3 a cerca de 8 grãos) ou cerca de 102,6 ppm (6 grãos). A dureza da água japonesa é tipicamente menor que a dureza da água norte-americana, geralmente menor que cerca de 68,4, por exemplo cerca de 51,3 (cerca de 4, por exemplo cerca de 3 grãos por galão) de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mistos.

[000538] Consequentemente, em algumas modalidades, a presente invenção fornece proteases variantes que mostram surpreendente desempenho de lavagem em pelo menos um conjunto de condições de lavagem (*por exemplo*, temperatura da água, dureza da água, e/ou concentração de detergente). Em algumas modalidades, as proteases variantes da presente invenção são comparáveis em desempenho de lavagem a outras proteases subtilisina. Em algumas modalidades, as proteases variantes da presente invenção possuem desempenho de lavagem intensificado em comparação às proteases subtilisina atualmente disponíveis para comercialização. Desta forma, em algumas modalidades da presente invenção, as proteases variantes aqui fornecidas exibem estabilidade oxidativa intensificada, estabilidade térmica otimizada, capacidades de limpeza intensificadas sob várias condições, e/ou estabilidade quelante intensificada. Além disso, as proteases variantes da presente invenção podem ser usadas em composi-

ções de limpeza que não incluem detergentes, novamente sozinhas ou em combinação com builders e estabilizantes.

[000539] Em algumas modalidades da presente invenção, as composições de limpeza compreendem pelo menos uma protease variante da presente invenção em uma quantidade de cerca de 0,00001% a cerca de 10%, em peso, da composição com o restante (*por exemplo*, cerca de 99,999% a cerca de 90,0%) compreendendo materiais auxiliares de limpeza com base no peso da composição. Em algumas outras modalidades da presente invenção, as composições de limpeza da presente invenção compreendem pelo menos uma protease variante em uma quantidade de cerca de 0,0001 % a cerca de 10%, cerca de 0,001% a cerca de 5%, cerca de 0,001% a cerca de 2%, cerca de 0,005% a cerca de 0,5% em peso da composição com o restante da composição de limpeza (*por exemplo*, cerca de 99,9999% a cerca de 90,0%, cerca de 99,999 % a cerca de 98%, cerca de 99,995% a cerca de 99,5%, em peso) compreendendo materiais auxiliares de limpeza.

[000540] Em algumas modalidades, as composições de limpeza da presente invenção compreendem uma ou mais enzimas detergentes adicionais, que fornecem benefícios de desempenho da limpeza e/ou tratamento de tecidos e/ou lavagem de louças. Exemplos de enzimas adequadas incluem, mas não se limitam a, hemicelulases, Celulases, peroxidases, proteases, xilanases, lipases, fosfolipases, esterases, cutinases, pectinases, pectato liases, mananases, queratinases, redutases, oxidases, fenoloxidases, lipoxigenases, ligninases, pululanases, tanases, pentosanases, malanases, β -glucanases, arabinosidases, hialuronidases, condroitinases, lacases, e amilases, ou quaisquer combinações ou misturas dos mesmos. Em algumas modalidades, é usada uma combinação de enzimas (*isto é*, um "coquetel") compreendendo enzimas aplicáveis convencionais como protease, lipase, cutinase e/ou celulase, em conjunto com amilase.

[000541] Além das variantes de protease aqui fornecidas, qualquer outra protease adequada pode ser usada nas composições da presente invenção. As proteases adequadas incluem aquelas de origem animal, vegetal ou microbiana. Em algumas modalidades, proteases microbianas são usadas. Em algumas modalidades, estão incluídos mutantes quimicamente ou geneticamente modificados. Em algumas modalidades, a protease é uma serina protease, de preferência uma protease microbiana alcalina ou uma protease semelhante à tripsina. Exemplos de proteases alcalinas incluem subtilisinas, especialmente as derivadas de *Bacillus* (por exemplo, subtilisina, *lentus*, *amyloliquefaciens*, subtilisina Carlsberg, subtilisina 309, subtilisina 147, e subtilisina 168). Exemplos adicionais incluem as proteases mutantes descritas nas patentes US nº RE 34.606, 5.955.340, 5.700.676, 6.312.936, e 6.482.628, que estão aqui incorporadas a título de referência. Exemplos de proteases adicionais incluem, mas não se limitam a, tripsina (por exemplo, de origem suína ou bovina), e a protease de *Fusarium* descrita em WO 89/06270. Em algumas modalidades, enzimas proteases disponíveis para comercialização que podem ser usadas na presente invenção incluem, mas não se limitam a, MAXATASE®, MAXACAL™, MAXAPEM™, OPTICLEAN®, OPTIMASE®, PROPERASE®, PURAFECT®, PURAFECT® OXP, PURAMAX™, EXCELLASE™, e PURAFAST™ (Genencor); ALCALASE®, SAVINASE®, PRIMASE®, DURAZYM™, POLARZYME®, OVOZYME®, KANNASE®, LIQUANASE®, NEUTRASE®, RELASE® e ESPERASE® (Novozymes); BLAP™ e variantes de BLAP™ (Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien, Duesseldorf, Alemanha), e KAP (subtilisina de *B. alkalophilus*; Kao Corp., Tóquio, Japão). Várias proteases são descritas em WO95/23221, WO 92/21760, publicação de patente US 2008/0090747, e patentes US nºs 5.801.039, 5.340.735, 5.500.364, 5.855.625, US RE 34.606, 5.955.340, 5.700.676, 6.312.936, e 6.482.628, e várias outras paten-

tes. Em algumas modalidades adicionais, as metaloproteases podem ser usadas na presente invenção, incluindo, mas não se limitando à metaloprotease neutra descrita no documento WO 07/044993.

[000542] Além disso, qualquer lipase adequada pode ser usada na presente invenção. As lipases adequadas incluem, mas não se limitam a, aquelas de origem bacteriana ou fúngica. Os mutantes quimicamente ou geneticamente modificados estão abrangidos pela presente invenção. Exemplos de lipases úteis incluem lipase de *Humicola lanuginosa* (vide, por exemplo, EP 258 068, e EP 305 216), lipase de *Rhizomucor miehei* (vide, por exemplo, EP 238 023), lipase de *Candida*, como lipase de *C. antarctica* (por exemplo, a lipase A ou B de *C. antarctica*; vide, por exemplo, EP 214 761), lipases de *Pseudomonas* como lipase de *P. alcaligenes* e lipase de *P. pseudoalcaligenes* (vide, por exemplo, EP 218 272), lipase de *P. cepacia* (vide, por exemplo, EP 331 376), lipase de *P. stutzeri* (vide, por exemplo, GB 1,372,034), lipase de *P. fluorescens*, lipase de *Bacillus* (por exemplo, lipase de *B. subtilis* [Dartois et al., Biochem. Biophys. Acta 1131:253-260 [1993]]); lipase de *B. stearothermophilus* [vide, por exemplo, JP 64/744992]; e lipase de *B. pumilus* [vide, por exemplo, WO 91/16422]).

[000543] Além disso, inúmeras lipases clonadas podem ser usadas em algumas modalidades da presente invenção, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, à lipase de *Penicillium camembertii* (consulte, Yamaguchi et al., Gene 103:61-67 [1991]), lipase de *Geotricum candidum* (consulte, Shimada et al., J. Biochem., 106:383-388 [1989]), e várias lipases de *Rhizopus* como lipase de *R. delemar* (consulte, Hass et al., Gene 109:117-113 [1991]), uma lipase de *R. niveus* (Kugimiya et al., Biosci. Biotech., Biochem. 56:716-719 [1992]) e lipase de *R. oryzae*.

[000544] Outros tipos de enzimas lipolíticas, como cutinases, também podem ser usadas em algumas modalidades da presente inven-

ção, e incluem, mas não se limitam à cutinase derivada de *Pseudomonas mendocina* (vide WO 88/09367), e a cutinase derivada de *Fusarium solani pisi* (vide WO 90/09446).

[000545] As lipases adequadas adicionais incluem lipases comercialmente disponíveis como M1 LIPASE™, LUMA FAST™, e LI-POMAX™ (Genencor); LIPEX®, LIPOLASE® e LIPOLASE® ULTRA (Novozymes); e LIPASE P™ "Amano" (Amano Pharmaceutical Co. Ltd., Japão).

[000546] Em algumas modalidades da presente invenção, as composições de limpeza da presente invenção compreendem, adicionalmente, lipases em uma quantidade de cerca de 0,00001% a cerca de 10% de lipase adicional em peso da composição com o restante de materiais auxiliares de limpeza, com base no peso da composição. Em algumas outras modalidades da presente invenção, as composições de limpeza da presente invenção também compreendem lipases em uma quantidade de cerca de 0,0001 % a cerca de 10%, cerca de 0,001% a cerca de 5%, cerca de 0,001% a cerca de 2%, cerca de 0,005% a cerca de 0,5% de lipase, em peso da composição.

[000547] Em algumas modalidades da presente invenção, qualquer amilases adequada pode ser usada na presente invenção. Em algumas modalidades, quaisquer amilases (*por exemplo*, alfa e/ou beta) adequadas para uso em soluções alcalinas também são usadas. As amilases adequadas incluem, mas não se limitam a, aquelas de origem bacteriana ou fúngica. Os mutantes química ou geneticamente modificados estão incluídos em algumas modalidades. As amilases que podem ser usadas na presente invenção, incluem, mas não se limitam às α -amilases obtidas a partir de *B. licheniformis* (vide, *por exemplo*, GB 1.296.839). As amilases disponíveis para comercialização que podem ser usadas na presente invenção incluem, mas não se limitam, por exemplo, a DURAMYL®, TERMAMYL®, FUNGAMYL®, STAIN-

ZYME®, STAINZYME PLUS®, STAINZYME ULTRA®, e BAN™ (Novozymes), assim como POWERASE™, RAPIDASE® e MAXAMYL® P (Genencor).

[000548] Em algumas modalidades da presente invenção, as composições de limpeza da presente invenção compreendem, adicionalmente, amilases em uma quantidade de cerca de 0,00001% a cerca de 10% de amilase adicional em peso da composição com o restante de materiais auxiliares de limpeza, com base no peso da composição. Em algumas outras modalidades da presente invenção, as composições de limpeza da presente invenção também compreendem amilases em uma quantidade de cerca de 0,0001 % a cerca de 10%, cerca de 0,001% a cerca de 5%, cerca de 0,001% a cerca de 2%, cerca de 0,005% a cerca de 0,5% de amilase, em peso da composição.

[000549] Em algumas modalidades adicionais, qualquer celulase adequada pode ser usada nas composições de limpeza da presente invenção. As celulasas adequadas incluem, mas não se limitam a, aquelas de origem bacteriana ou fúngica. Os mutantes química ou geneticamente modificados estão incluídos em algumas modalidades. As celulasas adequadas incluem, mas não se limitam a celulasas de *Humicola insolens* (consulte, por exemplo, a patente US nº 4.435.307). As celulasas especialmente adequadas são aquelas que têm benefícios de cuidado das cores (consulte, por exemplo, EP 0 495 257). As celulasas disponíveis comercialmente que são usadas na presente invenção incluem, mas não se limitam a, CELLUZYME®, CAREZYME® (Novozymes) e KAC-500(B)™ (Kao Corporation). Em algumas modalidades, as celulasas estão incorporadas como porções ou fragmentos de celulasas maduras de ocorrência natural ou variantes, sendo que uma porção do amino-terminal é deletada (consulte, por exemplo, a patente US nº 5.874.276). Em algumas modalidades, as composições de limpeza da presente invenção compreendem, adicionalmente, celu-

lases em uma quantidade de cerca de 0,00001% a cerca de 10% de celulase adicional em peso da composição, com o restante de materiais auxiliares de limpeza, com base no peso da composição. Em algumas outras modalidades da presente invenção, as composições de limpeza da presente invenção também compreendem celulasas em uma quantidade de cerca de 0,0001 % a cerca de 10%, cerca de 0,001% a cerca de 5%, cerca de 0,001% a cerca de 2%, cerca de 0,005% a cerca de 0,5% de celulase, em peso da composição.

[000550] Qualquer mananase adequada para uso nas composições detergentes também pode ser usada na presente invenção. As mananases adequadas incluem, mas não se limitam a, aquelas de origem bacteriana ou fúngica. Os mutantes química ou geneticamente modificados estão incluídos em algumas modalidades. Várias mananases que podem ser usadas na presente invenção são conhecidas (*vide, por exemplo*, a patente US nº 6.566.114, patente US nº 6.602.842, e a patente US nº 6.440.991, que estão aqui incorporadas a título de referência). Em algumas modalidades, as composições de limpeza da presente invenção compreendem, adicionalmente, mananases em uma quantidade de cerca de 0,00001% a cerca de 10% de mananase adicional em peso da composição, com o restante de materiais auxiliares de limpeza, com base no peso da composição. Em algumas modalidades da presente invenção, as composições de limpeza da presente invenção também compreendem mananases em uma quantidade de cerca de 0,0001% a cerca de 10%, cerca de 0,001% a cerca de 5%, cerca de 0,001% a cerca de 2%, cerca de 0,005% a cerca de 0,5% de mananase, em peso da composição.

[000551] Em algumas modalidades, peroxidases são usadas em combinação com peróxido de hidrogênio ou uma fonte do mesmo (*por exemplo*, um percarbonato, perborato ou persulfato) nas composições da presente invenção. Em algumas modalidades alternativas, as oxi-

dases são usadas em combinação com oxigênio. Ambos os tipos de enzimas são usados para "alveijamento da solução" (*isto é*, para impedir a transferência de um corante têxtil de um tecido tingido para outro, quando os tecidos são lavados juntos em um líquido de lavagem), de preferência juntamente com um agente acentuador (*consulte por exemplo*, WO 94/12621 e WO 95/01426). As peroxidases/oxidases adequadas incluem, mas não se limitam a, aquelas de origem vegetal, bacteriana ou fúngica. Os mutantes química ou geneticamente modificados estão incluídos em algumas modalidades. Em algumas modalidades, as composições de limpeza da presente invenção compreendem adicionalmente enzimas peroxidase e/ou oxidase em uma quantidade de cerca de 0,00001% a cerca de 10% de peroxidase e/ou oxidase adicional, em peso da composição, com o restante de materiais auxiliares de limpeza, com base no peso da composição. Em algumas outras modalidades da presente invenção, as composições de limpeza da presente invenção também compreendem, enzimas peroxidase e/ou oxidase em uma quantidade de cerca de 0,0001% a cerca de 10%, cerca de 0,001% a cerca de 5%, cerca de 0,001% a cerca de 2%, cerca de 0,005% a cerca de 0,5% de enzimas peroxidase e/ou oxidase, em peso da composição.

[000552] Em algumas modalidades, podem ser usadas enzimas adicionais incluindo, mas não se limitando a peridrolases (*consulte por exemplo*, WO 05/056782). Além disso, em algumas modalidades, misturas das enzimas mencionadas acima estão compreendidas na presente invenção, em particular, uma ou mais protease, amilase, lipase, mananase, e/ou pelo menos uma celulase adicional. De fato, contempla-se que várias misturas destas enzimas poderão ser usadas na presente invenção. Também é contemplado que as diferentes quantidades da(s) protease(s) variante(s) e uma ou mais enzimas adicionais podem, ambas, variar independentemente na faixa de cerca de 10%, o

restante da composição de limpeza sendo composto de materiais auxiliares de limpeza. A seleção específica de materiais auxiliares de limpeza é feita prontamente ao se considerar a superfície, o item ou o tecido a ser limpo, bem como a forma desejada da composição para as condições de limpeza durante o uso (*por exemplo*, por meio do uso do detergente na lavagem).

[000553] Os exemplos de materiais auxiliares de limpeza adequados incluem, mas não se limitam a, tensoativos, builders, alvejantes, ativadores de alvejamento, catalisadores de alvejante, outras enzimas, sistemas estabilizantes de enzimas, quelantes, alvejantes ópticos, polímeros para liberação de sujeiras, agentes de transferência de corantes, agentes inibidores de transferência de corantes, materiais catalíticos, peróxido de hidrogênio, fontes de peróxido de hidrogênio, perácidos pré-formados, agentes poliméricos dispersantes, agentes remove-dores de sujeira à base de argila, agentes elastificantes de estrutura, dispersantes, supressores de espuma, corantes, perfumes, corantes, sais de carga, hidrótropos, fotoativadores, fluorescedores, condiciona-dores de tecido, amaciantes de tecidos, carreadores, hidrótropos, ele-mentos auxiliares ao processamento, solventes, pigmentos, tensoati-vos hidrolisáveis, conservantes, antioxidantes, agentes antiencolhi-mento, agentes antiamarrotamento, germicidas, fungicidas, salpicos de cor, agentes para cuidado de pratarias, antiembaciamento e/ou anti-corrosão, fontes de alcalinidade, agentes solubilizantes, carreadores, elementos auxiliares ao processamento, pigmentos e agentes de con-trole de pH (*consulte por exemplo*, patentes US n°s 6.610.642, 6.605.458, 5.705.464, 5.710.115, 5.698.504, 5.695.679, 5.686.014 e 5.646.101, todas as quais estão aqui incorporadas a título de referên-cia). As modalidades de materiais específicos para composições de limpeza são exemplificadas com detalhes, abaixo. Em modalidades nas quais os materiais auxiliares de limpeza não são compatíveis com

as proteases variantes da presente invenção nas composições de limpeza, então, métodos adequados de manter os materiais auxiliares de limpeza e a(s) protease(s) separado(s) (*isto é*, fora de contato uns com os outros) até a combinação dos dois componentes são adequadamente usados. Tais métodos de separação incluem qualquer método adequado conhecido na técnica (*por exemplo*, cápsulas de gel, encapsulação, tabletes, separação física, etc.).

[000554] Em algumas modalidades, uma quantidade eficaz de uma ou mais protease(s) variante(s) aqui fornecida(s) está incluída nas composições úteis para limpar uma variedade de superfícies que precisam de remoção de mancha proteínica. Essas composições de limpeza incluem composições de limpeza para aplicações como limpeza de superfícies duras, tecidos e pratos. De fato, em algumas modalidades, a presente invenção apresenta composições para limpeza de tecido, enquanto que em outras modalidades, a invenção apresenta composições para limpeza de produtos que não são tecidos. Especialmente, a presente invenção também fornece composições de limpeza adequadas para cuidados pessoais, incluindo composições de limpeza para cuidados com a cavidade oral (incluindo dentifrícios, pastas dentais, enxaguatórios bucais, etc., assim como composições para limpeza de dentaduras), pele e cabelo. A presente invenção é destinada a abranger composições detergentes sob qualquer forma (*isto é*, líquida, granular, barra, semissólida, géis, emulsões, tabletes, cápsulas, etc.).

[000555] A título de exemplo, várias composições de limpeza nas quais as proteases variantes da presente invenção podem ser usadas são descritas com mais detalhes abaixo. Em algumas modalidades nas quais as composições de limpeza da invenção são formuladas como composições adequadas para uso em método(s) de lavagem em máquina de lavar roupas, as composições da presente invenção con-

têm, de preferência, pelo menos um tensoativo e pelo menos um composto de builder, assim como um ou mais materiais auxiliares de limpeza selecionados, de preferência, a partir de compostos poliméricos orgânicos, agentes alvejantes, enzimas adicionais, supressores de espuma, dispersantes, dispersantes de sabão de cálcio, agentes de suspensão de sujeira e antirredeposição, e inibidores de corrosão. Em algumas modalidades, as composições de lavanderia também contêm agentes amaciantes (*isto é*, como materiais auxiliares de limpeza adicionais). As composições da presente invenção também podem ser usadas como produtos aditivos detergentes sob a forma sólida ou líquida. Tais produtos aditivos são destinados a suplementar e/ou reforçar o desempenho de composições detergentes convencionais e podem ser adicionados em qualquer estágio do processo de limpeza. Em algumas modalidades, a densidade das composições detergentes para lavagem de roupas da presente invenção fica na faixa de cerca de 400 a cerca de 1.200 g/litro, enquanto em outras modalidades, fica na faixa de cerca de 500 a cerca de 950 g/litro de composição, medida a 20°C.

[000556] Em modalidades formuladas como composições para uso em métodos de lavagem manual de pratos, as composições da invenção contêm, de preferência, pelo menos um tensoativo e, de preferência, pelo menos um material auxiliar de limpeza adicional selecionado a partir de compostos poliméricos orgânicos, agentes acentuadores de espuma, íons metálicos do grupo II, solventes, hidrótropos e enzimas adicionais.

[000557] Em algumas modalidades, várias composições de limpeza, como aquelas fornecidas na patente US nº 6.605.458, podem ser usadas com as proteases variantes da presente invenção. Desta forma, em algumas modalidades, as composições que compreendem pelo menos uma protease variante da presente invenção é uma composição para limpeza de tecido granular compacta, enquanto em outras

modalidades, a composição é uma composição para limpeza de tecidos granular útil na lavagem de tecidos coloridos, em modalidades adicionais, a composição é uma composição para limpeza de tecidos granular que fornece amaciamento através da capacidade de lavagem, em modalidades adicionais, a composição é uma composição para limpeza de tecidos líquida para tarefas pesadas. Em algumas modalidades, as composições que compreendem pelo menos uma protease variante da presente invenção são composições para limpeza de tecido como aquelas descritas nas patentes US n°s 6.610.642 e 6.376.450. Além disso, as proteases variantes da presente invenção podem ser usadas em composições detergentes granulares para lavagem de roupas de utilidade particular sob as condições de lavagem europeias ou japonesas (*vide, por exemplo*, patente US n° 6.610.642).

[000558] Em algumas modalidades alternativas, a presente invenção apresenta composições para limpeza de superfícies duras que compreendem pelo menos uma protease variante aqui fornecida. Desta forma, em algumas modalidades, as composições que compreendem pelo menos uma protease variante da presente invenção são composições para limpeza de superfícies duras como aquelas descritas nas patentes US n°s 6.610.642, 6.376.450, e 6.376.450.

[000559] Em modalidades ainda adicionais, a presente invenção apresenta composições para lavagem de pratos que compreendem pelo menos uma protease variante aqui fornecida. Desta forma, em algumas modalidades, as composições que compreendem pelo menos uma protease variante da presente invenção são composições para limpeza de superfícies duras como aquelas descritas nas patentes US n°s 6.610.642 e 6.376.450. Em algumas modalidades ainda adicionais, a presente invenção apresenta composições para lavagem de pratos que compreendem pelo menos uma protease variante aqui fornecida. Em algumas modalidades adicionais, as composições que compreen-

dem pelo menos uma protease variante da presente invenção compreendem composições para tratamento bucal como aquelas descritas nas patentes US n°s 6.376.450, e 6.376.450. As formulações e descrições dos compostos e materiais auxiliares de limpeza contidos nas patentes US n°s 6.376.450, 6.605.458, 6.605.458, e 6.610.642 supra-citadas, podem ser usadas com as proteases variantes aqui fornecidas.

[000560] As composições de limpeza da presente invenção são formuladas em qualquer forma adequada e são preparadas por qualquer processo escolhido pelo formulador, exemplos não limitadores destes são descritos nas patentes US n°s 5.879.584, 5.691.297, 5.574.005, 5.569.645, 5.565.422, 5.516.448, 5.489.392, e 5.486.303, que estão aqui incorporadas a título de referência. Quando se deseja uma composição de limpeza com baixo pH, o pH dessa composição é ajustado mediante a adição de um material como monoetanol amina ou um material ácido, como HCl.

[000561] Embora não seja essencial para os propósitos da presente invenção, a listagem não limitadora de compostos auxiliares ilustrada posteriormente é adequada ao uso nas presentes composições de limpeza. Em algumas modalidades, esses compostos auxiliares são incorporados, por exemplo, para auxiliar ou acentuar o desempenho de limpeza, para tratamento do substrato a ser limpo, ou para modificar a estética da composição de limpeza, tal como é o caso com perfumes, colorantes, corantes ou similares. Entende-se que tais compostos auxiliares estão em adição às proteases variantes da presente invenção. A natureza exata destes componentes adicionais, e níveis de incorporação dos mesmos, dependerão da forma física da composição e da natureza da operação de limpeza a qual os mesmos serão usados. Os materiais auxiliares adequados incluem, mas não se limitam a, tensoativos, builders, agentes quelantes, agentes inibidores de

transferência de corantes, auxiliares de deposição, dispersantes, enzimas adicionais e estabilizantes de enzimas, materiais catalíticos, ativadores de alvejamento, reforçadores de alvejamento, peróxido de hidrogênio, fontes de peróxido de hidrogênio, perácidos pré-formados, agentes poliméricos dispersantes, agentes de remoção/antirredeposição de sujeira à base de argila, clareadores, supressores de espuma, corantes, perfumes, agentes elastificantes de estrutura, amaciantes de tecidos, carregadores, hidrótropos, elementos auxiliares ao processamento e/ou pigmentos. Além da descrição abaixo, exemplos adequados destes outros compostos auxiliares e quantidades de uso são encontrados nas patentes US n°s 5.576.282, 6.306.812, e 6.326.348, aqui incorporadas por referência. Os ingredientes auxiliares supracitados podem constituir o restante das composições de limpeza da presente invenção.

[000562] Em algumas modalidades, as composições de limpeza de acordo com a presente invenção compreendem pelo menos um tensoativo e/ou um sistema tensoativo, sendo que o tensoativo é selecionado a partir de tensoativos não iônicos, tensoativos aniônicos, tensoativos catiônicos, tensoativos anfóliticos, tensoativos zwitteriônicos, tensoativos não iônicos semipolares e misturas dos mesmos. Em algumas modalidades de composição de limpeza com baixo pH (*por exemplo*, composições tendo um pH puro de cerca de 3 a cerca de 5), a composição tipicamente não contém sulfato etoxilado de alquila, já que se acredita que esse tipo de tensoativo possa ser hidrolisado pelo conteúdo ácido dessas composições. Em algumas modalidades, o tensoativo está presente a um teor de cerca de 0,1% a cerca de 60%, enquanto em modalidades alternativas o teor é de cerca de 1% a cerca de 50%, e enquanto em ainda outras modalidades adicionais, o teor é de cerca de 5% a cerca de 40%, em peso da composição para limpeza.

[000563] Em algumas modalidades, as composições de limpeza da

presente invenção compreendem um ou mais builders detergentes ou sistemas builder. Em algumas modalidades que incorporam pelo menos um builder, as composições de limpeza compreendem pelo menos cerca de 1%, de cerca de 3% a cerca de 60% ou mesmo de cerca de 5% a cerca de 40% de builder, com base no peso da composição para limpeza. Os builders incluem, mas não se limitam a sais de metal alcalino, amônio e alcanolamônio de polifosfatos, silicatos de metal alcalino, carbonatos de metais alcalinoterrosos e alcalinos, aluminossilicatos, compostos de policarboxilato, éter hidróxi policarboxilatos, copolímeros de anidrido maleico com etileno ou éter vinil metílico, ácido 1,3,5-triidróxi benzeno-2,4,6-trissulfônico e ácido carboximetiloxi succínico, os diversos sais de metal alcalino, amônio e amônio substituído de ácidos poliacéticos como ácido etilenodiamino tetraacético e ácido nitrilotriacético, bem como policarboxilatos como ácido melítico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido oxidissuccínico, ácido polimaleico, ácido benzeno 1,3,5-tricarboxílico, ácido carboximetiloxi succínico, e seus sais solúveis. De fato, contempla-se que qualquer builder adequado poderá ser usado em várias modalidades da presente invenção.

[000564] Em algumas modalidades, os builders formam complexos iônicos de dureza solúveis em água (por exemplo, sequestrando builders), como citratos e polifosfatos (*por exemplo*, tripolifosfato de sódio e tripolifosfato de sódio hexaidrato, tripolifosfato de potássio, e tripolifosfato misto de sódio e potássio, etc.). Contempla-se que qualquer builder adequado poderá ser usado na presente invenção, inclusive aqueles conhecidos na técnica (*vide, por exemplo*, EP 2 100 949).

[000565] Em algumas modalidades, as composições de limpeza da presente invenção contêm pelo menos um agente quelante. Os agentes quelantes adequados incluem, mas não se limitam aos agentes quelantes de cobre, ferro, e/ou manganês e misturas dos mesmos. Em modalidades nas quais pelo menos um agente quelante é usado, as

composições de limpeza da presente invenção compreendem de cerca de 0,1% a cerca de 15% ou mesmo de cerca de 3,0% a cerca de 10% de agente quelante, com base no peso da presente composição de limpeza.

[000566] Em ainda outras modalidades adicionais, as composições de limpeza aqui apresentadas contêm pelo menos um auxiliar de deposição. Os auxiliares de deposição adequados incluem, mas não se limitam a, polietileno glicol, polipropileno glicol, policarboxilato, polímeros para liberação de sujeiras, como ácido politereftálico, argilas como caulinita, montmorilonita, atapulgita, illita, bentonita, haloisita e misturas dos mesmos.

[000567] Conforme indicado na presente invenção, em algumas modalidades, os agentes antirredeposição podem ser usados em algumas modalidades da presente invenção. Em algumas modalidades, tensoativos não iônicos podem ser usados. Por exemplo, em modalidades para lavagem de pratos em lavadora automática, são usados tensoativos não iônicos para propósitos de modificação de superfície, em particular para laminação, de modo a evitar formação de filmes e manchas, e para otimizar o brilho. Estes tensoativos não iônicos também podem ser usados para prevenir a redeposição de sujeiras. Em algumas modalidades, o agente antirredeposição é um tensoativo não iônico, conforme conhecido na técnica (*vide, por exemplo*, EP 2 100 949).

[000568] Em algumas modalidades, as composições de limpeza da presente invenção incluem um ou mais agentes inibidores de transferência de corantes. Os agentes inibidores de transferência de corantes poliméricos adequados incluem, mas não se limitam a, polímeros de polivinil pirrolidona, polímeros de N-óxido de poliamina, copolímeros de N-vinil pirrolidona e N-vinil imidazol, poliviniloxazolidonas e polivinilimidazóis ou misturas dos mesmos. Em modalidades nas quais pelo menos um agente inibidor da transferência de corantes é usado, as com-

posições de limpeza da presente invenção compreendem de cerca de 0,0001% a cerca de 10%, de cerca de 0,01% a cerca de 5%, ou mesmo de cerca de 0,1% a cerca de 3%, em peso da composição de limpeza.

[000569] Em algumas modalidades, silicatos são incluídos nas composições da presente invenção. Em algumas dessas modalidades, são usados silicatos de sódio (*por exemplo*, dissilicato de sódio, metassilicato de sódio e filossilicatos cristalinos). Em algumas modalidades, os silicatos estão presentes a um teor de cerca de 1% a cerca de 20%. Em algumas modalidades, os silicatos estão presentes em uma quantidade de cerca de 5% a cerca de 15%, em peso da composição.

[000570] Em algumas modalidades ainda adicionais, as composições de limpeza da presente invenção também contêm dispersantes. Os materiais orgânicos solúveis em água adequados incluem, mas não se limitam a, ácidos homo ou copoliméricos, ou seus sais, sendo que o ácido policarboxílico contém pelo menos dois radicais carboxila separados um do outro por não mais que dois átomos de carbono.

[000571] Em algumas modalidades adicionais, as enzimas usadas nas composições de limpeza são estabilizadas por qualquer técnica adequada. Em algumas modalidades, as enzimas usadas na presente invenção estão estabilizadas pela presença de fontes de íons de cálcio e/ou de magnésio solúveis em água nas composições finalizadas, o que fornece esses íons às enzimas. Em algumas modalidades, os estabilizantes de enzimas incluem oligossacarídeos, polissacarídeos e sais metálicos divalentes inorgânicos, inclusive metais alcalino-terrosos, como sais de cálcio. Contempla-se que várias técnicas para a estabilização de enzimas poderá ser usada na presente invenção. Por exemplo, em algumas modalidades as enzimas aqui usadas são estabilizadas pela presença de fontes solúveis em água de íons de zinco (II), cálcio (II) e/ou magnésio (II) nas composições finalizadas, o que

fornece esses íons às enzimas, bem como outros íons metálicos (por exemplo, bário (II), escândio (II), ferro (II), manganês (II), alumínio (III), estanho (II), cobalto (II), cobre (II), níquel (II) e oxovanádio (IV). Cloretos e sulfatos também podem ser usados em algumas modalidades da presente invenção. Os exemplos de oligossacarídeos e polissacarídeos adequados (por exemplo, dextrinas) são conhecidos na técnica (*consulte, por exemplo*, WO 07/145964). Em algumas modalidades, também são usados os inibidores reversíveis de protease, como compostos contendo boro (*por exemplo*, borato, ácido 4-formil fenil borônico), e/ou um tripeptídeo aldeído é usado para otimizar adicionalmente a estabilidade, conforme se deseje.

[000572] Em algumas modalidades, alvejantes, ativadores de alveamento, e/ou catalisadores de alveamento estão presentes nas composições da presente invenção. Em algumas modalidades, as composições de limpeza da presente invenção compreendem composto(s) de alveamento inorgânico(s) e/ou orgânico(s). Os alvejantes inorgânicos incluem, mas não se limitam a, sais de peridrato (*por exemplo*, sais de perborato, percarbonato, perfosfato, persulfato, e persilicato). Em algumas modalidades, os sais de peridrato inorgânicos são sais de metais alcalinos. Em algumas modalidades, os sais de peridrato inorgânicos são incluídos como o sólido cristalino, sem proteção adicional, embora em algumas outras modalidades o sal seja revestido. Qualquer sal adequado conhecido na técnica pode ser usado na presente invenção (*vide, por exemplo*, EP 2 100 949).

[000573] Em algumas modalidades, ativadores de alveamento são usados nas composições da presente invenção. Os ativadores de alveamento são tipicamente precursores de perácidos orgânicos que aumentam a ação de alveamento durante o curso da limpeza a temperaturas de 60°C e abaixo. Os ativadores de alveamento adequados ao uso na presente invenção incluem compostos que, sob as condições

de peridrólise, dão ácidos peroxicarboxílicos alifáticos que possuem, de preferência, de cerca de 1 a cerca de 10 átomos de carbono, em particular, de cerca de 2 a cerca de 4 átomos de carbono, e/ou ácido perbenzoico opcionalmente substituído. Ativadores de alvejamento adicionais são conhecidos na técnica e podem ser usados na presente invenção (*vide, por exemplo*, EP 2 100 949).

[000574] Além disso, em algumas modalidades e conforme descrito adicionalmente aqui, as composições de limpeza da presente invenção compreendem adicionalmente pelo menos um catalisador de alvejamento. Em algumas modalidades, podem ser usados o manganês triazacilononano e complexos relacionados, bem como complexos de cobalto, cobre, manganês e ferro. Catalisadores de alvejamento adicionais podem ser usados na presente invenção (*vide, por exemplo*, 4.246.612, 5.227.084, e 4.810.410; WO 99/06521; e EP 2 100 949).

[000575] Em algumas modalidades, as composições de limpeza da presente invenção contêm um ou mais complexos de metal catalítico. Em algumas modalidades, pode ser usado um catalisador de alvejante contendo metal. Em algumas modalidades, o catalisador de alvejamento metálico compreende um sistema catalisador que compreende um cátion de metal de transição de atividade catalítica alvejante definida (*por exemplo*, cátions de cobre, ferro, titânio, rutênio, tungstênio, molibdênio, ou manganês), um cátion de metal auxiliar que tem pouca ou nenhuma atividade catalítica alvejante (*por exemplo*, cátions de zinco ou alumínio), e um sequestrado que tem constantes de estabilidade definidas para os cátions de metal catalíticos e auxiliares, particularmente ácido etilenodiaminotetracético, ácido etileno diamino tetra(metileno fosfônico), e sais solúveis em água dessas substâncias (*vide, por exemplo*, patente US nº 4.430.243). Em algumas modalidades, as composições de limpeza da presente invenção são catalisadas através de um composto de manganês. Esses compostos e teores de

uso são bem conhecidos na técnica (*consulte, por exemplo*, a patente US nº 5.576.282). Em modalidades adicionais, catalisadores de alveamento à base de cobalto podem ser usados nas composições de limpeza da presente invenção. Vários catalisadores de alvejante à base de cobalto são conhecidos na técnica (*consulte, por exemplo*, as patentes US nºs 5.597.936 e 5.595.967) e são prontamente preparados por meio de procedimentos conhecidos.

[000576] Em algumas modalidades adicionais, as composições de limpeza da presente invenção incluem um complexo de metal de transição de um ligante macropolicíclico rígido (MRL). Como uma questão prática, mas sem que isto constitua uma limitação, em algumas modalidades, as composições e processos de limpeza fornecidos pela presente invenção são ajustados para fornecer na ordem de pelo menos uma parte por cem milhões da espécie ativa de MRL no meio aquoso para lavagem e, em algumas modalidades, fornecem de cerca de 0,005 ppm a cerca de 25 ppm, com mais preferência, de cerca de 0,05 ppm a cerca de 10 ppm e, com a máxima preferência, de cerca de 0,1 ppm a cerca de 5 ppm, do MRL no líquido de lavagem.

[000577] Em algumas modalidades, os metais de transição no presente catalisador de alveamento à base de metal de transição incluem, mas não se limitam, por exemplo, a manganês, ferro e cromo. Os MRLs incluem, também, mas não se limitam a ligantes ultra-rígidos especiais que possuem ligação cruzada (*por exemplo*, 5,12-dietil-1,5,8,12-tetra-azabíciclo[6.6.2] hexadecano). Os LMRs de metal de transição adequados são prontamente preparados por meio de procedimentos conhecidos (*consulte, por exemplo*, WO 2000/32601 e patente US nº 6.225.464).

[000578] Em algumas modalidades, as composições de limpeza da presente invenção compreendem agentes para tratamento de metais. Os agentes para cuidado de metais podem ser usados para impedir

e/ou reduzir o escurecimento, a corrosão e/ou a oxidação de metais, inclusive alumínio, aço inoxidável e metais não ferrosos (*por exemplo*, prata e cobre). Os agentes adequados para cuidado de metais incluem aqueles descritos em EP 2 100 949, WO 9426860 e WO 94/26859). Em algumas modalidades, o agente para cuidado de metais é um sal de zinco. Em algumas modalidades adicionais, as composições de limpeza da presente invenção compreendem de cerca de 0,1% a cerca de 5%, em peso de um ou mais agentes para tratamento de metais.

[000579] Conforme indicado acima, as composições de limpeza da presente invenção são formuladas em qualquer forma adequada e são preparadas por qualquer processo escolhido pelo formulador, exemplos não-limitadores destes são descritos nas patentes US n°s 5.879.584, 5.691.297, 5.574.005, 5.569.645, 5.516.448, 5.489.392, e 5.486.303, que estão aqui incorporadas a título de referência. Em algumas modalidades nas quais se deseja uma composição de limpeza com baixo pH, o pH dessa composição é ajustado através da adição de um material ácido, como HCl.

[000580] As composições de limpeza aqui apresentadas podem ser usadas para limpar um local (*por exemplo*, uma superfície, item, louças, ou tecido). Tipicamente, pelo menos uma porção do situs é colocada em contato com uma modalidade da presente composição de limpeza, em sua forma pura ou diluída em um líquido de lavagem, sendo então o situs opcionalmente lavado e/ou enxaguado. Para os propósitos da presente invenção, "lavagem" inclui, mas não se limita a esfregamento e agitação mecânica. Em algumas modalidades, as composições de limpeza são tipicamente usadas em concentrações de cerca de 500 ppm a cerca de 15.000 ppm na solução. Quando o solvente de lavagem é água, a temperatura da água situa-se, tipicamente, na faixa de cerca de 5°C a cerca de 90°C e, quando o situs compreende um tecido, a razão entre a massa da água e a massa do teci-

do é, tipicamente, de cerca de 1:1 a cerca de 30:1.

Processos para fazer e usar as composições de limpeza

[000581] As composições de limpeza da presente invenção são formuladas em qualquer forma adequada e são preparadas por qualquer processo adequado escolhido pelo formulador (*vide, por exemplo*, patentes US n°s 5.879.584, 5.691.297, 5.574.005, 5.569.645, 5.565.422, 5.516.448, 5.489.392, 5.486.303, 4.515.705, 4.537.706, 4.515.707, 4.550.862, 4.561.998, 4.597.898, 4.968.451, 5.565.145, 5.929.022, 6.294.514 e 6.376.445).

[000582] Em algumas modalidades, as composições de limpeza da presente invenção são fornecidas em forma de dose unitária, incluindo tabletes, cápsulas, sachês, sacos e sacos de múltiplos compartimentos. Em algumas modalidades, o formato de dose unitária é destinado a proporcionar liberação controlada dos ingredientes dentro de um saco de múltiplos compartimentos (ou outro formato de dose unitária). Os formatos de dose unitária e liberação controlada adequados são conhecidos na técnica (*vide, por exemplo*, EP 2 100 949, WO 02/102955, patentes US n°s 4.765.916 e 4.972.017, e WO 04/111178 para materiais adequados para uso em formatos de dose unitária e liberação controlada). Em algumas modalidades, a forma de dose unitária é fornecida por tabletes envoltos por um filme solúvel em água ou sacos solúveis em água. Vários formatos para doses unitárias são fornecidos em EP 2 100 947, e são conhecidos na técnica.

Métodos de Uso

[000583] Em algumas modalidades, as composições de limpeza da presente invenção podem ser usadas na limpeza de superfícies (*por exemplo*, louças), lavanderia, superfícies duras, lentes de contato, etc. Em algumas modalidades, pelo menos uma porção da superfície é colocada em contato com pelo menos uma modalidade das composições de limpeza da presente invenção, em sua forma pura ou diluída em um

líquido de lavagem, e, então, a superfície é, opcionalmente, lavada e/ou enxaguada. Para os propósitos da presente invenção, "lavagem" inclui, mas não se limita a esfregamento e lavagem mecânica. Em algumas modalidades, as composições de limpeza da presente invenção são usadas em concentrações de cerca de 500 ppm a cerca de 15.000 ppm em solução. Em algumas modalidades nas quais o solvente de lavagem é água, a temperatura da água situa-se, tipicamente, na faixa de cerca de 5 °C a cerca de 90 °C.

[000584] A invenção fornece métodos para limpar ou lavar um item ou superfície (*por exemplo*, superfície dura) que precisa ser limpa, incluindo, mas não se limitando aos métodos para limpar ou lavar louças, utensílio de mesa, um tecido, um item de lavanderia, item de cuidados pessoais, etc., ou similares, e métodos para limpar ou lavar uma superfície dura ou macia (*por exemplo*, uma superfície dura de um item).

[000585] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece um método para limpar um item, objeto, ou superfície que precisa de limpeza, o método compreendendo colocar o item ou superfície (ou uma porção do item ou superfície que se deseja limpar) em contato com pelo menos uma protease subtilisina variante da presente invenção ou uma composição da presente invenção por um tempo suficiente e/ou sob condições adequadas e/ou eficazes para limpar o item, objeto, ou superfície até um grau desejado. Alguns destes métodos compreendem adicionalmente o enxágue do item, objeto ou superfície com água. Para alguns destes métodos, a composição de limpeza é uma composição detergente para lavar louças e o item ou objeto a ser limpo é uma louça ou utensílio de mesa. Para uso na presente invenção, uma "louça" é um item geralmente usado para servir ou comer um alimento. Uma louça pode ser, mas não se limita, por exemplo, a uma bandeja, prato, copo, vasilha, etc., e similares. Para uso na presente

invenção, o termo "utensílios de mesa" é mais amplo e inclui, mas não se limita, por exemplo, a pratos, talheres, facas, garfos, colheres, hashis, copos, jarros, vasilhas para servir molhos, vasilhames para bebidas, itens para servir, etc. Pretende-se que o "utensílio de mesa" inclua qualquer um destes itens ou itens similares para servir comida e comer. Para tais métodos, a composição de limpeza é uma composição detergente para lavagem de louças automática ou uma composição detergente para lavagem de louças à mão e o item ou objeto a ser limpo é uma louça ou um utensílio de mesa. Para alguns destes métodos, a composição de limpeza é uma composição detergente para lavagem de roupas (por exemplo, uma composição detergente em pó para lavagem de roupas ou uma composição detergente líquida para lavagem de roupas), e o item a ser limpo é um item de tecido. Em algumas outras modalidades, a composição de limpeza é uma composição pré-tratamento para lavagem de roupas.

[000586] Em algumas modalidades, a presente invenção apresenta métodos para limpar ou lavar um item de tecido que, opcionalmente, precisa ser limpo ou lavado, respectivamente. Em algumas modalidades, os métodos compreendem fornecer uma composição que compreende a protease variante incluindo, mas não se limitando a uma composição para limpeza de tecido ou de lavanderia, e um item de tecido ou item de lavanderia que precisa ser limpo e colocar o item de tecido ou de lavanderia (ou uma porção do item que se deseja limpar) em contato com a composição sob condições suficientes ou eficazes para limpar ou lavar o tecido ou item de lavanderia até um grau desejado.

[000587] Em algumas modalidades, a presente invenção apresenta um método para limpar ou lavar um item ou superfície (*por exemplo*, uma superfície dura) que precisa, opcionalmente, ser limpa, o método compreendendo fornecer um item ou uma superfície a ser limpa ou

lavada e colocar o item ou superfície (ou uma porção do item ou superfície que se deseja limpar ou lavar) em contato com pelo menos uma variante de subtilisina da invenção ou uma composição da invenção que compreende pelo menos uma tal variante de subtilisina por um tempo suficiente e/ou sob condições suficientes ou eficazes para limpar ou lavar o item ou superfície até um grau desejado. Tais composições incluem, mas não se limitam, por exemplo, a uma composição de limpeza ou composição detergente da invenção (*por exemplo*, uma composição detergente para lavagem de louças à mão, composição de limpeza para lavagem de louças à mão, detergente para lavagem de roupas ou detergente para tecidos ou composição para limpeza de tecidos ou para lavar roupas, detergente líquido para lavagem de roupas, composição de limpeza líquida para lavar roupas, composição detergente em pó para lavagem de roupas, composição de limpeza em pó para lavar roupas, composição detergente para lavagem de louças automática, composição detergente ou de limpeza para reforçar a lavagem de roupas, aditivo para limpeza e lavagem de roupas e pré-removedor de manchas para uso em lavanderia, etc.). Em algumas modalidades, o método é repetido uma ou mais vezes, particularmente se limpeza ou lavagem adicional for desejada. Por exemplo, em alguns casos, o método compreende ainda, opcionalmente, deixar o item ou superfície permanecer em contato com a pelo menos uma protease variante ou composição durante um período de tempo suficiente ou eficaz para limpar ou lavar o item ou superfície até o grau desejado. Em algumas modalidades, os métodos compreendem, adicionalmente, enxaguar o item ou superfície com água e/ou outro líquido. Em algumas modalidades, os métodos compreendem adicionalmente colocar o item ou superfície novamente em contato com pelo menos uma protease variante da invenção ou uma composição da invenção e deixar o item ou superfície permanecer em contato com a pelo menos uma pro-

tease variante ou composição durante um período de tempo suficiente para limpar ou lavar o item ou superfície até um grau desejado. Em algumas modalidades, a composição de limpeza é uma composição detergente para lavar louças e o item a ser limpo é uma louça ou utensílio de mesa. Em algumas modalidades dos presentes métodos, a composição de limpeza é uma composição detergente para lavagem de louças automática ou uma composição detergente para lavagem de louças à mão e o item a ser limpo é uma louça ou um utensílio de mesa. Em algumas modalidades dos métodos, a composição de limpeza é uma composição detergente para lavar roupas e o item a ser limpo é um item de tecido.

[000588] A presente invenção fornece, adicionalmente, métodos para limpar utensílios de mesa ou louças em uma máquina de lavar louças automática, o método compreendendo fornecer uma máquina de lavar louças automática, colocar uma quantidade de uma composição para lavagem de louças automática que compreende pelo menos uma variante de subtilisina da presente invenção ou uma composição da invenção suficiente para limpar os utensílios de mesa ou louças na máquina (*por exemplo*, por colocar a composição em um compartimento ou dispensador para detergente adequado ou fornecido na máquina), colocar as louças ou utensílios de mesa na máquina, e ligar a máquina de modo a limpar os utensílios de mesa ou louças (*por exemplo*, de acordo com as instruções do fabricante). Em algumas modalidades, os métodos incluem qualquer composição para lavagem de louças automática aqui descrita, que compreende, mas não se limita a pelo menos uma variante de subtilisina aqui fornecida. A quantidade de composição para lavagem de louças automática a ser usada pode ser facilmente determinada de acordo com as instruções ou sugestões do fabricante e qualquer forma de composição para lavagem de louças automática que compreende pelo menos uma protease variante da in-

venção (*por exemplo*, forma líquida, em pó, sólida, gel, tablete, etc.), incluindo qualquer uma aqui descrita, pode ser empregada.

[000589] A presente invenção fornece, adicionalmente, métodos para limpeza de uma superfície, item ou objeto que precisa opcionalmente de limpeza, o método compreendendo colocar o item ou superfície (ou uma porção do item ou superfície que se deseja limpar) em contato com pelo menos uma subtilisina variante da presente invenção ou uma composição de limpeza da invenção em sua forma pura ou diluída em um líquido de lavagem por um tempo suficiente e/ou sob condições suficientes ou eficazes para limpar ou lavar o item ou superfície até um grau desejado. A superfície, item, ou objeto pode, então, ser (opcionalmente) lavada e/ou enxaguada, se desejado. Para os propósitos da presente invenção, "lavagem" inclui, mas não se limita a, *por exemplo*, esfregamento e agitação mecânica. Em algumas modalidades, as composições de limpeza são empregadas em concentrações de cerca de 500 ppm a cerca de 15.000 ppm em solução (*por exemplo*, solução aquosa). Quando o solvente de lavagem é água, a temperatura da água situa-se, tipicamente, na faixa de cerca de 5°C a cerca de 90°C e quando a superfície, o item ou o objeto compreende um tecido, a razão em massa entre a água e o tecido é tipicamente de cerca de 1:1 a cerca de 30:1.

[000590] A presente invenção fornece, adicionalmente, métodos para limpar roupas ou um item de tecido em uma máquina de lavar, o método compreendendo fornecer uma máquina de lavar, colocar uma quantidade de uma composição detergente para lavagem de roupas que compreende pelo menos uma subtilisina variante da invenção suficiente para limpar a roupa ou item de tecido na máquina (*por exemplo*, colocando a composição em um compartimento ou dispensador para detergente adequado ou fornecido na máquina), colocar a roupa ou item de tecido na máquina, e ligar a máquina de modo a limpar a roupa ou

item de tecido (*por exemplo*, de acordo com as instruções do fabricante). Os métodos da presente invenção incluem qualquer composição detergente para lavagem de roupas aqui descrita, compreendendo, mas não se limitando a pelo menos uma de qualquer subtilisina variante aqui fornecida. A quantidade de composição detergente para lavagem de roupas a ser usada pode ser facilmente determinada de acordo com as instruções ou sugestões do fabricante e qualquer forma de composição detergente para lavagem de roupas que compreende pelo menos uma protease variante da invenção (*por exemplo*, na forma sólida, em pó, líquida, tablete, gel etc.), incluindo qualquer uma aqui descrita, pode ser empregada.

Experimental

[000591] A presente invenção é descrita em maiores detalhes nos exemplos a seguir, que não se destinam a limitar o escopo da invenção como reivindicada.

[000592] Na descrição experimental a seguir, as seguintes abreviações se aplicam: PI (índice de desempenho), ppm (partes por milhão); M (molar); mM (milimolar); μ M (micromolar); nM (nanomolar); mol (mols); mmol (milimols); μ mol (micromols); nmol (nanomols); gm (gramas); mg (miligramas); μ g (microgramas); pg (picogramas); L (litros); ml e mL (mililitros); μ l e μ L (microlitros); cm (centímetros); mm (mm); μ m (micrômetros); nm (nanômetros); U (unidades); V (volts); MW (peso molecular); s (segundos); min(s) (minuto/minutos); h(s) e hr(s) (hora/horas); °C (graus centígrados); QS (suficiente quantidade); ND (não realizado); rpm (revoluções por minuto); GH (grau alemão de dureza); H₂O (água); dH₂O (água desionizada); HCl (ácido clorídrico); aa (aminoácido); bp (par de base); kb (par de quilobase); kD (quilodáltons); cDNA (DNA de cópia ou complementar); DNA (ácido desoxirribonucleico); ssDNA (DNA de fita simples); dsDNA (DNA de dupla-fita); dNTP (trifosfato de desoxirribonucleotídeo); RNA (ácido ribonucleico);

MgCl_2 (cloreto de magnésio); NaCl (cloreto de sódio); p/v (peso por volume); v/v (volume por volume); p/p (peso por peso); g (gravidade); OD (densidade óptica); ppm (partes por milhão); solução tamponada com fosfato de Dulbecco (DPBS); SOC (2% Bacto-triptona, 0,5% de extrato de Bacto levedura, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM); caldo Terrific (TB; 12 g/l de Bacto-triptona, 24 g/l de glicerol, 2,31 g/l de KH_2PO_4 , e 12,54 g/l de K_2HPO_4); OD_{280} (densidade óptica a 280 nm); OD_{600} (densidade óptica a 600 nm); A_{405} (absorbância a 405 nm); $V_{\text{máx}}$ (a velocidade inicial máxima de uma reação catalisada por enzima); PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida); PBS (solução salina tamponada com fosfato [NaCl 150 mM, tampão de fosfato de sódio 10 mM, pH 7,2]); PBST (PBS+0,25% de TWEEN®-20); PEG (polietileno glicol); PCR (reação em cadeia de polimerase); RT-PCR (PCR de transcrição reversa); SDS (dodecil sulfato de sódio); Tris (tris(hidroximetil)aminometano); HEPES (ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N-[2-etanossulfônico]); HBS (solução salina tamponada com HEPES); Tris-HCl (tris[hidroximetil]aminometano-cloridrato); Tricina (N-[tris-(hidroximetil)-metil]-glicina); CHES (ácido 2-(N-ciclo-hexilamino)etano-sulfônico); TAPS (ácido 3-[[tris-(hidroximetil)-metil]-amino]-propanossulfônico); CAPS (ácido 3-(ciclo-hexilamino)-propano-sulfônico); DMSO (sulfóxido de dimetila); DTT (1,4-ditio-DL-treitol); SA (ácido sinapínico (ácido 5,5-dimetóxi-4-hidróxi cinâmico)); TCA (ácido tricloroacético); Glut e GSH (glutathiona reduzida); GSSG (glutathiona oxidada); TCEP (Tris[2-carboxietil] fosfina); Ci (Curies); mCi (miliCuries); μCi (microCuries); HPLC (cromatografia líquida de alta pressão); RP-HPLC (cromatografia líquida de alta pressão de fase reversa); CCF (cromatografia de camada fina); MALDI-TOF (Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz--tempo de voo); Ts (tosila); Bn (benzila); Ph (fenila); Ms (mesila); Et (etila), Me (metila); *Taq* (DNA polimerase de *Thermus aquaticus*); Klenow (fragmento grande (Kle-

now) da DNA polimerase I); EGTA (ácido etileno glicol-bis(β -éter aminoetílico)N,N,N',N'-tetraacético); EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético); bla (gene de resistência à β -lactamase ou ampicilina); HDL (líquido de alta densidade); HDD (detergente em pó para tarefas pesadas); HSG (detergente granular que forma muita espuma); CEE (Europa Central e Oriental); WE (Europa Ocidental); NA, quando usado com relação aos detergentes (América do Norte); Japão e JPN, quando usado com relação aos detergentes (Japão); MJ Research (MJ Research, Reno, NV); Baseclear (Baseclear BV, Inc., Leiden, Holanda); PerSeptive (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, EUA); ThermoFinnigan (ThermoFinnigan, San Jose, CA, EUA); Argo (Argo BioAnalytica, Morris Plains, NJ, EUA); Seitz EKS (SeitzSchenk Filtersystems GmbH, Bad Kreuznach, Alemanha); Pall (Pall Corp., East Hills, NY, EUA e Bad Kreuznach, Alemanha); Spectrum (Spectrum Laboratories, Dominguez Rancho, CA, EUA); Molecular Structure (Molecular Structure Corp., Woodlands, TX, EUA); Accelrys (Accelrys, Inc., San Diego, CA, EUA); Chemical Computing (Chemical Computing Corp., Montreal, Canadá); New Brunswick (New Brunswick Scientific, Co., Edison, NJ, EUA); CFT (Center for Test Materials, Vlaardingen, Holanda); P&G e Procter & Gamble (Procter & Gamble, Inc., Cincinnati, OH, EUA); GE Healthcare (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido); DNA2.0 (DNA2.0, Menlo Park, CA, EUA); OXOID (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido); Megazyme (Megazyme International Ireland Ltd., Bray Business Park, Bray, Co., Wicklow, Irlanda); Finnzymes (Finnzymes Oy, Espoo, Finland); Kelco (CP Kelco, Wilmington, DE, EUA); Corning (Corning Life Sciences, Corning, NY, EUA); (NEN (NEN Life Science Products, Boston, MA, EUA); Pharma AS (Pharma AS, Oslo, Noruega); Dynal (Dynal, Oslo, Noruega); Bio-Synthesis (Bio-Synthesis, Lewisville, TX, EUA); ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA); Gibco/BRL (Gibco/BRL, Grand Island, NY,

EUA); Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA); Pharmacia (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA); NCBI (National Center for Biotechnology Information); Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA); BD Biosciences e/ou Clontech (BD Biosciences CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA, EUA); Operon Technologies (Operon Technologies, Inc., Alameda, CA, EUA); MWG Biotech (MWG Biotech, High Point, NC, EUA); Oligos Etc (Oligos Etc. Inc, Wilsonville, OR, EUA); Bachem (Bachem Bioscience, Inc., King of Prussia, PA, EUA); Difco (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA); Mediatech (Mediatech, Herndon, VA, EUA); Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EUA); Oxoid (Oxoid Inc., Ogdensburg, NY, EUA); Worthington (Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ, EUA); GIBCO BRL ou Gibco BRL (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, EUA); Millipore (Millipore, Billerica, MA, EUA); Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA); Invitrogen (Invitrogen Corp., San Diego, CA, EUA); NEB (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA); Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA); Pierce (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA); Takara (Takara Bio Inc. Otsu, Japão); Roche (Hoffmann-La Roche, Basel, Suíça); EM Science (EM Science, Gibbstown, NJ, EUA); Qiagen (Qiagen, Inc., Valencia, CA, EUA); Biodesign (Biodesign Intl., Saco, Maine); Aptagen (Aptagen, Inc., Herndon, VA, EUA); Sorvall (marca Sorvall, da empresa Kendro Laboratory Products, Asheville, NC, EUA); Molecular Devices (Molecular Devices, Corp., Sunnyvale, CA, EUA); R&D Systems (R&D Systems, Minneapolis, MN); Siegfried Handel (Siegfried Handel AG, Zofingen, Suíça); Stratagene (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, EUA); Marsh (Marsh Biosciences, Rochester, NY, EUA); Geneart (Geneart GmbH, Regensburg, Alemanha); Bio-Tek (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, EUA); (Biacore (Biacore, Inc., Piscataway, NJ, EUA); PeproTech (PeproTech, Rocky Hill, NJ, EUA); SynPep (SynPep, Dublin, CA, EUA); New Objective

(marca New Objective; Scientific Instrument Services, Inc., Ringoes, NJ, EUA); Waters (Waters, Inc., Milford, MA, EUA); Matrix Science (Matrix Science, Boston, MA, EUA); Dionex (Dionex, Corp., Sunnyvale, CA, EUA); Monsanto (Monsanto Co., St. Louis, MO, EUA); Wintershall (Wintershall AG, Kassel, Alemanha); BASF (BASF Co., Florham Park, NJ, EUA); Huntsman (Huntsman Petrochemical Corp., Salt Lake City, UT, EUA); Shell Chemicals (Shell Chemicals, Inc., Londres, Reino Unido); Stepan (Stepan, Northfield, IL, EUA); Clariant (Clariant, Sulzbach, Alemanha); Industrial Zeolite (Industrial Zeolite Ltd., Grays, Essex, Reino Unido); Jungbunzlauer (Jungbunzlauer, Basel, Suíça); Solvay (Solvay, Bruxelas, Bélgica); 3V Sigma (3V Sigma, Bergamo, Itália); Innospec (Innospec, Ellesmere Port, Reino Unido); Thermphos (Thermphos, Vlissingen-Ost, Holanda); Ciba Specialty Chemicals (Ciba Specialty Chemicals, Basel, Suíça); Dow Corning (Dow Corning, Barry, Reino Unido); Enichem (Enichem Iberica, Barcelona, Espanha); Fluka Chemie AG (Fluka Chemie AG, Buchs, Suíça); Gist-Brocades (Gist-Brocades, NV, Delft, Holanda); Dow Corning (Dow Corning Corp., Midland, MI, EUA); Mettler-Toledo (Mettler-Toledo Inc, Columbus, OH, EUA); RB (Reckitt-Benckiser, Slough, Reino Unido); e Microsoft (Microsoft, Inc., Redmond, WA, EUA).

[000593] Para uso na presente invenção, em algumas listas, uma leitura "0" é indicada, de modo a fornecer uma designação de três números para cada local (*por exemplo*, "001" é igual a "1", então "A001C" é igual a "A1C"). Em algumas listas, a leitura "0" não é incluída. Além disso, para uso na presente invenção, "X" se refere a qualquer aminoácido.

[000594] Nas composições detergentes exemplificadas aqui fornecidas, os níveis das enzimas são expressos como enzima pura em peso da composição total e exceto onde especificado em contrário, os ingredientes do detergente são expressos com base no peso das com-

posições totais. As identificações abreviadas dos componentes têm os seguintes significados:

Abreviação	Ingrediente
LAS	: C ₁₁₋₁₃ Alquil benzeno sulfonato linear de sódio
NaC16-17HSAS	: Sulfato de alquila C ₁₆₋₁₇ de sódio altamente solúvel
TAS	: Alquil sulfato de sódio de sebo
CxyAS	: Sulfato de alquila C _{1x} - C _{1y} de sódio
CxyEz	: C _{1x} - C _{1y} Álcool primário predominantemente linear condensado com uma média de z mols de óxido de etileno.
CxyAEzS	: C _{1x} - C _{1y} Alquil sulfato de sódio condensado com uma média de z mols de óxido de etileno. Nome da molécula adicionada nos exemplos.
Não iônico	: Álcool graxo etoxilado/propoxilado misto, por exemplo, Plurafac LF404 sendo um álcool com um grau médio de etoxilação de 3,8 e um grau médio de propoxilação de 4,5.
QAS	: R ₂ .N ⁺ (CH ₃) ₂ (C ₂ H ₄ OH) com R ₂ = C ₁₂ -C ₁₄ .
Silicato	: silicato de sódio amorfo (razão de SiO ₂ :Na ₂ O = 1,6-3,2:1).
Metassilicato	: Metassilicato de sódio (razão de SiO ₂ :Na ₂ O = 1,0).
Zeólito A	: Aluminossilicato hidratado de fórmula Na ₁₂ (AlO ₂ SiO ₂) ₁₂ . 27H ₂ O
SKS-6	: Silicato cristalino em camadas de fórmula δ-Na ₂ Si ₂ O ₅ .
Sulfato	: Sulfato de sódio anidro.
STPP	: Tripolifosfato de sódio
MA/AA	: Copolímero aleatório de acrilato/maleato 4:1, peso molecular médio de cerca de 70.000 a 80.000
AA	: Polímero de poliacrilato de sódio de peso molecular médio 4.500
Policarboxilato	: Copolímero compreendendo uma mistura de monômeros carboxilados como acrilato, maleato e acrilato de metila com um peso molecular na faixa de entre 2.000 a 80.000 como, por exemplo, Sokolan disponível comercialmente junto à BASF, que é um copolímero de ácido acrílico, peso molecular 4.500
BB1	: Sulfonato de 3-(3,4-diidro isoquinolínio)propano
BB2	1-(3,4-Di-hidroisoquinolínio)-decano-2-sulfato

Abreviação	Ingrediente
PB1	: Perborato de sódio mono-hidratado
PB4	: Perborato de sódio tetra-hidratado de fórmula nominal $\text{Na-BO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.
Percarbonato	: Percarbonato sódio de fórmula nominal $2\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}_2$.
TAED	: tetra acetil etileno diamina
NOBS	: sulfonato de nonanoiloxibenzeno sob a forma do sal de sódio.
DTPA	: ácido dietileno triamina penta-acético.
HEDP	: ácido 1,1-hidroxietano difosfônico.
DETPMP	: Dietiltriaminapenta(metileno)fosfonato, comercializado pela Monsanto sob o nome comercial de Dequest 2060.
EDDS	: ácido etileno diamina-N,N'-dissuccínico, isômero (S,S) sob a forma de seu sal de sódio
Diamina	: Dimetil aminopropilamina; 1,6-hexano diamina; 1,3-propano diamina; 2-metil-1,5-pentanodiamina; 1,3-pentanodiamina; 1-metil-diaminopropano.
DETBCHD	5, 12- dietil-1,5,8,12-tetra-azabicyclo [6,6,2] hexadecano, dicloreto, sal de Mn(II)
PAAC	: Sal de cobalto(III) de acetato de pentaamina.
Parafina	: Óleo de parafina vendido sob o nome comercial de Winog 70 pela Wintershall.
Sulfonato de parafina	: Um óleo ou cera de parafina na qual alguns dos átomos de hidrogênio foram substituídos por grupos sulfonato.
Aldose oxidase	: A enzima oxidase vendida sob o nome comercial de Aldose Oxidase pela Novozymes A/S
Galactose oxidase	: Galactose oxidase da Sigma
nprE	: A forma recombinante da metaloprotease neutra expressa em <i>Bacillus subtilis</i> (vide, por exemplo, WO 07/044993).
PMN	: metaloprotease neutra purificada de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .

Abreviação	Ingrediente
Amilase	: Uma enzima amilolítica adequada, como as vendidas sob as marcas registradas PURAFECT® Ox descrita em WO 94/18314, WO96/05295 vendida pela Genencor; NATALASE®, TERMAMYL®, FUNGAMYI® e DURAMYL™, todas disponíveis junto à Novozymes A/S.
Lipase	: Uma enzima lipolítica adequada como, por exemplo, aquelas vendidas sob as marcas registradas LIPEX®, LIPO-LASE®, LIPOLASE® Ultra pela Novozymes A/S e Lipomax™ pela Gist-Brocades.
Celulase	: Uma enzima celulítica adequada como, por exemplo, aquelas vendidas sob as marcas registradas CAREZYME®, CELLUZYME®, e/ou ENDOLASE® pela Novozymes A/S.
Pectina liase	: Uma pectina liase adequada, como aquelas vendidas sob as marcas registradas PECTAWAY® e PECTAWASH® disponíveis junto à Novozymes A/S.
PVP	: Polivinilpirrolidona com um peso molecular médio de 60.000
PVNO	: N-óxido de polivinil piridina, com um peso molecular médio de 50.000.
PVPVI	: Copolímero de vinilimidazol e vinilpirrolidona, com um peso molecular médio de 20.000.
Alvejante 1	: 4,4'-bis(2-sulfostiril)bifenila dissódica.
Antiespumante de silicone	: Controlador de espuma de polidimetilsiloxano com copolímero de siloxano-oxialquilenos como agente dispersante com uma razão entre o dito controlador de espuma e o dito agente dispersante de 10:1 a 100:1.
Supressor de espuma	: 12% de silicone/sílica, 18% de álcool estearílico, 70% de amido na forma granular.
SRP 1	: Poli ésteres com terminação anionicamente capeada.
PEG X	: Polietileno glicol, com um peso molecular de x.
PVP K60 ®	: Homopolímero de vinilpirrolidona (peso molecular médio de 160.000)
Jeffamine ® ED-2001	: Polietileno glicol capeado da Huntsman
Isachem ® AS	: Um sulfato de alquila de álcool ramificado da Enichem

Abreviação	Ingrediente
MME PEG (2000)	: Polietileno glicol de éter monometílico (MW 2000) da Fluka Chemie AG.
DC3225C	: Supressor de espuma de silicone, mistura de óleo de silicone e sílica da Dow Corning.
TEPAE	: Tetraetileno pentaamina etoxilato.
BTA	: Benzotriazol.
Betaina	: $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$
Açúcar	: D-glicose de grau industrial ou açúcar de grau alimentício
CFAA	: $\text{C}_{12}\text{-C}_{14}$ alquil n-metil glicamida
TPKFA	: $\text{C}_{12}\text{-C}_{14}$ ácidos graxos de corte completo (topped whole cut fatty acids).
Argila	: Um silicato de alumínio hidratado de fórmula geral $\text{Al}_2\text{O}_3\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. Tipos: caulinita, montmorilonita, atapulgita, illita, bentonita, haloisita.
pH	: Medido como uma solução a 1% em água destilada a 20°C.

[000595] Para os detergentes líquidos de lavar roupas para tarefas pesadas (HDL) norte-americanos (NA) e da Europa Ocidental (WE), a inativação por calor das enzimas presentes nos detergentes comercialmente disponíveis é feita por colocar o detergente líquido pré-pesado (em um frasco de vidro) em um banho-maria a 95°C durante 2 horas. O tempo de incubação para a inativação por calor dos detergentes para lavagem automática de pratos (ADW) NA e WE é de 8 horas. Tanto com detergentes não aquecidos quanto os aquecidos são testados dentro de 5 minutos após a dissolução do detergente para determinar precisamente a porcentagem desativada. A atividade enzimática é testada pelo teste AAPF.

[000596] Para testar a atividade enzimática em detergentes inativados por calor, soluções de trabalho dos detergentes são feitas a partir dos estoques inativados por calor. As quantidades adequadas de dureza da água (*por exemplo*, 102,6 ppm ou 205,2 ppm (6 gpg ou 12 gpg)) e tampão são adicionados às soluções detergentes para se adequar às condições desejadas. As soluções são misturadas através de

vortexação ou inversão dos frascos. A tabela a seguir fornece informações referentes a alguns dos detergentes comercialmente disponíveis e as condições de teste usadas aqui. Em alguns experimentos, detergentes adicionais e/ou outros detergentes comercialmente disponíveis podem ser usados nos exemplos a seguir.

Tabela A. Condições de lavagem de roupas e louças							
Região	Forma	Dose	Detergente*	Tampão	ppm (Gpg)	pH	T (°C)
Lavanderia (líquido (HDL) e granular (HDG) para tarefas pesadas)							
NA	HDL	0,78 g/l	P&G TIDE® 2X	HEPES 5 mM	102,6 (6)	8,0	20
WE	HDL	5,0 g/L	Henkel PERSIL™	HEPES 5 mM	205,2 (12)	8,2	40
WE	HDG	8,0 g/L	P&G ARIEL®	Na ₂ CO ₃	205,2 (12)	10,5	40
JPN	HDG	0,7 g/L	P&G TIDE®	Na ₂ CO ₃ 2 mM	102,6 (6)	10,0	20
NA	HDG	1,0 g/L	P&G TIDE®	Na ₂ CO ₃ 2 mM	102,6 (6)	10,0	20
Lavagem de louças automática (ADW)							
WE	ADW	3,0 g/L	RB CALGONIT™	Na ₂ CO ₃ 2 mM	359,1 (21)	10,0	40
NA	ADW	3,0 g/L	P&G CASCADE®	Na ₂ CO ₃ 2 mM	153,9 (9)	10,0	40

[000597] Em alguns exemplos adicionais, as seguintes soluções podem ser usadas:

Tabela B Soluções detergentes de trabalho					
Detergente	Temp (C)	Detergente g/L	pH	Tampão	ppm (Gpg)
TIDE® 2X Para água fria	16	0,98	8	5 mM HEPES	102,6 (6)
TIDE® 2X Para água fria	32	0,98	8	5 mM HEPES	102,6 (6)
TIDE® 2X Para água fria	16	0,98	7	5 mM MOPS	102,6 (6)

[000598] A Tabela C fornece composições detergentes granulares para lavagem de roupas produzidas de acordo com a invenção adequadas para a lavagem de tecidos.

Tabela C. Composições detergentes granulares para lavagem de roupas e seus componentes

Componente	Composições detergentes					
	1	2	3	4	5	6
Alquilbenzeno sulfonato linear com comprimento de cadeia de carbono alifático C ₁₁ -C ₁₂	15	12	20	10	12	13
Outros tensoativos	1,6	1,2	1,9	3,2	0,5	1,2
Builder à base de fosfato(s)	2	3	4			
Zeólito		1		1	4	1
Silicato	4	5	2	3	3	5
Carbonato de sódio	2	5	5	4	0	3
Poliacrilato (peso molecular 4500)	1	0,6	1	1	1,5	1
Carbóxi metilcelulose (Finnfix BDA disponível junto à CPKelco)	1	-	0,3	-	1,1	-
Celluclean® (15,6 mg/g)	0,23	0,17	0,5	0,2	0,2	0,6
Protease para água fria*	0,23	0,17	0,05	0,2	0,03	0,1
Stainzyme Plus® (14 mg/g)	0,23	0,17	0,5	0,2	0,2	0,6
Mannaway 4,0T (4 mg/g)	0,1			0,1		0,1
Lipex 100T (18,6 mg/g)	0,2		0,1		0,3	
Alvejante(s) fluorescente(s)	0,16	0,06	0,16	0,18	0,16	0,16
Ácido dietileno triamino pentacético ou ácido etilenodiamino tetra-acético	0,6		0,6	0,25	0,6	0,6
MgSO ₄	1	1	1	0,5	1	1
Alvejante(s) e ativador(es) de alveamento	6,88		6,12	2,09	1,17	4,66
Corante tonalizante de tiofeno etoxilado ⁵	0,002	0,001	0,003	0,003	-	-
Violeta Direto 9 disponível junto à Ciba Specialty Chemicals				0,0006	0,0004	0,0006
Sulfato/ácido cítrico/ bicarbonato de sódio/ umidade/perfume	qsp 100%					

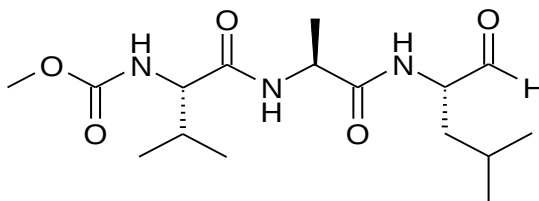
1Copolímero enxertado aleatório é um copolímero de óxido de polietileno enxertado e acetato de polivinila que tem uma cadeia

principal de óxido de polietileno e múltiplas cadeias laterais de acetato de polivinila. O peso molecular da cadeia principal de óxido de polietileno é cerca de 6000 e a razão entre o peso do óxido de polietileno e o peso do acetato de polivinila é cerca de 40 a 60 e não mais que 1 ponto de enxertia por 50 unidades de óxido de etileno.

2 Polietilenoimina (MW = 600) com 20 grupos etoxilato por -NH.

3 O polímero anfifílico alcoxilado para limpeza de gordura é uma polietilenoimina (MW = 600) com 24 grupos etoxilato por $-NH$ e 16 grupos propoxilato por $-NH$

4 Inibidores reversíveis de protease com a estrutura:



5 O corante tonalizante de tiofeno etoxilado é conforme descrito no documento US 7.208.459 B2.

[000599] Na Tabela C, todos os níveis enzimáticos são expressos como % de matéria prima de enzima, com exceção da protease para água fria (desta invenção) que é expressa como % da proteína ativa adicionada ao produto.

[000600] A Tabela D fornece composições detergentes granulares para lavagem de roupas adequadas para máquinas de lavar automáticas de carregamento superior (composições detergentes 7 a 9) e máquinas de lavar de carregamento frontal (composições detergentes 10 a 11). A variante de protease GG36 testada e/ou a protease para água fria da presente invenção é adicionada separadamente a estas formulações.

Tabela D. Composições detergentes granulares para lavagem de roupas e seus componentes

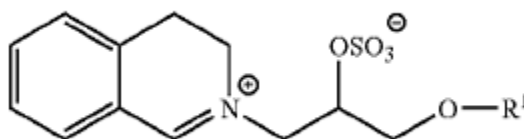
Componente	Composição detergente				
	7	8	9	10	11
Tensoativos					
sulfato de C ₁₆₋₁₇ alquila ramificada	3,55	15,8			
Sulfato de C ₁₂₋₁₄ alquila			1,5		
Alquilbenzeno sulfonato linear de sódio com comprimento de cadeia alifática C ₁₁ -C ₁₂	9,6		10,6	7,5	9
C _{14/15} álcool etóxi-3-sulfato de sódio	1,15			2,88	
C _{14/15} alquil sulfato de sódio	2,37				
C _{14/15} álcool etoxilato com média de 7 mols de etoxilação				1,17	1
cloreto de mono-C ₈₋₁₀ alquil mono-hidróxi etil dimetil amônio quaternário					0,45
Cloreto de dimetil hidroxietil lauril amônio			0,18		
Zeólito A	13,9	4,7	0,01	2,9	1,8
Silicato de sódio razão 1,6	4	0,2		4	4
Silicato de sódio razão 2,35			8		
Ácido cítrico				2,5	1,4
Tripolifosfato de sódio			5		
Carbonato de sódio	24,1	30	16,9	24,4	21
Nonanoilóxi benzenossulfonato	5,78	2,81	0,96		
Reforço alvejante à base de oxaziridínio				0,03	0,017
S,S-etilenodiamina dissuccinato tetrassódico				0,2	
dietilenodiamina penta(ácido metileno fosfônico), sal heptassódico	0,61				0,33
ácido hidroxietano dimetileno fosfônico				0,29	0,45
Tetra-acetato de etilenodiamina			0,27		
MgSO ₄			0,47	0,5994	0,782
Percarbonato sódio	7	4,4		15,9	19,1
Tetra acetil etilenodiamina				3,3	4,6
Perborato de sódio mono-hidratado			1,2		
Carbóxi metilcelulose (por exemplo, Finifix BDA ex CPKelco)	0,1		0,17	1,69	0,23

Tabela D. Composições detergentes granulares para lavagem de roupas e seus componentes

Componente	Composição detergente				
	7	8	9	10	11
copolímero de ácido acrílico de sódio/ácido maleico (70/30)	0,0236	3,8		2	2,5
Poliacrilato de sódio (Sokalan PA30 CL)	4		0,84		
Polímero de tereftalato				0,23	
copolímero enxertado aleatório de polietileno glicol/acetato de vinila			0,89	0,89	0,91
fotobranqueador- ftalocianina tetrassulfonato de zinco			0,005	0,001	0,002
Alvejante fluorescente C.I. 260	0,11	0,15	0,04	0,23	0,15
Alvejante fluorescente C.I. 351 (Tinopal ® CBS)			0,1		
Supressor de espuma granular		0,25		0,07	0,04
Carbóxi metil celulose hidrofobicamente modificada (Finnifix ® SH-1)			0,019	0,028	
Bentonita			8,35		
Outros (corantes, perfumes, auxiliares de processamento, umidade e sulfato de sódio)	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.

[000601] Na Tabela D, os ingredientes tensoativos podem ser obtidos junto à qualquer fornecedor adequado, incluindo, mas não se limitando a BASF (*por exemplo*, LUTENSOL®), Shell Chemicals, Stepan, Huntsman, e Clariant (*por exemplo*, PRAEPAGEN®). O zeólito pode ser obtido junto a fontes como, por exemplo, Industrial Zeolite. O ácido cítrico e o citrato de sódio podem ser obtidos junto a fontes como, por exemplo, Jungbunzlauer. O percarbonato sódio, carbonato de sódio, bicarbonato de sódio e sesquicarbonato de sódio podem ser obtidos junto a fontes como, por exemplo, Solvay. Os copolímeros de acrilato/maleato podem ser obtidos junto a fontes como, por exemplo, BASF. A carbóxi metil celulose e carbóxi metil celulose hidrofobicamente modificada podem ser obtidas junto a fontes como, por exem-

plo, CPKelco. O alvejante fluorescente C.I 260 pode ser obtido junto à 3V Sigma (*por exemplo*, OPTIBLANC®, OPTIBLANC® 2M/G, OPTIBLANC® 2MG/LT Extra, ou OPTIBLANC® Ecobright. S,S-etilenodiamina dissuccinato tetrassódico pode ser obtido junto a fontes como, por exemplo, Innospec. O copolímero de tereftalato pode ser obtido junto à Clariant (*por exemplo*, REPELOTEX SF 2). Além disso, o ácido 1-hidroxietano-1,1-difosfônico pode ser obtido junto à Thermphos. O reforço alvejante à base de oxaziridínio tem a seguinte estrutura, na qual R1 = 2-butiloctila, e foi produzido de acordo com o documento US 2006/0089284A1.



[000602] As enzimas NATALASE®, TERMAMYL®, STAINZYME PLUS®, CELLUCLEAN® e MANNAWAY®, podem ser obtidas junto à Novozymes. A ftalocianina tetrassulfonato de zinco pode ser obtida junto à Ciba Specialty Chemicals (*por exemplo*, TINOLUX® BMC). O supressor de espuma granular pode ser obtido junto à Dow Corning. Nestas composições detergentes, o copolímero enxertado aleatório é um copolímero de óxido de polietileno enxertado e acetato de polivinila que tem uma cadeia principal de óxido de polietileno e múltiplas cadeias laterais de acetato de polivinila. O peso molecular da cadeia principal de óxido de polietileno é cerca de 6000 e a razão entre o peso do óxido de polietileno e o peso do acetato de polivinila é cerca de 40 a 60 e não mais que 1 ponto de enxertia por 50 unidades de óxido de etileno.

[000603] As Tabelas E-G fornecem composições detergentes granulares adicionais adequadas para máquinas de lavar (detergentes 36a-n). A variante de protease GG36 testada ou a protease para água fria da presente invenção é adicionada separadamente a estas formulações.

Tabela E. Composições detergentes granulares para lavagem de roupas adicionais e seus componentes

Componente	Composição detergente				
	36a	36b	36c	36d	36e
Tensoativos					
C ₁₀ Não iônico				0,184 3	
Sulfato de C ₁₆₋₁₇ alquila ramificada	3,53	3,53	3,53		
Sulfato de C ₁₂₋₁₄ alquila					
Alquilbenzeno sulfonato linear de sódio com comprimento de cadeia alifática C ₁₁ -C ₁₂	8,98	8,98	8,98	13,58	14,75
C _{14/15} Álcool etóxi-3-sulfato de sódio	1,28	1,28	1,28		
C _{14/15} Alquil sulfato de sódio	2,36	2,36	2,36		
C _{14/15} Álcool etoxilato com média de 7 mols de etoxilação					
Cloreto de mono-C ₈₋₁₀ alquil mono-hidróxi etil dimetil amônio quaternário					
Cloreto de dimetil hidroxietil lauril amônio				0,180 3	
Zeólito A	15,31	15,31	15,31		4,47
Bentonita				8,35	
Silicato de sódio razão 1,6					0,16
Silicato de sódio razão 2,0	3,72	3,72	3,72	8,41	
Silicato de sódio razão 2,35					
Ácido cítrico				0,006 6	
Tripolifosfato de sódio				5,06	
Carbonato de sódio	26,1	26,18	26,1	15,9	29,0

Tabela E. Composições detergentes granulares para lavagem de roupas adicionais e seus componentes

Componente	Composição detergente				
	36a	36b	36c	36d	36e
Tensoativos					
Nonanoilóxi benzenossulfonato	5,78	5,78	5,78	1,17	1,86
Reforço alvejante à base de oxaziridínio	0,037	0,037	0,037		
S,S-etilenodiamina dissuccinato tetrassódico					
Dietilenodiamina penta(ácido metileno fosfônico), sal heptassódico	0,62	0,62	0,62		
Ácido hidroxietano dimetileno fosfônico					
Tetra-acetato de etilenodiamina				0,270 1	
MgSO ₄	0,056	0,056	0,056	0,47	
Percarbonato sódio		7,06	7,06		3,64
Tetra acetil etilenodiamina					
Perborato de sódio mono-hidratado				1,47	
Carbóxi metilcelulose (por exemplo, Finnfix BDA ex CPKelco)	0,38	0,38	0,38	0,173	
Copolímero de ácido acrílico de sódio/ácido maleico (70/30)	3,79	3,78	3,79		3,64
Poliacrilato de sódio (Sokalan PA30 CL)	3,78	3,78	3,78	0,842	
Polímero de tereftalato					
Copolímero enxertado aleatório de polietileno glicol/acetato de vinila				0,89	

Tabela E. Composições detergentes granulares para lavagem de roupas adicionais e seus componentes

	Composição detergente				
Componente	36a	36b	36c	36d	36e
Tensoativos					
Fotobranqueador- ftalocianina te- trassulfonato de zinco					
Alvejante fluorescente C.I. 260	0,112 5	0,1125	0,112 5	0,043	0,15
Alvejante fluorescente C.I. 351 (Ti- nopal ® CBS)				0,095 2	
Supressor de espuma granular	0,015	0,015	0,015		0,031
Carbóxi metil celulose hidrofobica- mente modificada (Finnifix ® SH-1)					
Bentonita					
Outros (corantes, perfumes, auxilia- res de processamento, umidade e sulfato de sódio)	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.

**Tabela F. Composições detergentes granulares para lavagem de rou-
pas adicionais e seus componentes**

	Composição detergente				
Componente	36f	36g	36h	36i	36j
Tensoativos					
C ₁₀ Não iônico	0,1142	0,2894	0,1885	0,1846	0,1885
Sulfato de C ₁₆₋₁₇ alquila ramificada					
Sulfato de C ₁₂₋₁₄ alquila					
Alquilbenzeno sulfonato linear de sódio com comprimento de cadeia alifática C ₁₁ -C ₁₂	12,94	15,69	9,01	8,42	9,51
C _{14/15} Álcool etóxi-3-sulfato de sódio					

C _{14/15} Alquil sulfato de sódio					
C _{12/14} Álcool etoxilato com média de 7 mols de etoxilação	2,9				
C _{12/14} Álcool etoxilato com média de 3 mols de etoxilação				2,44	
C _{14/15} Álcool etoxilato com média de 7 mols de etoxilação			0,97	1,17	0,97
Cloreto de mono-C ₈₋₁₀ alquil mono-hidróxi etil dimetil amônio quaternário			0,45		
Cloreto de dimetil hidroxietil lauril amônio		0,195			0,45
Zeólito A	2,01	0,39	1,83	2,58	0,59
Silicato de sódio razão 1,6			4,53	5,62	4,53
Silicato de sódio razão 2,0		10,1			
Silicato de sódio razão 2,35	7,05				
Ácido cítrico			1,4	1,84	1,0
Tripolifosfato de sódio		5,73			
Carbonato de sódio	12,65	15,93	21,0	27,31	20,2
Nonanoilóxi benzenossulfonato		1,73			
Reforço alvejante à base de oxaziridínio			0,0168	0,0333	0,024
S,S-etilenodiamina dissuccinato tetrassódico					
Dietilenodiamina penta(ácido metileno fosfônico), sal heptassódico			0,327		0,3272
Ácido hidroxietano dimetileno fosfônico			0,45	0,2911	0,45
Tetra-acetato de etilenodiamina		0,28		0,1957	
MgSO ₄		0,54	0,79	0,6494	0,793
Percarbonato sódio			19,1	15,85	22,5
Tetra acetil etilenodiamina			4,554	3,71	5,24

Perborato de sódio mono-hidratado		5,55			
Carbóxi metilcelulose (por exemplo, Finnfix BDA ex CPKelco)	0,62	0,21	0,23	1,07	0,2622
Copolímero de ácido acrílico de só- dio/ácido maleico (70/30)	0,40	2,61	2,5	2,00	1,75
Poliacrilato de sódio (Sokalan PA30 CL)			0,0055	0,011	0,008
Polímero de tereftalato				0,231	
Copolímero enxertado aleatório de polietileno glicol/acetato de vinila	0,55	1,40	0,911	0,8924	0,911
Fotobranqueador- ftalocianina te- trassulfonato de zinco					
Alvejante fluorescente C.I. 260	0,1174	0,048	0,1455	0,2252	0,1455
Alvejante fluorescente C.I. 351 (Ti- nopal ® CBS)		0,1049			
Supressor de espuma granular			0,04	0,0658	0,04
Carbóxi metil celulose hidrofobica- mente modificada (Finnifix ® SH-1)					
Bentonita					
Outros (corantes, perfumes, auxilia- res de processamento, umidade e sulfato de sódio)	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.

**Tabela G. Composições detergentes granulares para lavagem de rou-
pas adicionais e seus componentes**

Componente	Composição detergente				
	36k	36l	36m	36n	
Tensoativos					
C ₁₀ Não iônico	0,1979	0,1979	0,1979	0,1979	
Sulfato de C ₁₆₋₁₇ alquila ramificada					
Sulfato de C ₁₂₋₁₄ alquila					

Alquilbenzeno sulfonato linear de sódio com comprimento de cadeia alifática C ₁₁ -C ₁₂	8,92	8,92	11,5	11,5	
C _{14/15} Álcool etóxi-3- sulfato	1,62	1,62	1,125	1,125	
C _{14/15} Alquil sulfato de sódio					
C _{14/15} Álcool etoxilato com média de 7 mols de etoxilação	1,0	1,0	1,5	1,5	
Cloreto de mono-C ₈₋₁₀ alquil mono-hidróxi etil dimetil amônio quaternário					
Cloreto de dimetil hidroxietil lauril amônio					
Zeólito A	1,63	1,63	2,0	2,0	
Silicato de sódio razão 1,6	4,75	4,75	4,75	4,75	
Silicato de sódio razão 2,0			0,06	0,06	
Silicato de sódio razão 2,35					
Ácido cítrico	1,10	1,10	1,1	1,1	
Tripolifosfato de sódio					
Carbonato de sódio	23,3	23,3	23,3	23,3	
Nonanoilóxi benzenossulfonato					
Reforço alvejante à base de oxaziridínio	0,021	0,021	0,015	0,015	
S,S-etilenodiamina dissuccinato tetrassódico	0,26	0,26	0,26	0,26	
Dietilenodiamina penta(ácido metileno fosfônico), sal heptassódico					
Ácido hidroxietano dimetileno fosfônico	0,47	0,47	0,47	0,47	
Tetra-acetato de etilenodiamina					
MgSO ₄	0,83	0,83	0,82	0,82	
Percarbonato sódio	19,35	19,35	19,35	19,35	
Tetra acetil etilenodiamina	4,51	4,51	4,51	4,51	

Perborato de sódio mono-hidratado					
Carbóxi metilcelulose (por exemplo, Finnfix BDA ex CPKelco)	1,01	1,01	1,01	1,01	
Copolímero de ácido acrílico de só- dio/ácido maleico (70/30)	1,84	1,84	1,84	1,84	
Poliacrilato de sódio (Sokalan PA30 CL)	0,007	0,007	0,005	0,005	
Polímero de tereftalato	0,179	0,179	0,179	0,179	
Copolímero enxertado aleatório de polietileno glicol/acetato de vinila	0,96	0,96	0,96	0,96	
Fotobranqueador- ftalocianina te- trassulfonato de zinco					
Alvejante fluorescente C.I. 260	0,153	0,153	0,171	0,171	
Alvejante fluorescente C.I. 351 (Ti- nopal ® CBS)					
Supressor de espuma granular	0,042	0,042	0,042	0,042	
Carbóxi metil celulose hidrofobica- mente modificada (Finnifix ® SH-1)					
Bentonita					
Outros (corantes, perfumes, auxilia- res de processamento, umidade e sulfato de sódio)	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.

[000604] Observações para composições detergentes 36 a-n nas Tabelas E, F, G:

[000605] Os ingredientes tensoativos podem ser obtidos junto à BASF, Ludwigshafen, Alemanha (Lutensol®); Shell Chemicals, Londres, Reino Unido; Stepan, Northfield, Illinois, EUA; Huntsman, Huntsman, Salt Lake City, Utah, EUA; Clariant, Sulzbach, Alemanha (Praepagen®).

[000606] O zeólito pode ser obtido junto à Industrial Zeolite (Reino Unido) Ltd, Grays, Essex, Reino Unido.

[000607] O ácido cítrico e o citrato de sódio podem ser obtidos junto à Jungbunzlauer, Basel, Suíça.

[000608] O percarbonato sódio, carbonato de sódio, bicarbonato de sódio e sesquicarbonato de sódio podem ser obtidos junto à Solvay, Bruxelas, Bélgica.

[000609] Os copolímeros de acrilato/maleato podem ser obtidos junto à BASF, Ludwigshafen, Alemanha.

[000610] A carbóxi metil celulose e carbóxi metil celulose hidrofobicamente modificada podem ser obtidas junto à CPKelco, Arnhem, Holanda.

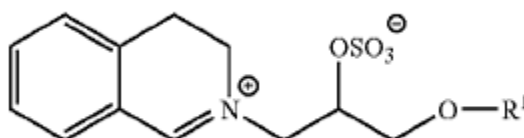
[000611] O alvejante fluorescente C.I 260 pode ser obtido junto à 3V Sigma, Bergamo, Itália, como Optiblanc® Optiblanc® 2M/G, Optiblanc® 2MG/LT Extra, ou Optiblanc® Ecobright.

[000612] S,S-etilenodiamina dissuccinato tetrassódico pode ser obtido junto à Innospec, Ellesmere Port, Reino Unido.

[000613] O copolímero de tereftalato pode ser obtido junto à Clariant sob a marca registrada Repelotex SF 2.

[000614] O ácido 1-hidroxietano-1,1-difosfônico pode ser obtido junto à Thermphos, Vlissingen-Oost, Holanda.

[000615] O reforço alvejante à base de oxaziridínio tem a seguinte estrutura, na qual R1 = 2-butiloctila, e foi produzido de acordo com o documento US 2006/0089284A1.



[000616] As enzimas Natalase®, Termamyl®, Stainzyme Plus®, Celluclean® e Mannaway®, podem ser obtidas junto à Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca.

[000617] A ftalocianina tetrassulfonato de zinco pode ser obtida junto à Ciba Specialty Chemicals, Basel, Suíça, como Tinolux® BMC.

[000618] O grânulo de supressor de espuma pode ser obtido a partir de Dow Corning, Barry, Reino Unido.

[000619] O copolímero enxertado aleatório é um copolímero de óxido de polietileno enxertado e acetato de polivinila que tem uma cadeia principal de óxido de polietileno e múltiplas cadeias laterais de acetato de polivinila. O peso molecular da cadeia principal de óxido de polietileno é cerca de 6000 e a razão entre o peso do óxido de polietileno e o peso do acetato de polivinila é cerca de 40 a 60 e não mais que 1 ponto de enxertia por 50 unidades de óxido de etileno.

Exemplo 1

Ensaaios e métodos de teste

[000620] Este exemplo descreve os vários métodos de teste e ensaios usados no desenvolvimento da presente invenção. Quaisquer desvios dos protocolos fornecidos são indicados nos exemplos pertinentes.

[000621] Os ensaios foram feitos usando um robô Biomek FX (Beckman Coulter) ou um pipetador multicanal (*por exemplo*, Rainin PipetLite, Mettler-Toledo) e um leitor de MTP SpectraMAX (tipo 340; Molecular Devices).

A. Métodos de teste

Método de teste 1

[000622] Um protocolo para definir se um corante ou material de pigmento é um agente de tonalização de tecido com o propósito da invenção é fornecido abaixo:

1) Encha dois recipientes de tergotômetro com 800 ml de água Newcastle upon Tyne, Reino Unido, City Water (~205,2 ppm (12 grãos por galão americano) de dureza total, fornecida pela Northumbrian Water, Pity Me, Durham, Co. Durham, Reino Unido).

2) Insira os recipientes no tergotômetro, com a temperatura da água controlada a 30°C e agitação ajustada a 40 rpm pela duração

do experimento.

3) Adicione 4,8 g de detergente IEC-B (detergente-base de referência tipo B para máquina de lavar IEC 60456), fornecido pela wfk, Brüggem-Bracht, Alemanha, a cada recipiente.

4) Após dois minutos, adicione 2,0 mg de corante ativo ao primeiro recipiente.

5) Após um minuto, adicione 50 g de uma roupa de algodão puro (fornecida pela Warwick Equest, Consett, County Durham, Reino Unido), cortada em amostras de 5 cm x 5 cm, a cada recipiente.

6) Após 10 minutos, drene os recipientes e encha novamente com água fria (16°C) com uma dureza da água de 14,4 graus Clark de dureza inglesa com uma razão molar entre cálcio e magnésio de 3:1.

7) Após enxágue de 2 minutos, remova os tecidos.

8) Repita as etapas 3 a 7 por mais três ciclos usando os mesmos tratamentos.

9) Colete e seque os tecidos pendurados em ambiente interno durante 12 horas.

10) Analise as amostras usando um espectrômetro Hunter Miniscan equipado com um iluminador D65 e filtro de corte de UVA, para obter valores de Hunter a (eixo vermelho-verde) e Hunter b (eixo amarelo-azul).

11) Faça a média dos valores Hunter a e Hunter b para cada conjunto de tecidos. Se os tecidos tratados com o corante em avaliação mostrarem uma diferença média no tom maior que 0,2 unidade no eixo a ou no eixo b, ele é considerado um agente de tonalização de tecido para os propósitos da invenção.

Método de teste 2

[000623] Para o método de teste 2, o teste em amostras de tecido com SLT fornecido abaixo é executado usando a composição deter-

gente granular 10 (*vide* Tabela D acima). O detergente para lavagem de roupas é dissolvido em água com uma dureza de 205,2 ppm (12 gpg) e ajustado para uma temperatura de 16°C, e a enzima variante de protease de interesse é adicionada. O desempenho das enzimas variantes de protease é então determinado de acordo com o teste em amostras de tecido com SLT descrito. O índice de desempenho é determinado pela comparação do desempenho da enzima variante de protease com o da enzima subtilisina GG36 de *B. lentus* que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2, em todos os casos, com a faixa de dosagem da enzima sendo de 0,1 a 5 ppm. As enzimas variantes de protease que possuem um índice de desempenho de 1,1 ou mais são vistas como proteases para água fria.

Método de teste 3

[000624] Para o método de teste 3, o teste em amostras de tecido com SLT fornecido abaixo é executado usando a composição detergente granular para lavagem de roupas 7 (*vide* Tabela D, acima). O detergente para lavagem de roupas é dissolvido em água com uma dureza de 102,6 ppm (6 gpg) e ajustado para uma temperatura de 16°C, e a enzima variante de protease GG36 de interesse é adicionada. O desempenho das enzimas variantes de protease GG36 é então determinado de acordo com o teste em amostras de tecido com SLT descrito. O índice de desempenho é determinado pela comparação do desempenho da enzima variante de protease GG36 com o da enzima subtilisina GG36 de *B. lentus* que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2, em todos os casos, com a faixa de dosagem da enzima sendo de 0,1 a 5 ppm. As enzimas variantes de protease GG36 que possuem um índice de desempenho de 1,1 ou mais são vistas como proteases para água fria.

Método de teste 4

[000625] Para o método de teste 4, o teste em amostras de tecido

com SLT é executado usando a composição detergente granular para lavagem de roupas 7 (*vide* Tabela D, acima). O detergente para lavagem de roupas é dissolvido em água com uma dureza de 102,6 ppm (6 gpg) e ajustado para uma temperatura de 16°C, e a enzima variante de protease GG36 de interesse é adicionada. O desempenho das enzimas variantes de protease GG36 é então determinado de acordo com o teste em amostras de tecido com SLT descrito. O índice de desempenho é determinado pela comparação do desempenho da enzima variante de protease GG36 com o de uma enzima GG36-A158E, de referência, a dita enzima GG36-A158E de referência consistindo na sequência de aminoácidos da protease GG36 subtilisina de *B. lentus* da SEQ ID NO:2 com uma única substituição de alanina por ácido glutâmico na posição 158 (*isto é*, a mutação A158E), em todos os casos, com a faixa de dosagem da enzima sendo de 0,1 a 5 ppm. As enzimas variantes de protease GG36 que possuem um índice de desempenho de 1,0 ou mais são vistas como proteases para água fria.

Método de teste 6

[000626] Para o método de teste 6, o teste em amostras de tecido com SLT é feito com o uso de um dos detergentes 36a a 36n na Tabela 1-2. O detergente é dissolvido em água com uma dureza, conforme especificada na Tabela 1-2 e ajustado para uma temperatura de 16°C. O desempenho das enzimas variantes é então determinado de acordo com o teste em amostras de tecido com SLT descrito. O índice de desempenho é determinado pela comparação do desempenho da variante com o da enzima da SEQ ID NO:2, com a faixa de dosagem da enzima sendo de 0,1 a 5 ppm, em todos os casos. As enzimas que possuem um índice de desempenho de 1,1 ou mais são vistas como proteases para água fria.

B. Testes

Teste de TCA para a determinação do teor de proteína em placas de

microtitulação de 96 poços

[000627] As culturas de *B. subtilis* foram cultivadas por 2 a 3 dias a 37°C, agitando a 250 a 300 rpm com aeração úmida. As células foram removidas do sobrenadante da cultura contendo a enzima por centrifugação e/ou filtração. A concentração da protease/proteína/enzima foi determinada com o uso de um teste de precipitação de TCA. Uma alíquota (20 a 25 µl) de sobrenadante da cultura foi transferida para uma placa de microtitulação de fundo plano de 96 poços (MTP; placa de poliestireno transparente de ligação média Costar 9017) contendo 100 µL/poço de HCl 0,25 N. A "linha de base" lida foi determinada por leitura de dispersão de luz/absorbância a 405 nm após 5 segundos de mistura. 100 µL/poço de ácido tricloroacético (TCA) 30% (p/v) foram adicionados à placa contendo HCl e ela foi incubada durante 10 minutos à temperatura ambiente para facilitar a precipitação da proteína. A dispersão de luz/absorbância a 405 nm desta placa de "teste" foi determinada após 5 segundos de mistura. O aumento de turvação/dispersão de luz nas amostras está correlacionado com a quantidade total de proteína precipitável no sobrenadante da cultura. Os cálculos foram feitos por subtrair a leitura da "linha de base" (obtida após a adição de HCl) da leitura de "teste" (obtida após a adição de TCA) para fornecer uma medida relativa da proteína total presente. Se desejado, uma curva padrão pode ser criada por calibrar as leituras de TCA com testes de protease AAPF (veja abaixo) dos clones com atividade específica conhecida. Entretanto, os resultados de TCA são lineares com relação à concentração de proteína de 50 a 500 partes por milhão (ppm) de proteína (onde 1 ppm corresponde à 1 mg/mL) e podem então ser plotados diretamente contra o desempenho da enzima com o propósito de escolher variantes com o desempenho desejado.

Teste AAPF para protease em placas de microtitulação de 96 poços

[000628] De modo a determinar a atividade de protease das varian-

tes de serina protease, mediu-se a hidrólise de N-succinil-L-alanil-L-alanil-L-prolil-L-fenil-p-nitroanilida (suc-AAPF-pNA). As soluções de reagentes usadas foram: Tris/HCl 100 mM, pH 8,6, contendo 0,005% de TWEEN®-80 (tampão de diluição Tris); tampão Tris 100 mM, pH 8,6, contendo CaCl_2 1 mM e 0,005% de TWEEN®-80 (tampão de Tris/Ca); e suc-AAPF-pNA 160 mM em DMSO (solução de estoque de suc-AAPF-pNA) (Sigma: S-7388). Para preparar uma solução de trabalho de suc-AAPF-pNA, 1 ml de solução de estoque de suc-AAPF-pNA foi adicionada a 100 ml de tampão de Tris/Ca e misturada bem por pelo menos 10 segundos. O teste foi feito pela adição de 10 μl de solução de protease diluída a cada poço de uma MTP de 96 poços, imediatamente seguida da adição de 190 μl de solução de trabalho de suc-AAPF-pNA a 1 mg/ml. As soluções foram misturadas durante 5 s, e a alteração de absorbância no modo cinético (25 leituras em 5 minutos) foi lida a 405 nm em um leitor MTP, a 25°C. A atividade da protease foi expressa como AU (atividade = $\Delta\text{OD} \cdot \text{min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$).

Teste de inibição de eglina C

[000629] Conforme descrito na presente invenção, a concentração e a atividade específica da serina protease foram determinadas por titulação com um inibidor chamado eglina c. A eglina c do parasita *Hirudo medicinalis* é um inibidor de proteína com forte ligação a subtilisinas e protease ASP (Heinz *et al.*, Biochemistry, 31: 8755-66 [1992]), e pode, portanto, ser usada para medir a concentração da enzima protease, que, por sua vez, permite o cálculo da atividade específica. O gene para eglina c foi sintetizado e expresso em *E. coli* por métodos-padrão. Suas propriedades e potência inibitória foram iguais as da eglina c comprada da Sigma.

(i) Determinação da concentração de uma solução de estoque de Eglina C

[000630] Uma amostra de subtilisina de *Bacillus lentus* de atividade

específica conhecida foi diluída em tampão Tris 100 mM, pH 8,6, contendo CaCl_2 1 mM e 0,005% de TWEEN®-80 (tampão de Tris/Ca), até uma concentração adequada para o teste AAPF de protease descrito acima. Várias diluições da solução de estoque de eglina c também foram feitas no tampão de Tris/Ca. Uma alíquota de cada solução de eglina c diluída foi misturada com um volume igual da solução de subtilisina de *Bacillus lentus* diluída. Uma alíquota do tampão de Tris/Ca sozinho, sem eglina c, também foi misturada com um volume igual da solução de subtilisina de *Bacillus lentus* diluída, de modo a medir a atividade de subtilisina não inibida na ausência de eglina c. As soluções misturadas foram incubadas à temperatura ambiente durante 15 a 30 minutos e a atividade da protease de cada amostra foi, então, medida pelo teste AAPF descrito acima. Usando a atividade específica conhecida da subtilisina de *Bacillus lentus*, determinou-se a concentração da protease ativa em cada amostra. A concentração de eglina c em cada amostra foi, então, calculada com base na redução da atividade da protease observada em comparação à amostra de subtilisina não inibida que foi misturada apenas com tampão de Tris/Ca (sem eglina c). Desta forma, usando as diluições e volumes conhecidos das soluções de eglina c, determinou-se a concentração da eglina c na solução de estoque.

(ii) Determinação da concentração e atividade específica das variantes de subtilisina

[000631] Amostras de variantes de subtilisina foram diluídas em tampão Tris 100 mM, pH 8,6, contendo CaCl_2 1 mM e 0,005% de TWEEN®-80 (tampão de Tris/Ca). Várias diluições da solução de estoque de eglina c de concentração conhecida também foram feitas no tampão de Tris/Ca. Uma alíquota de cada solução de eglina c diluída foi misturada com um volume igual de uma solução de variante de subtilisina. As soluções misturadas foram incubadas à temperatura ambi-

ente durante 15 a 30 minutos e a atividade da protease de cada amostra foi, então, medida pelo teste AAPF. Usando a redução da atividade da protease observada pela adição de cada amostra de eglina c e a concentração conhecida da eglina c, calculou-se a concentração da eglina c necessária para a inibição completa de cada variante da enzima subtilisina. Esta concentração é equivalente à concentração de enzimas na amostra. Uma alíquota do tampão de Tris/Ca sozinho, sem eglina c, também foi misturada com cada amostra da variante de subtilisina e a atividade de protease na ausência de eglina c foi medida. A atividade específica das variantes de subtilisina foi, então, calculada usando as concentrações de enzima determinadas acima.

Teste em amostras de tecido com SLT (teste SLT)

[000632] Pequenas amostras de tecido pré-enzaguadas e perfuradas manchadas com sangue, leite e tinta (SLT) (EMPA116) de 5,5 mm de diâmetro circular em placas de microtitulação de 96 poços (MTP; Corning 3641) foram obtidas junto ao Center for Testmaterials BV (Vlaardingen, Holanda).

[000633] Os detergentes 7 a 11 e 36a-n (Tabelas D a G) foram preparados por mistura durante pelo menos 30 minutos em carbonato de sódio 2 mM, tamponado para pH 10,3 com o teor adequado de dureza de água (3:1 Ca:Mg. - $\text{CaCl}_2 \cdot \text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) em água Milli-Q, conforme descrito na Tabela 1-1 e na Tabela 1-2. Os detergentes foram aliquotados em tubos cônicos de 50 ml (Falcon), centrifugados para remover o precipitado, e resfriados sobre gelo durante 30 minutos antes do uso.

[000634] As concentrações de enzima foram equalizadas até uma concentração fixa desejada na faixa de 20 a 50 ppm em relação a um padrão de GG36 purificada. A atividade específica de GG36 com o uso de AAPF como um substrato foi usada para converter os valores de TCA subtraídos da linha de base na concentração de enzimas em ppm. Uma vez determinada a concentração de enzimas em ppm, uma

fórmula simples foi usada para calcular o volume de cada variante que precisava ser adicionado a um volume fixo de tampão (300 a 600 µL) de modo a obter a concentração de enzimas desejada da solução estoque:

$$x = (\text{ppm alvo})(v_b) / (y - \text{ppm alvo})$$

[000635] Onde x =volume de enzima, y = concentração de enzimas, v_b = volume de tampão

[000636] Um robô Perkin-Elmer Janus com um braço de canal Versipan 8 foi usado para dispensar volumes variáveis de enzima a partir da placa fonte (placa de poços parcialmente profundos Axygen com as variantes coletadas agrupadas usadas no teste de teste para concentração de enzimas TCA) na placa de destino cheia com tampão com o uso de pontas condutivas. As amostras foram misturadas três vezes por pipetar para cima e para baixo. A precisão das diluições de enzima foi validada mediante a medição da atividade de AAPF da placa equalizada e comparação com a da placa fonte, para verificar que as diluições corretas foram feitas.

[000637] Após a equalização, 5 a 15 µL de solução de enzima foram adicionados a uma placa contendo uma pequena amostra de tecido com SLT cheia com detergente para atingir um volume final de ~200 µL. Em alguns casos, as amostras de enzima não foram equalizadas e, ao invés disso, foram todas diluídas igualmente a partir da placa de solução estoque para fornecer uma faixa de trabalho de 0,1 a 5 ppm. As concentrações alvo ótimas para cada teste foram determinadas a partir de uma curva dose-resposta medindo a atividade de limpeza ao longo desta faixa para um dado detergente.

[000638] A MTP foi lacrada com folha metálica (Bio-Rad) e incubada em na incubadora/agitador iEMS (Thermo/Labsystems) pré-ajustada a 16°C em uma sala refrigerada a 4°C ou a 32°C sobre a bancada durante 30 minutos a 1400 rpm. Após a incubação, 120 µL do sobrenadante foram transferidos

para uma nova MTP (Corning 9017) e a placa foi lida a 600 nm com o uso do leitor SpectraMax. As leituras de absorbância verdadeiras foram obtidas por subtrair um controle em branco (sem enzima) de cada valor.

[000639] Um índice de desempenho (PI) foi calculado para cada variante. O índice de desempenho é a razão entre a absorbância do sobrenadante produzido pela limpeza da enzima variante e a absorbância produzida pela limpeza de GG36 a uma concentração de enzimas fixa. Para as placas equalizadas, os valores de PI foram calculados por dividir a absorbância de uma variante pela absorbância do controle em uma dada placa. Para as placas não equalizadas, uma curva padrão (por exemplo, Langmuir ou ajuste de modelo de regressão logístico não linear de quatro parâmetros) é gerada a partir da atividade e da concentração de enzimas dos controles. Com o uso desta curva padrão, o desempenho das variantes pode ser comparado diretamente ao controle em qualquer concentração de enzimas. O PI é determinado por dividir a absorbância das variantes pela absorbância calculada para o controle na mesma concentração de enzimas.

[000640] Um índice de desempenho (PI) maior que 1 ($PI > 1$) indica limpeza superior por uma variante em comparação ao padrão (*por exemplo*, GG36), enquanto que um PI de 1 ($PI = 1$) identifica uma variante que tem o mesmo desempenho que o padrão, e um PI menor que 1 ($PI < 1$) identifica uma variante que tem desempenho pior que o padrão.

TABELA 1-1: Detergente, dureza da água, e concentrações de tampão finais usadas para os testes em amostras de tecido com SLT			
Composição detergente	Concentração final do detergente (g/L)	Dureza da água da final* (partes por milhão (gpg))	Concentração final do tampão de carbonato de sódio (mM)
7	0,808	102,6 (6)	2
8	1	51,3 (3)	2
9	2,3	205,2 (12)	2
10	5,9	205,2 (12)	2
11	8,3	205,2 (12)	2

* Concentração de (3:1 Ca:Mg), conforme detalhado no texto.

TABELA 1-2: Detergente, dureza da água, e concentrações de tampão finais usadas para os testes em amostras de tecido com SLT			
Composição detergente	Concentração final do detergente (g/L)	Dureza da água final* (ppm (gpg))	Concentração final do tampão de carbonato de sódio (mM)
36a	0,75	102,6 (6)	2
36b	0,808	102,6 (6)	2
36c	0,808	102,6 (6)	2
36d	2,25	205,2 (12)	2
36e	1	51,3 (3)	2
36f	1,2	205,2 (12)	2
36g	3,96	205,2 (12)	2
36h	7,69	342,0 (20)	2
36i	5	171,0 (10)	2
36j	7,69	342,0 (20)	2
36k	7,69	342,0 (20)	2
36l	6,15	170,5 (10)	2
36m	7,69	341,1 (20)	2
36n	6,15	341,1 (20)	2

* Concentração de (3:1 Ca:Mg), conforme detalhado no texto.

Teste de estabilidade em LAS/EDTA

[000641] A estabilidade das variantes de protease na presença de um tensoativo aniônico representativo (LAS=sulfonato de alquilbeno linear, dodecilbenzenossulfonato de sódio-DOBS) e EDTA dissódico é medida após incubação sob condições definidas e a atividade residual é determinada usando o teste AAPF descrito acima. Os reagentes usados foram sal de sódio de sulfonato de dodecilbenzeno (DOBS, Sigma No. D-2525), TWEEN®-80 (Sigma No. P-8074), EDTA dissódico (Siegfried Handel No. 164599-02), HEPES (Sigma No. H-7523), tampão não submetido ao estresse: HEPES 50 mM (11,9 g/l) + 0,005% de TWEEN®-80, pH 8,0, tampão de estresse: HEPES 50 mM (11,9 g/l), 0,1% (p/v) de DOBS (1 g/l), EDTA 10 mM (3,36 g/l), pH 8,0,

sobrenadantes da cultura da protease de referência e da variante de protease, contendo 200 a 400 µg/ml de proteína. O equipamento usado foram MTPs de fundo V ou U como placas de diluição (Greiner 651101 e 650161, respectivamente), MTPs de fundo F (Corning 9017) para tampão não submetido a estresse e tampão LAS/EDTA assim como para as placas com suc-AAPF-pNA, Biomek FX (Beckman Coulter), leitor de placas Spectramax Plus 384 (Molecular Devices), incubadora/agitador iEMS (Thermo /Labsystems).

[000642] A incubadora/agitador iEMS (Thermo/Labsystems) é ajustada para 29°C. Os sobrenadantes da cultura foram diluídos nas placas contendo tampão não submetido a estresse até uma concentração de ~ 25 ppm (placa de diluição mestre). Para o teste, 20 µl de amostra da placa de diluição mestre foram adicionados a placas contendo 180 µl de tampão não submetido a estresse para fornecer uma concentração final de incubação de 2,5 ppm. Os conteúdos foram misturados e mantidos à temperatura ambiente e um teste AAPF foi feito nesta placa. Além disso, 20 µl de amostra da placa de diluição mestre também foram adicionados às placas contendo 180 µl de tampão de estresse (HEPES 50 mM (11,9 g/l), 0,1% (p/v) de DOBS (1 g/l), EDTA 10 mM (3,36 g/l), pH 8,0). As soluções foram misturadas e colocadas imediatamente em um agitador iEMS a 29°C durante 30 min a 400 rpm. Após 30 minutos de incubação, o teste AAPF é feito na placa sob estresse. A estabilidade das amostras é determinada pelo cálculo da razão entre a atividade de AAPF residual e inicial, da seguinte forma: Atividade residual (%) = $\frac{[\text{mOD} \cdot \text{min}^{-1} \text{ sob estresse}]}{[\text{mOD} \cdot \text{min}^{-1} \text{ sem estresse}]} \cdot 100$.

[000643] O detergente final, a dureza da água e as concentrações de tampão são determinados com base no sistema de teste a ser usado (*por exemplo*, condições norte-americanas, japonesas, da Europa Ocidental, ou da Europa Central). Em algumas modalidades, o desempe-

nho de remoção de manchas das variantes de protease é determinado em detergentes comercialmente disponíveis. A inativação por calor de fórmulas detergentes comerciais serve para destruir a atividade enzimática de quaisquer componentes de proteína, mas mantendo as propriedades de componentes não-enzimáticos. Desta forma, este método é adequado para preparar detergentes adquiridos comercialmente para uso no teste das variantes de enzima da presente invenção.

Teste de microtitulação com ovo cozido

[000644] Para este teste, placas de 96 poços com substrato de gema de ovo cozida são preparadas a partir de gemas de ovo de galinha. Gemas de ovo de galinha são separadas das claras, liberadas da membrana vitelínica e diluídas a 20% (vol/peso) com água Milli-Q. A gema diluída é agitada durante 15 minutos à temperatura ambiente usando um agitador magnético. Cinco μL são cuidadosamente pipetados no centro de cada poço de uma placa de fundo V de 96 poços (Costar #3894) usando uma pipeta de 8 canais. As placas são cozidas a 90°C durante 1 hour e resfriadas à temperatura ambiente. As placas com substrato de gema de ovo cozida são armazenadas à temperatura ambiente e usadas dentro de uma semana após a preparação. Detergentes para lavagem automática de pratos são preparados conforme descrito na presente invenção e pré-aquecidos até 50°C. Uma alíquota de 190 μL de detergente é adicionada a cada poço de uma placa de 96 poços usando uma pipeta de 8 canais. Dez μL de enzima diluída são adicionados a cada poço usando um dispositivo de pipetagem de 96 canais. A placa é cuidadosamente lacrada com uma seladora de folha adesiva e incubada a 50°C com agitação durante 30 min. 120 μL da mistura de reação são transferidos para uma nova placa de fundo plano de 96 poços, e a absorbância/dispersão de luz é determinada a 405 nm. A absorbância/dispersão de luz a 405 nm é proporcional à remoção de gema de ovo.

Teste em pequena amostra de tecido com gema de ovo ("teste em pequena amostra de tecido CS-38"; ou "EGG" ou "Dish")

[000645] Os detergentes para lavagem automática de pratos são preparados conforme descrito na presente invenção. O equipamento usado incluiu um agitador/incubadora New Brunswick Innova 4230 e um leitor de placas SpectraMAX (tipo 340). As MTPs são obtidas junto à Costar (tipo 9017). Amostras de gema de ovo envelhecida com pigmento (CS-38) são obtidas junto ao Center for Test Materials (Vlaardingem, Amsterdam, Holanda). Antes de cortar pequenas amostras de tecido circulares de 0,64 cm (0,25 polegada), o tecido é lavado com água. Uma pequena amostra de tecido é colocada em cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços. Um detergente de teste é equilibrado a 50°C. 190 µl da solução detergente são adicionados a cada poço da MTP contendo as pequenas amostras de tecido. A esta mistura, adicionou-se 10 µl da solução de diluição de enzima diluída. A MTP é lacrada com folha adesiva e colocada na incubadora durante 30 minutos, com agitação. Após a incubação, 100 µl da solução de cada poço são transferidos para uma MTP nova. Esta MTP é lida a 405 nm usando um leitor de placas SpectraMax. Controles em branco assim como controles contendo uma pequena amostra de tecido e detergente, mas sem enzima também foram incluídos.

[000646] Em algumas modalidades, amostras de tecido pré-lavadas podem ser usadas. Este tipo de amostra é pré-lavada em água deionizada durante 20 minutos à temperatura ambiente. Após a etapa de pré-lavagem, as amostras são colocadas sobre toalhas de papel para secar. As amostras secas ao ar são, então, perfuradas usando uma matriz circular de 0,625 cm (1/4") em uma prensa de expulsão. Finalmente, duas amostras de tecido são colocadas verticalmente em cada poço de uma MTP de 96 poços para expor toda a área superficial (isto é, não são colocadas em posição horizontal no fundo do poço).

[000647] As amostras das variantes de protease a serem testadas são obtidas a partir de caldo de cultura filtrado das culturas cultivadas nas placas MTP. Os equipamentos usados são Biomek FX Robot (Beckman Coulter), leitor de placas SpectraMAX (tipo 340; Molecular Devices), incubadora/agitador iEMS (Thermo/Labsystems); MTPs de fundo F (Costar tipo 9017 usadas para ler as placas reação após a incubação); e MTPs de fundo V (Greiner 651101 usadas para pré-diluição do sobrenadante). Neste teste, as proteases hidrolisam o substrato e liberam pigmento e partículas insolúveis a partir do substrato. Desta forma, a taxa de turvação é uma medida da atividade enzimática.

[000648] O desempenho de remoção de manchas das serina proteases de referência e suas variantes nas pequenas amostras de tecido é determinado em uma escala de MTP em um detergente disponível para comercialização (Calgonit 5 em 1). As amostras de tecido CS-38 (gema de ovo com pigmento, envelhecida por aquecimento), obtidas junto à CFT Vlaardingen são usadas como substrato. Duas amostras são usadas por poço. Tabletes de ADW da Calgonit 5 em 1 são usados para preparar a solução detergente. Para inativar a atividade da protease presente nos tabletes, um tablete de 21 g é dissolvido em água Milli-Q aquecida em um banho-maria até uma temperatura de 60°C. A solução é resfriada até a temperatura ambiente e o volume de água é ajustado para 700 mL. A solução é diluída adicionalmente em água para atingir uma concentração final de 3 g/l. A dureza da água é ajustada para 21°GH pela adição de 1,46 ml da mistura de Ca/Mg (mistura de Ca/Mg [(3:1), 1,92 M de $\text{CaCl}_2 = 282,3 \text{ g/L}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,64 M de $\text{MgCl}_2 = 130,1 \text{ g/L}$ de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 256,500 ppm (15000 gpg)]. As amostras de enzima são pré-diluídas em NaCl 10 mM, CaCl_2 0,1 mM, 0,005% de solução de TWEEN®-80 e testadas nas concentrações adequadas.

[000649] A incubadora é ajustada para a temperatura desejada de 50°C. 72 µl de tampão de diluição são adicionados à placa de fundo V vazia (*isto é*, uma "placa de diluição") seguido de 8 µl de sobrenadante. 9 µl provenientes da placa diluição são adicionados às placas contendo as pequenas amostras de tecido incubadas em 171 µl de solução detergente. 9 µl provenientes da placa diluição são adicionados às placas contendo as pequenas amostras de tecido para fornecer uma diluição total de sobrenadante de 200X. A placa da amostra (com detergente e enzima) é coberta com fita e colocada na incubadora/agitador durante 30 minutos a 1400 rpm. Após a incubação, 75 µl da mistura de reação são transferidos para uma placa de fundo F vazia e a absorbância é lida em um leitor de MTP a 405 nm após remoção de bolhas com um secador de cabelo. Os controles em branco, contendo uma ou duas amostras de tecido e detergente sem a adição de amostras contendo protease de referência também são incluídos no teste.

[000650] O valor da absorbância obtido é corrigido para o valor em branco (substrato sem enzima), fornecendo uma medida da atividade hidrolítica. Para cada amostra (variante), o índice de desempenho é calculado. O índice de desempenho compara o desempenho da variante (valor real) e o de uma enzima padrão (valor teórico) na mesma concentração de proteína. Além disso, os valores teóricos podem ser calculados usando os parâmetros de uma equação de Langmuir da enzima padrão.

Manchas de gema de ovo em aço inoxidável

[000651] As folhas de aço inoxidável (10 x 15 cm; escovadas de um dos lados) usadas nestes experimentos são cuidadosamente lavadas a 95°C em uma lava-louças laboratorial com um detergente comercial com alta alcalinidade (por exemplo, detergente ECOLAB®; Henkel) para fornecer folhas limpas e sem gordura. As rebarbas destas são folhas removidas antes do primeiro uso. As folhas são secas durante

30 minutos a 80°C em um gabinete térmico antes de serem sujas com gema de ovo. As superfícies que serão pinceladas não são tocadas antes de serem sujas. Além disso, não são permitidas manchas de água ou penugens sobre as superfícies. As folhas resfriadas são pesadas antes de serem sujas.

[000652] As gemas de ovo são preparadas por separar as gemas de aproximadamente 10 a 11 ovos (200 g de gema de ovo) das claras. As gemas são agitadas com um garfo em um béquer de vidro para homogeneizar a suspensão de gemas. As gemas são, então, peneiradas (aproximadamente (malha de aproximadamente 0,5 mm) para remover partículas grosseiras e quaisquer fragmentos da casca do ovo.

[000653] Um pincel plano 6,35 cm (2,5") é usado para aplicar $1,0 \pm 0,1$ g de suspensão de gema de ovo da forma mais uniforme possível sobre uma área de 140 cm² sobre os lados escovados de cada uma das folhas de aço inoxidável, deixando uma margem limpa de aproximadamente 1 cm de largura (fita adesiva é usada, se necessário). As folhas sujas são secas horizontalmente (para evitar a formação de gotículas sobre as bordas das folhas), à temperatura ambiente durante 4 horas (máx. 24 h).

[000654] Para desnaturação, as folhas são imersas durante 30 segundos em água desmineralizada fervente (usando um dispositivo de retenção, se necessário). A seguir, as folhas são secas novamente durante 30 min a 80°C. Após secagem e resfriamento, as folhas são pesadas. Após a pesagem, as folhas são reservadas por pelo menos 24 horas (20°C, 40 a 60% de umidade relativa) antes de serem submetidas ao teste de lavagem. De modo a satisfazer os requisitos do teste, apenas as folhas com 500 ± 100 mg/140 cm² (gema de ovo após desnaturação), são usadas no teste. Após os testes de lavagem serem conduzidos, as folhas são secas durante 30 min a 80°C no gabinete térmico e pesadas novamente após o resfriamento. O percentual de

desempenho de limpeza é determinado por dividir (mg de gema de ovo liberados pela lavagem x 100) por (mg de gema de ovo desnaturada aplicados).

Carne moída sobre pratos de porcelana

[000655] Para estes experimentos, pratos de sobremesa (porcelana branca vitrificada Arzberg) que se adequam à norma EN 50242, forma 1495, nº 0219, 19 cm de diâmetro são usados. Um total de 225 g de carne magra de porco e de boi (50% de cada) são finamente cortadas e resfriadas, após remoção da gordura visível. A mistura é passada duas vezes por um moedor. Temperaturas acima de 35°C são evitadas. A seguir, 225 g da carne moída são misturados com 75 g de ovo (clara e gema misturadas). A preparação é então congelada por até três meses a -18°C, antes do uso. Se carne de porco não estiver disponível, carne bovina é usada.

[000656] A mistura de carne moída e ovo (300 g) é levada até a temperatura ambiente e misturada com 80 ml de água sintética. A mistura é então homogeneizada usando um misturador de cozinha manual durante 2 minutos. A seguir, um garfo é usado para espalhar 3 g da mistura de carne/ovo/água sobre cada prato de porcelana branca, deixando uma margem limpa de aproximadamente 2 cm em torno da borda. A quantidade aplicada é de $11,8 \pm 0,5 \text{ mg/cm}^2$. Os pratos são secos durante 2 horas a 120°C em um gabinete térmico pré-aquecido. Assim que os pratos estiverem frios, eles estão prontos para uso. Os pratos são empilhados com toalhas de papel entre eles.

[000657] Após a lavagem, os pratos são pulverizados com solução de ninidrina (1% de etanol) para melhor identificação dos resíduos de carne moída. Para promover a reação da cor, os pratos são aquecidos durante 10 minutos a 80°C no gabinete térmico. A avaliação do desempenho de lavagem é feita por inspecionar visualmente as reações de cor dos resíduos de carne moída comparando com o catálogo foto-

gráfico IKW (IKW).

Manchas de ovo/leite em aço inoxidável

[000658] As folhas de aço inoxidável (10 x 15 cm; escovadas de um dos lados) usadas nestes experimentos são cuidadosamente lavadas a 95°C em uma lava-louças laboratorial com um detergente comercial com alta alcalinidade para remover gordura e limpar as folhas. As folhas são polidas a seco com um pano de celulose. As superfícies que serão pinceladas não são tocadas antes de serem sujas. Além disso, não são permitidas manchas de água ou penugens sobre as superfícies. Antes de serem sujas, as folhas são colocadas em um gabinete térmico a 80°C, durante 30 min. As folhas resfriadas são pesadas antes de serem sujas.

[000659] As gemas e claras de ovo de ovos crus inteiros (3 a 4 ovos; 160 g/ovo) são colocadas em uma vasilha e batidas com um batedor de ovos. A seguir, 50 ml de leite UHT semidesnatado (1,5% de gordura, ultra-alta temperatura, homogeneizado) são adicionados à mistura. O leite e o ovo são misturados sem gerar espuma. Um pincel plano é usado para distribuir uniformemente $1,0 \pm 0,1$ g da mistura de ovo/leite sobre o lado escovado das folhas de aço inoxidável, usando uma balança para verificar a distribuição. Uma margem de aproximadamente 1,0 cm é deixada em torno dos lados curtos das folhas. As folhas sujas são secas horizontalmente (para evitar a formação de gotículas sobre as bordas das folhas), à temperatura ambiente durante 4 horas (máx. 24 h).

[000660] As folhas são então imersas durante 30 segundos em água desmineralizada fervente (usando um dispositivo de retenção, se necessário). A seguir, as folhas são secas novamente durante 30 min a 80°C. Após secagem e resfriamento, as folhas são pesadas. Após a pesagem, as folhas são reservadas por pelo menos 24 horas (20°C, 40 a 60% de umidade relativa) antes de serem submetidas ao teste de lavagem. De

modo a satisfazer os requisitos do teste, apenas as folhas com 190 ± 10 mg de gema de ovo são usadas.

[000661] Após os testes de lavagem serem conduzidos, as folhas são secas durante 30 min a 80°C no gabinete térmico e pesadas novamente após o resfriamento. O percentual de desempenho de limpeza é determinado por dividir (mg de ovo/leite liberados pela lavagem x 100) por (mg de ovo/leite aplicados).

Preparação da mancha de mistura de espaguete sobre pratos de porcelana

[000662] Molho de macarrão (390 g) é misturado com 150 g de macarrão espaguete cozido, 25 g de carne moída (composição IKW aprimorada- uma combinação de 225 gramas de carne moída sem gordura e 75 gramas de gema de ovo) e 50 g de queijo Grozette Formaggio. Uma colher é usada para espalhar 3 g desta mistura sobre cada prato de porcelana branca (porcelana vitrificada branca com 19 cm de diâmetro, Arzberg, em conformidade com a norma EN 50242, forma 1495, nº 0219) deixando uma margem limpa de aproximadamente 2 cm em torno da borda. Os pratos são secos aquecimento durante 2 horas a 120°C em um forno. Assim que os pratos estiverem frios, eles estão prontos para uso. Os pratos são empilhados com toalhas de papel entre eles para serem armazenados. Após a lavagem, os pratos são pulverizados com solução de iodo (0,05 N) para melhor identificação dos resíduos de carboidrato. A avaliação do desempenho da lavagem é feita por inspecionar visualmente as reações de cor dos resíduos de carboidrato comparando com o catálogo fotográfico IKW (IKW) e é classificada em uma escala de 0 a 10 (10 sendo limpo).

Índice de desempenho

[000663] O índice de desempenho compara o desempenho da variante (valor medido) e o de uma enzima padrão (valor teórico) na mesma concentração de proteína. Além disso, os valores teóricos podem

ser calculados usando os parâmetros de uma curva dose-resposta de desempenho da protease padrão.

Exemplo 2

Geração de mutantes únicos de GG36 usando bibliotecas de avaliação de sítio (SELS)

[000664] A construção das SELs de GG36 descritas neste exemplo foi feita pela GENEART usando seus métodos patenteados e plataforma de tecnologia para otimização gênica, síntese de genes, geração e análise bibliotecas (WO 2004/059556A3, patentes europeias n°s 0 200 362 e 0 201 184; e Patentes US N°s 4.683.195, 4.683.202 e 6.472.184). As SELs de GG36 foram produzidas nas posições pré-selecionadas pelos inventores usando o plasmídio de expressão pHPLT-GG36 de *B. subtilis* (*vide* figura 2). Este plasmídio de expressão de *B. subtilis* contém o cassete de expressão de GG36 mostrado abaixo, o promotor LAT (Plat) de *B. licheniformis*, e elementos adicionais de pUB110 (McKenzie et al., Plasmid, 15:93-103, 1986) incluindo um gene de replicase (reppUB), um gene de resistência à neomicina/canamicina (neo) e um marcador de resistência à bleomicina (bleo) (figura 4 na patente US 6.566.112). O mapa do plasmídio pHPLT-GG36 é fornecido na figura 2. A sequência do cassete de expressão de GG36 é fornecida abaixo.

[000665] A sequência de DNA de GG36 (a sequência de sinal é mostrada em letras minúsculas, o pró-peptídeo em letras minúsculas sublinhadas, e a sequência madura de GG36 em letras maiúsculas) é fornecida abaixo:

Gtgagaagcaaaaaattgtggatcgtcgcgtcgaccgcactactcatttctgttgctttcag-
ttcatcgcgcgcgcgtgctgaagaagcaaaaagaaaaatatttaattggccttaatgag-
caggaagctgtcagtgagttttagaacaagtagaggcaaatgacgaggtcgccatt-
ctctctgaggaagaggaagtcgaaattgaattgcttcattgaattgaaacgattcctgttt-
tatccgttgagttaagcccagaagatgtggacgcgcttgagctcgatccagcgatttctta-

tattgaagaggatgcagaagtaacgacaatgGCGCAATCAGTGCCATGGGGA-
 ATTAGCCGTGTGCAAGCCCCAGCTGCCCATAACCGTGGATTGA-
 CAGGTTCTGGTGTAAGAGTTGCTGTCCTCGATACAGGTATTT-
 CCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTTGTAC-
 CAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGCATGGCACG-
 CATGTGGCCGGGACGATTGCTGCTTTAAACAATTCGATTGGCG-
 TTCTTGGCGTAGCGCCGAGCGCGGAAGTATACGCTGTAAAGTA-
 TTAGGGGCGAGCGGTTTCAGGTTTCGGTCAGCTCGATTGCCCAAG-
 GATTGGAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTTGCTAA-
 TTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCAAGTGCCACACTTGAGCAAG-
 CTGTTAATAGCGCGACTTCTAGAGGCGTTCTTGTTGTAGCGG-
 CATCTGGAAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCCGT-
 TATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGACCAAAACAA-
 CAACCGCGCCAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGGCTTGACATTG-
 TCGCACCAGGTGTAAACGTGCAGAGCACATACCCAGGTTCAACG-
 TATGCCAGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTG-
 CAGGTGCAGCAGCCCTTGTTAAACAAAAGAACCCATCTTGG-
 TCCAATGTACAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACGAG-
 CTTAGGAAGCACGAACCTTGATGGAAGCGGACTTGTCAATGCA-
 GAAGCTGCAACTCGTTAA (SEQ ID NO:3)

[000666] A sequência de proteína de GG36 (a sequência de sinal é mostrada em letras minúsculas, o pró-peptídeo em letras minúsculas sublinhadas, e a sequência madura da protease GG36 em letras maiúsculas) é fornecida abaixo:

vrskklwivastallisvafsssiassaaeeeakekyligfneqeavsefveqveandevail-
seeeeveieillhefetipvlsvelspedvdaleldpaisyieedaevttmAQSVPWGIS-
 RVQAPAAHNRGLTGSQVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFV-
 PGEPTQDGNGHGHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVL-
 GASGSGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSPSPSATLEQAVN-
 SATSRGVLVVAASGNSGAGSISYPARYANAMAVGATDQNNNRAS-

FSQYGAGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVA-GAAALVKQKNPSWSNVQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR (SEQ ID NO:4).

[000667] O método de mutagênese se baseou na abordagem de mutação códon-específica na qual todas as possíveis substituições de aminoácido são criadas simultaneamente em um códon específico de interesse usando iniciadores mutagênicos senso e antissenso que contêm um códon degenerado, NNS ((A,C,T ou G), (A,C,T ou G), (C ou G)) no sítio de interesse. Para construir cada uma das SELs de GG36, três reações de PCR foram feitas: duas reações de mutagênese (PCR1 e PCR2 primárias) para introduzir o códon mutado de interesse na sequência de DNA de GG36 madura usando os iniciadores mutagênicos NNS senso e antissenso (25 a 45 nucleotídeos de extensão), e uma terceira reação para fundir os dois produtos de PCR mutagênicos juntos para construir o vetor de expressão pHPLT-GG36 que tem os códons mutados desejados na sequência madura de GG36.

[000668] As sequências dos iniciadores usados neste exemplo são fornecidas abaixo.

Tabela 2-1. Iniciadores	
Sequência	Nome do iniciador
CGCGCTT GAGCT CGATCCAGCGATTTC (SEQ ID NO:9)	SacI-Fw
GTCTCCA AGCTT TAACGAGTTGCAG (SEQ ID NO:10)	HindIII-Rv
GCAATTC AGATCT TCCTTCAGGTTATGACC (SEQ ID NO:11)	pHPLT-BglII-Fw
GCATCGA AGATCT GATTGCTTAACTGCTTC (SEQ ID NO:12)	pHPLT-BglII-Rv

[000669] A DNA polimerase de alta fidelidade Phusion (nº de catálogo da Finnzymes F-530L) foi usada para todas as reações de PCR, e as reações foram executadas de acordo com os protocolos do fabricante que foram fornecidos com a polimerase. Em particular, para a PCR 1 primária, 1 µL de (10 µM) de cada iniciador, iniciador pHPLT-

BglII-Fw e iniciador de mutagênese antissenso NNS, foi usado, e para a PCR 2 primária, 1 µL (10 µM) do iniciador pHPLT-BglII-Rv e um iniciador senso de mutagênese NNS foi usado. Cada reação também incluiu 1 µL do DNA molde do plasmídio pHPLT-GG36 (0,1 a 1 ng/ µL). As PCRs foram feitas usando um termociclador MJ Research PTC-200 Peltier. As reações geraram dois fragmentos de aproximadamente 2 a 3 kb tendo uma sobreposição de aproximadamente 30 nucleotídeos em torno do códon GG36 de interesse. Os fragmentos obtidos foram fundidos em uma terceira reação de PCR similar às descritas acima usando 1 µL da mistura de reação da PCR 1 primária, 1 µL da mistura de reação da PCR 2 primária e 1 µL (10 µM) de cada um dos iniciadores senso e antissenso *SacI*-Fw e *HindIII*-Rv. O fragmento linear de 859 bp amplificado que codifica o gene da variante de GG36 foi purificado (usando o kit de purificação de PCR Qiaquick QIAGEN®) e digerido com as enzimas de restrição *SacI* e *HindIII* para criar extremidades coesivas em ambos os lados do fragmento de fusão. Cerca de 50 ng do plasmídio pHPLT-GG36 também foram purificados após digestão com *SacI* e *HindIII*, resultando em um fragmento da cadeia principal do vetor de 3,9 kb. O fragmento do vetor digerido foi ligado com 50 ng do fragmento de 859 bp digerido que codifica a enzima variante usando a DNA ligase T4 (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante para clonar as extremidades coesivas. Subsequentemente, a mistura de ligação foi usada para transformar células de *B. subtilis* ($\Delta aprE$, $\Delta nprE$, $oppA$, $\Delta spoII E$, $degU Hy32$, $\Delta amyE::[xylR, pxylA-comK]$) conforme descrito (WO 2002/014490).

[000670] Para expressar as proteínas variantes para análises bioquímicas adicionais, as cepas de *B. subtilis* carregando os plasmídios com a variante GG36 foram inoculados em placas de microtitulação contendo 150 µl de caldo Luria suplementado com 10 µg/ml de neomicina. As placas foram cultivadas de um dia para o outro a 37°C com agitação a 300

rpm e 80% de umidade com o uso de tampas EnzyScreen para placas de microtitulação (EnzyScreen). Dez microlitros provenientes da placa de cultura de um dia para o outro foram usados para 190 µl inocular uma nova placa de microtitulação contendo de meio MBD (um meio definido à base de MOPS) com 10 µg/ml de neomicina. O meio MBD foi preparado essencialmente conforme conhecido na técnica (vide Neidhardt *et al.*, J. Bacteriol., 119: 736-747 [1974]), exceto que NH_4Cl_2 , FeSO_4 , e CaCl_2 foram omitidos do meio base, K_2HPO_4 3 mM foi usado, e o meio base foi suplementado com ureia 60 mM, e 100 ml de uma solução feita de 210 g/L de glicose, e 350 g/L de maltodextrina. Os micronutrientes foram supridos como uma solução de estoque 100X contendo em um litro, 400 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mg de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 10 ml de CaCl_2 1M, e 10 ml de citrato de sódio 0,5 M. As placas de microtitulação contendo meio MBD foram cultivadas por 68 horas a 37°C, 300 rpm e 80% de umidade usando tampas EnzyScreen (EnzyScreen) para determinar a expressão de proteína. No dia seguinte, as culturas foram filtradas através de uma placa de microfiltro (0,22 µm; Millipore) e o filtrado resultante foi usado para análise bioquímica. Os testes nas amostras de TCA e SLT para as composições detergentes 7 a 11 foram executados conforme descrito no Exemplo 1. Os índices de desempenho também foram calculados conforme descrito na descrição do teste SLT no Exemplo 1, e eles são mostrados na Tabela 2-2 com relação a GG36. Nas tabelas a seguir, as composições detergentes ("Det.") correspondem àquelas mostradas na Tabela D, acima. Além disso, conforme indicado, a posição do aminoácido é mencionada de acordo com a numeração de BPN'.

Tabela 2-2. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 com relação a GG36 no teste de limpeza de amostras com TCA ou SLT a 16°C nos detergentes 7 a 11.

Posição de aminoácido de GG36 (numeração de acordo com BPN')	Resíduo selvagem	Resíduo mutante
1	A	R
2	Q	A
2	Q	R
2	Q	S
2	Q	M
2	Q	W
3	S	R
4	V	R
4	V	S
4	V	C
8	I	A
9	S	W
9	S	F
9	S	A
10	R	A
10	R	M
10	R	S
10	R	H
12	Q	F
12	Q	R
14	P	F
14	P	K
14	P	Q
15	A	R
15	A	F

Tabela 2-2. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 com relação a GG36 no teste de limpeza de amostras com TCA ou SLT a 16°C nos detergentes 7 a 11.

16	A	S
17	H	R
17	H	F
17	H	M
18	N	R
18	N	K
20	G	R
20	G	K
20	G	F
22	T	R
22	T	Q
22	T	L
22	T	V
22	T	W
22	T	Y
22	T	A
23	G	A
23	G	S
23	G	F
24	S	R
24	S	W
24	S	H
24	S	L
24	S	Q
24	S	F
25	G	R
25	G	F
25	G	V
26	V	F

Tabela 2-2. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 com relação a GG36 no teste de limpeza de amostras com TCA ou SLT a 16°C nos detergentes 7 a 11.

27	K	R
27	K	L
27	K	V
27	K	F
28	V	A
28	V	E
28	V	N
29	A	T
30	V	E
31	L	F
33	T	S
33	T	G
33	T	D
34	G	P
35	I	M
36	S	T
36	S	F
36	S	R
38	T	R
38	T	F
38	T	L
40	P	H
40	P	W
40	P	R
40	P	N
40	P	T
40	P	L
42	L	I
43	N	R

Tabela 2-2. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 com relação a GG36 no teste de limpeza de amostras com TCA ou SLT a 16°C nos detergentes 7 a 11.

43	N	A
43	N	S
43	N	W
43	N	F
43	N	I
43	N	D
43	N	M
45	R	T
46	G	R
48	A	R
50	F	C
51	V	W
51	V	F
51	V	H
52	P	F
52	P	N
52	P	E
55	P	Y
57	T	R
59	Q	A
59	Q	F
59	Q	R
60	D	P
60	D	A
60	D	Q
62	N	Q
62	N	E
63	G	S
63	G	A

Tabela 2-2. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 com relação a GG36 no teste de limpeza de amostras com TCA ou SLT a 16°C nos detergentes 7 a 11.

63	G	M
63	G	V
63	G	T
63	G	H
63	G	Q
63	G	I
63	G	D
63	G	E
63	G	P
64	H	F
64	H	T
68	V	A
68	V	C
69	A	N
69	A	T
69	A	W
69	A	P
71	T	G
72	I	C
74	A	C
75	L	R
75	L	A
75	L	E
75	L	F
78	S	R
78	S	I
78	S	N
79	I	Q
79	I	W

Tabela 2-2. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 com relação a GG36 no teste de limpeza de amostras com TCA ou SLT a 16°C nos detergentes 7 a 11.

81	V	R
82	L	R
82	L	T
82	L	M
82	L	F
82	L	V
85	A	M
86	P	W
86	P	I
86	P	L
89	E	P
89	E	W
89	E	T
89	E	I
89	E	H
89	E	V
89	E	F
89	E	L
89	E	W
89	E	G
91	Y	F
91	Y	N
92	A	F
94	K	N
99	S	F
99	S	T
99	S	M
99	S	G
99	S	P

Tabela 2-2. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 com relação a GG36 no teste de limpeza de amostras com TCA ou SLT a 16°C nos detergentes 7 a 11.

100	G	I
100	G	S
100	G	N
100	G	Q
101	S	N
101	S	G
101	S	T
101	S	A
101	S	D
101	S	F
101	S	D
101	S	E
101	S	P
102	G	A
102	G	N
102	G	T
102	G	E
102	G	H
103	S	N
103	S	G
103	S	D
104	V	L
104	V	I
104	V	E
104	V	D
105	S	T
105	S	Q
105	S	E
106	S	V

Tabela 2-2. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 com relação a GG36 no teste de limpeza de amostras com TCA ou SLT a 16°C nos detergentes 7 a 11.

106	S	G
106	S	T
106	S	A
106	S	E
106	S	D
106	S	F
107	I	F
107	I	M
108	A	I
108	A	G
109	Q	M
111	L	V
111	L	I
112	E	V
112	E	L
112	E	Q
114	A	G
115	G	R
115	G	K
116	N	L
116	N	A
116	N	K
117	N	F
118	G	I
118	G	R
119	M	C
120	H	A
120	H	F
120	H	R

Tabela 2-2. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 com relação a GG36 no teste de limpeza de amostras com TCA ou SLT a 16°C nos detergentes 7 a 11.

121	V	E
121	V	F
123	N	G
123	N	E
124	L	S
128	S	N
128	S	M
128	S	H
128	S	Q
128	S	I
128	S	F
128	S	L
128	S	D
129	P	E
132	S	A
132	S	E
138	A	G
144	S	R
147	V	L
148	L	I
158	A	E
159	G	C
159	G	E
160	S	D
166	S	E
166	S	D
167	Y	W
175	M	V
177	V	C

Tabela 2-2. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 com relação a GG36 no teste de limpeza de amostras com TCA ou SLT a 16°C nos detergentes 7 a 11.

181	D	A
182	Q	R
183	N	D
183	N	R
183	N	I
183	N	F
183	N	M
185	N	I
185	N	E
185	N	V
186	R	H
186	R	K
188	S	R
188	S	E
188	S	D
192	Y	W
192	Y	H
194	A	V
194	A	F
194	A	E
197	D	F
198	I	L
198	I	F
203	V	E
203	V	C
208	T	S
209	Y	N
209	Y	S
209	Y	F

Tabela 2-2. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 com relação a GG36 no teste de limpeza de amostras com TCA ou SLT a 16°C nos detergentes 7 a 11.

209	Y	T
209	Y	H
209	Y	L
209	Y	G
209	Y	E
210	P	V
210	P	R
210	P	L
211	G	R
211	G	Q
212	S	I
212	S	F
212	S	M
213	T	A
214	Y	F
215	A	F
215	A	N
215	A	H
215	A	E
215	A	D
216	S	F
216	S	A
217	L	E
217	L	N
217	L	D
218	N	P
218	N	E
218	N	D
224	T	A

Tabela 2-2. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 com relação a GG36 no teste de limpeza de amostras com TCA ou SLT a 16°C nos detergentes 7 a 11.

224	T	G
227	V	I
230	A	E
231	A	I
231	A	C
233	L	C
234	V	F
235	K	F
236	Q	N
236	Q	F
238	N	R
238	N	K
238	N	L
239	P	R
239	P	S
239	P	R
239	P	H
239	P	N
239	P	K
239	P	T
239	P	F
239	P	G
240	S	R
241	W	R
242	S	R
242	S	L
243	N	R
243	N	F
244	V	R

Tabela 2-2. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 com relação a GG36 no teste de limpeza de amostras com TCA ou SLT a 16°C nos detergentes 7 a 11.

246	I	S
248	N	I
248	N	V
248	N	R
249	H	R
249	H	T
250	L	I
251	K	R
251	K	S
252	N	R
252	N	F
252	N	H
252	N	I
253	T	R
253	T	F
253	T	I
254	A	C
256	S	N
258	G	R
260	T	V
260	T	I
262	L	H
262	L	D
263	Y	F
265	S	F
267	L	N
267	L	M
267	L	V
269	N	R

Tabela 2-2. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 com relação a GG36 no teste de limpeza de amostras com TCA ou SLT a 16°C nos detergentes 7 a 11.

269	N	I
270	A	C
271	E	T
271	E	V
271	E	L
271	E	H
271	E	F
271	E	P
271	E	A
271	E	M
271	E	I
272	A	F
272	A	R
273	A	I
273	A	F
274	T	G

Tabela 2-3. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 1,5 com relação a GG36 no teste de limpeza de amostras com SLT a 32°C no detergente 7.

Variante de GG36
N62E
A158E
G159E

Tabela 2-4. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 1,2 em relação a GG36 no teste de limpeza de amostra com SLT a 32°C no detergente 10.

Variante de GG36
A1R
S78R
V244R
N269R
E271L

Exemplo 3

Construção e desempenho de limpeza dos grupos NHJ1 e WCE1 de variantes de GG36

[000671] Os grupos NHJ1 e WCE1 de variantes de GG36 aqui descritos foram construídos na empresa DNA 2.0, Inc., usando o plasmídeo de expressão pHPLT-GG36 de *B. subtilis* descrito acima (figura 2). As variantes foram expressas em células de *B. subtilis* (genótipo: $\Delta aprE$, $\Delta nprE$, $amyE::xylRPxylAcomK-phleo$) conforme descrito no Exemplo 2, e foram caracterizadas adicionalmente usando o teste de TCA para determinação do teor de proteína, teste estabilidade em LAS/EDTA, e teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, conforme descrito no Exemplo 1. Estes resultados são mostrados nas Tabelas 3-1 e 3-2. Nas tabelas a seguir, as composições detergentes

("Det.") correspondem àquelas mostradas na Tabela D, acima. Além disso, conforme indicado, a posição do aminoácido é mencionada de acordo com a numeração de BPN'.

TABELA 3-1. Variantes de NHJ1 com índices de desempenho de pelo menos 0,25 em relação a GG36 em qualquer um dos testes de limpeza de TCA, estabilidade em LAS/EDTA, ou SLT a 16°C nos detergentes 7, 8 ou 9.	TABELA 3-1. Variantes de NHJ1 com índices de desempenho de pelo menos 0,25 em relação a GG36 em qualquer um dos testes de limpeza de TCA, estabilidade em LAS/EDTA, ou SLT a 16°C nos detergentes 7, 8 ou 9.
Variante de GG36 (numeração de acordo com BPN')	Variante de GG36 (numeração de acordo com BPN')
N062E-A158E	G159E-E271F
S103G-A158E	V104L-E271F
S128N-A158E	S101A-E271F
A016S-A158E	E089P-E271F
V104L-A158E	S128N-E271F
E089P-A158E	S103G-E271F
L111V-A158E	L148I-E271F
T022A-A158E	H249R-E271F
S101A-A158E	N062E-G159E
L148I-A158E	A016S-G159E
P129E-A158E	S128N-G159E
T022A-E089P	L148I-G159E
A016S-E089P	L111V-G159E
N062E-E089P	E089P-G159E
N062E-E271F	T022A-G159E
A158E-E271F	P129E-G159E
R186H-E271F	S103G-G159E
P129E-E271F	V104L-G159E
L111V-E271F	A158E-G159E
Y209E-E271F	S101A-G159E
A016S-E271F	A158E-H249R
S188D-E271F	L111V-H249R
T022A-E271F	P129E-H249R

TABELA 3-1. Variantes de NHJ1 com índices de desempenho de pelo menos 0,25 em relação a GG36 em qualquer um dos testes de limpeza de TCA, estabilidade em LAS/EDTA, ou SLT a 16°C nos detergentes 7, 8 ou 9.	TABELA 3-1. Variantes de NHJ1 com índices de desempenho de pelo menos 0,25 em relação a GG36 em qualquer um dos testes de limpeza de TCA, estabilidade em LAS/EDTA, ou SLT a 16°C nos detergentes 7, 8 ou 9.
Variante de GG36 (numeração de acordo com BPN')	Variante de GG36 (numeração de acordo com BPN')
N062E-H249R	P129E-L148I
A016S-H249R	V104L-L148I
R186H-H249R	S103G-L148I
L148I-H249R	S128N-L148I
G159E-H249R	S101A-L148I
S101A-H249R	E089P-L148I
S188D-H249R	L111V-L148I
V104L-H249R	A016S-N062E
Y209E-H249R	T022A-N062E
T022A-H249R	N062E-P129E
S128N-H249R	T022A-P129E
S103G-H249R	S128N-P129E
E089P-H249R	A016S-P129E
T022A-L111V	S101A-P129E
S101A-L111V	V104L-P129E
A016S-L111V	E089P-P129E
V104L-L111V	S103G-P129E
N062E-L111V	L111V-P129E
S103G-L111V	N062E-R186H
E089P-L111V	S128N-R186H
A016S-L148I	S101A-R186H
N062E-L148I	T022A-R186H
T022A-L148I	A016S-R186H

TABELA 3-1. Variantes de NHJ1 com índices de desempenho de pelo menos 0,25 em relação a GG36 em qualquer um dos testes de limpeza de TCA, estabilidade em LAS/EDTA, ou SLT a 16°C nos detergentes 7, 8 ou 9.	TABELA 3-1. Variantes de NHJ1 com índices de desempenho de pelo menos 0,25 em relação a GG36 em qualquer um dos testes de limpeza de TCA, estabilidade em LAS/EDTA, ou SLT a 16°C nos detergentes 7, 8 ou 9.
Variante de GG36 (numeração de acordo com BPN')	Variante de GG36 (numeração de acordo com BPN')
A158E-R186H	S103G-S128N
E089P-R186H	L111V-S128N
P129E-R186H	L111V-S188D
G159E-R186H	N062E-S188D
S103G-R186H	A016S-S188D
V104L-R186H	L148I-S188D
L111V-R186H	T022A-S188D
L148I-R186H	S128N-S188D
N062E-S101A	S101A-S188D
T022A-S101A	V104L-S188D
A016S-S101A	E089P-S188D
E089P-S101A	P129E-S188D
N062E-S103G	G159E-S188D
T022A-S103G	R186H-S188D
A016S-S103G	S103G-S188D
S101A-S103G	A158E-S188D
E089P-S103G	A016S-T022A
N062E-S128N	A016S-V104L
A016S-S128N	T022A-V104L
T022A-S128N	S101A-V104L
S101A-S128N	N062E-V104L
V104L-S128N	S103G-V104L
E089P-S128N	E089P-V104L

TABELA 3-1. Variantes de NHJ1 com índices de desempenho de pelo menos 0,25 em relação a GG36 em qualquer um dos testes de limpeza de TCA, estabilidade em LAS/EDTA, ou SLT a 16°C nos detergentes 7, 8 ou 9.
Variante de GG36 (numeração de acordo com BPN')
G159E-Y209E
L111V-Y209E
S101A-Y209E
A016S-Y209E
S128N-Y209E
L148I-Y209E
P129E-Y209E
N062E-Y209E
T022A-Y209E
S103G-Y209E
A158E-Y209E
S188D-Y209E
V104L-Y209E
E089P-Y209E
R186H-Y209E
GG36

TABELA 3-2. Variantes de WCE1 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 em relação a GG36 em qualquer um dos testes de limpeza de TCA, estabilidade em LAS/EDTA, ou SLT a 16°C nos detergentes 10 ou 11.
variante de GG36 (numeração de acordo com BPN')
N018R-W241R
G020R-W241R
S024R-W241R
S009A-W241R
G020R-W241R
V004R-W241R
N043R-W241R
S078R-W241R
T022R-W241R
G115R-W241R
A001R-W241R
S212F-W241R
L082R-W241R
N018R-V244R
S024R-V244R
S078R-V244R
G020R-V244R
S212F-V244R
S009A-V244R
L082R-V244R
A001R-V244R
N043R-V244R
T022R-V244R

TABELA 3-2. Variantes de WCE1 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 em relação a GG36 em qualquer um dos testes de limpeza de TCA, estabilidade em LAS/EDTA, ou SLT a 16°C nos detergentes 10 ou 11.
variante de GG36 (numeração de acordo com BPN')
V004R-V244R
G115R-V244R
W241R-V244R
S242R-V244R
A001R-V004R
S009A-T022R
N018R-T022R
G020R-T022R
V004R-T022R
A001R-T022R
S024R-S242R
N018R-S242R
V004R-S242R
G020R-S242R
S212F-S242R
L082R-S242R
S078R-S242R
A001R-S242R
S009A-S242R
T022R-S242R
G115R-S242R
N043R-S242R
W241R-S242R

TABELA 3-2. Variantes de WCE1 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 em relação a GG36 em qualquer um dos testes de limpeza de TCA, estabilidade em LAS/EDTA, ou SLT a 16°C nos detergentes 10 ou 11.
variante de GG36 (numeração de acordo com BPN')
N018R-S212F
T022R-S212F
V004R-S212F
S024R-S212F
A001R-S212F
G115R-S212F
G020R-S212F
S009A-S212F
N043R-S212F
S078R-S212F
L082R-S212F
S009A-S078R
G020R-S078R
S024R-S078R
T022R-S078R
N018R-S078R
V004R-S078R
A001R-S078R
N043R-S078R
T022R-S024R
G020R-S024R
N018R-S024R
A001R-S024R

TABELA 3-2. Variantes de WCE1 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 em relação a GG36 em qualquer um dos testes de limpeza de TCA, estabilidade em LAS/EDTA, ou SLT a 16°C nos detergentes 10 ou 11.
variante de GG36 (numeração de acordo com BPN')
V004R-S024R
S009A-S024R
V004R-S009A
A001R-S009A
S242R-N269R
S024R-N269R
G020R-N269R
T022R-N269R
H249R-N269R
S212F-N269R
N043R-N269R
V244R-N269R
A001R-N269R
N018R-N269R
S078R-N269R
S009A-N269R
G115R-N269R
W241R-N269R
V004R-N269R
L082R-N269R
N018R-N043R
G020R-N043R
V004R-N043R

TABELA 3-2. Variantes de WCE1 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 em relação a GG36 em qualquer um dos testes de limpeza de TCA, estabilidade em LAS/EDTA, ou SLT a 16°C nos detergentes 10 ou 11.
variante de GG36 (numeração de acordo com BPN')
T022R-N043R
S009A-N043R
A001R-N043R
S024R-N043R
S009A-N018R
V004R-N018R
A001R-N018R
S024R-L082R
S009A-L082R
N018R-L082R
A001R-L082R
S078R-L082R
G020R-L082R
T022R-L082R
V004R-L082R
N043R-L082R
N043R-H249R
G020R-H249R
V004R-H249R
N018R-H249R
S009A-H249R
S212F-H249R
T022R-H249R

TABELA 3-2. Variantes de WCE1 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 em relação a GG36 em qualquer um dos testes de limpeza de TCA, estabilidade em LAS/EDTA, ou SLT a 16°C nos detergentes 10 ou 11.
variante de GG36 (numeração de acordo com BPN')
S024R-H249R
G115R-H249R
A001R-H249R
L082R-H249R
S242R-H249R
W241R-H249R
V244R-H249R
S078R-H249R
N018R-G115R
G020R-G115R
T022R-G115R
S078R-G115R
S009A-G115R
V004R-G115R
A001R-G115R
L082R-G115R
N043R-G115R
S024R-G115R
S009A-G020R
N018R-G020R
V004R-G020R
A001R-G020R
S009A-E271L

TABELA 3-2. Variantes de WCE1 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 em relação a GG36 em qualquer um dos testes de limpeza de TCA, estabilidade em LAS/EDTA, ou SLT a 16°C nos detergentes 10 ou 11.
variante de GG36 (numeração de acordo com BPN')
G020R-E271L
S024R-E271L
V244R-E271L
W241R-E271L
N043R-E271L
T022R-E271L
H249R-E271L
S212F-E271L
G115R-E271L
S242R-E271L
S078R-E271L
V004R-E271L
N269R-E271L
A001R-E271L
N018R-E271L
L082R-E271L
GG36

Exemplo 4

Construção e desempenho de limpeza do grupo NHJ4 de variantes de GG36

[000672] O grupo NHJ4 de variantes de GG36 descrito na Tabela 4-4 abaixo foi construído usando o plasmídio de expressão pHPLT-GG36 de *B. subtilis* (figura 2) usando fusão por PCR ou o kit de mutagênese

multi sítio-dirigida QUIKCHANGE® ("kit QCMS"; Stratagene) conforme descrito abaixo.

a) Construção das variantes de NHJ4 por mutagênese multi sítio-dirigida QUIKCHANGE®

[000673] As variantes criadas usando a mutagênese multi sítio-dirigida QUIKCHANGE® são mostradas na Tabela 4-4. O plasmídio original pHPLT-GG36 (DNA molde) foi metilado usando duas microgramas de DNA e Dam metilase (NEB), de acordo com as instruções do fabricante. Os mutantes sítio-dirigidos foram feitos por um kit de mutagênese multi sítio-dirigida QuikChange® ("kit QCMS"; Stratagene) de acordo com o protocolo do fabricante (*consulte*, Tabela 4-1 para as sequências iniciadoras). Para uma transformação eficaz de *B. subtilis*, o DNA das misturas da reação de QCMS foi amplificado por amplificação por círculo rolante (RCA) usando o kit Illustra Templiphi (GE Healthcare) e a reação foi executada de acordo com o protocolo do fabricante. Um microlitro de um DNA amplificado diluído dez vezes foi usado para transformar 50 µL de células de *B. subtilis* competentes (genótipo: Δ aprE, Δ nprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo). A mistura de transformação foi agitada a 37°C durante 1 hora. Alíquotas de dez microlitros da mistura de transformação foram plaqueadas sobre placas de ágar Luria com leite desnatado (1,6%) suplementado com 10 µg/ml de neomicina (Teknova). Subsequentemente, as colônias que produzem uma área clara (halo) sobre as placas com leite desnatado foram inoculadas em 120 µl de meio LB contendo 10 µg/mL de neomicina para extração do DNA plasmidial (kit QIAprep Spin Miniprep, Qiagen). Os plasmídios extraídos foram sequenciados para confirmar a presença das mutações desejadas.

Tabela 4-1. sequências iniciadoras usadas na construção das variantes de NHJ4		
Mutações introduzidas (numeração de acordo com BPN')	Nome do iniciador	sequência iniciadora (5'-fosforilada)
S101A S103G V104L	P5939	AAAGTATTAGGGGCGAGCGGTGCAGGTG- GACTTAGCTCGATTGCCCAAGGATTG (SEQ ID NO:13)
G159E	P5940	CATCTGGAAATTCAGGTGCAGAATCAATCA- GCTATCCGGCCCGTTA (SEQ ID NO:14)
T22A	P5941	CTGCCCATAACCGTGGATTGGCAGGTT- CTGGTGTAAGTTGCTG (SEQ ID NO:15)
Y209E	P5942	AGGTGTAAACGTGCAGAGCACAGAACCA- GGTTCAACGTATGCCAG (SEQ ID NO:16)
E271F	P5943	GAAGCGGACTTGTCAATGCATTGCTG- CAACTCGTTAAAGCTTG (SEQ ID NO:17)
S101A	P5944	AAAGTATTAGGGGCGAGCGGTGCAGGTT- CGGTCAGCTCGATTGCCCAA (SEQ ID NO:18)
S103G	P5945	TATTAGGGGCGAGCGGTTTCAGGTGGAGT- CAGCTCGATTGCCCAAGGA (SEQ ID NO:19)
L111V	P5946	GTCAGCTCGATTGCCCAAGGAGTAGAA- TGGGCAGGGAACAATGGCA (SEQ ID NO:20)
S128N	P5947	CGTTGCTAATTTGAGTTTAGGAAACCCTT- CGCCAAGTGCCCACTTGA (SEQ ID NO:21)
N62E	P5948	GAACCATCCACTCAAGATGGGGAAGGG- CATGGCACGCATGTG (SEQ ID NO:22)
S188D	P5949	ACCAAAACAACAACCGCGCCGACTTTTCA- CAGTATGGCGCAGGGCTT (SEQ ID NO:23)

b) Construção das variantes de NHJ4 por PCR de extensão

[000674] Dez mutantes combinatórios de GG36 foram criados por PCR de extensão. A lista de mutações introduzidas no plasmídeo pHPLT-GG36 e os iniciadores usados para esta finalidade são mostrados na Tabela 4-2. Para criar cada mutante, vários fragmentos (Ta-

bela 4-3) foram amplificados pelos iniciadores mostrados na Tabela 4-2. Cada reação de amplificação por PCR continha 30 pmol de cada iniciador e 100 ng do DNA molde, o plasmídio pHPLT-GG36. As amplificações foram executadas usando a Vent DNA polimerase (NEB). A reação de PCR (20 µL) foi inicialmente aquecida a 95°C durante 2,5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 15 s, anelamento a 55°C durante 15 s e extensão a 72°C durante 1 min. Após a amplificação, 2 a 4 fragmentos de PCR (Tabela 4-3) para cada variante foram purificados em gel usando um kit de purificação de bandas em gel QIAGEN® e misturados (50 ng de cada fragmento). Estas misturas serviram como moldes de DNA para PCR de extensão pelos iniciadores P5954 e P5955, para gerar os fragmentos do gene de extensão completa. As condições da PCR foram as mesmas descritas acima, com a exceção da fase de extensão, que foi executada a 72°C durante 2 minutos. O fragmento de DNA de extensão completa foi purificado em gel usando um kit de purificação de bandas em gel QIAGEN®, digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III e ligado com pHPLT-GG36, que foi digerido com as mesmas enzimas de restrição. Um microlitro das misturas de ligação foi amplificado usando amplificação por círculo rolante pelo kit Illustra Templiphi de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare) para gerar DNA multimérico para a transformação em *Bacillus subtilis*. Os produtos da amplificação por círculo rolante foram diluídos 100 vezes e usados para transformar células de *B. subtilis* (genótipo: Δ aprE, Δ nprE, amyE::xylIRPxylAcomK-phleo). Uma alíquota da mistura de transformação foi plaqueada sobre placas de meio LB contendo 1,6% de leite desnatado e 10 µg/mL de neomicina e a placa foi incubada de um dia para o outro a 37°C. Subsequentemente, as colônias com halos foram inoculadas em 120 µL de meio caldo Luria contendo 10 µg/mL de neomicina para extração do DNA plasmidial (kit QIAprep Spin Miniprep,

Qiagen). Os plasmídios extraídos foram sequenciados para confirmar a presença das mutações desejadas. As variantes criadas usando PCR de extensão são mostradas na Tabela 4-4.

TABELA 4-2. Lista dos iniciadores usados para a construção de variantes de NHJ4 com PCR de extensão

Mutação (numeração de acordo com BPN')	Nome do iniciador	Senso ou antissenso	Sequência iniciadora
	Flanqueador P5950	senso	CATATGAGTTATGCAGTTTGTAG (SEQ ID NO:24)
	Flanqueador P5951	antissenso	TGTTTTCTTGAATTGTGCTGT (SEQ ID NO:25)
	Flanqueador P5954	senso	CAGTTTGTAGAATGCAAAAAGTG (SEQ ID NO:26)
	Flanqueador P5955	antissenso	GACAAGGTAAAGGATAAAACAGC (SEQ ID NO:27)
T22A	P5956	senso	CATAACCGTGGATTGGCAGGTTCT GGTGTAAGAGTTGCTG (SEQ ID NO:28)
T22A	P5957	antissenso	ACTTTTACACCAGAACCTGCCAAT CCACGGTTATGGGCAG (SEQ ID NO:29)
N62E	P5958	senso	CACTCAAGATGGGGAAGGGCATG GCACGCATGTGG (SEQ ID NO:30)
N62E	P5959	antissenso	ATGCGTGCCATGCCCTTCCCCATC TTGAGTGGATGGTTC (SEQ ID NO:31)
S103G	P5960	senso	GCGAGCGGTTTCAGGTGGAGTCAG CTCGATTGCCCAAGGA (SEQ ID NO:32)
S103G	P5961	antissenso	TGGGCAATCGAGCTGACTCCACCT GAACCGCTCGCCCCTA (SEQ ID NO:33)
S103G L111V	P5962	senso	GTGGAGTCAGCTCGATTGCCCAAG GAGTAGAATGGGCAGGGAACAATGGCAT (SEQ ID NO:34)
S103G L111V	P5963	antissenso	CATTCTACTCCTTGGGCAATCGAG CTGACTCCACCTGAACCGCTCGCCCCTA (SEQ ID NO:35)
S101G S103A V104I	P5964	senso	GCGAGCGGTGGAGGTGCGATCAGCTC GATTGCCCAAGGATTG (SEQ ID NO:36)

TABELA 4-2. Lista dos iniciadores usados para a construção de variantes de NHJ4 com PCR de extensão

Mutação (numeração de acordo com BPN')	Nome do iniciador	Senso ou antissenso	Sequência iniciadora
S101G S103A V104I	P5965	antissenso	CTTGGGCAATCGAGCTGATCGCACCT CCACCGCTCGCCCCTAATACTTTA (SEQ ID NO:37)
S101A S103G V104L	P5966	senso	GCGAGCGGTGCAGGTGGACTTAGCTC GATTGCCCAAGGATTG (SEQ ID NO:38)
S101A S103G V104L	P5967	antissenso	CTTGGGCAATCGAGCTAAGTCCACCT GCACCGCTCGCCCCTAATACTTTA (SEQ ID NO:39)
S101A	P5968	senso	TATTAGGGGCGAGCGGTGCAGGTTTCGG TCAGCTCGATTGC (SEQ ID NO:40)
S101A	P5969	antissenso	ATCGAGCTGACCGAACCTGCACCGCTC GCCCCTAATACTTTA (SEQ ID NO:41)
S128N	P5970	senso	CTAATTTGAGTTTAGGAAACCCCTTCGC CAAGTGCCACACTT (SEQ ID NO:42)
S128N	P5971	antissenso	GCACTTGGCGAAGGGTTTCCTAAACTC AAATTAGCAACGTG (SEQ ID NO:43)
G159D	P5972	senso	GAAATTCAGGTGCAGACTCAATCAGCT ATCCGGCCCGTT (SEQ ID NO:44)
G159D	P5973	antissenso	GGATAGCTGATTGAGTCTGCACCTGAA TTCCAGATGC (SEQ ID NO:45)
G159E	P5974	senso	GAAATTCAGGTGCAGAATCAATCAGCT ATCCGGCCCGTT (SEQ ID NO:46)
G159E	P5975	antissenso	GGATAGCTGATTGATTCTGCACCTGAAT TTCCAGATGC (SEQ ID NO:47)
Y209E	P5976	senso	AACGTGCAGAGCACAGAACCAGGTTCA ACGTATGCCAGCTT (SEQ ID NO:48)
Y209E	P5977	antissenso	CATACGTTGAACCTGGTTCTGTGCTCTG CACGTTTACACC (SEQ ID NO:49)
L111V	P5978	senso	TCGATTGCCCAAGGAGTAGAATGGGCA GGGAACAATGGCAT (SEQ ID NO:50)
L111V	P5979	antissenso	CATTGTTCCCTGCCATTCTACTCCTTGG GCAATCGAGCTGAC (SEQ ID NO:51)

TABELA 4-3. Variantes combinatórias criadas por PCR de extensão			
Nº da variante	Variantes (numeração de acordo com BPN)	Fragmento	Fragmentos de PCR
NHJ4-1	S101G S103A V104I	1	P5950+P5965
		2	P5964+P5951
NHJ4-2	S101G S103A V104I G159D	3	P5950+P5965
		4	P5964+P5973
		5	P5972+P5951
NHJ4-3	S101A S103G V104L	6	P5950+P5967
		7	P5966+P5951
NHJ4-4	S101A S103G V104L G159E	8	P5950+P5967
		9	P5966+P5975
		10	P5974+P5951
NHJ4-5	S101A S103G V104L T22A	11	P5950+P5957
		12	P5956+P5967
		13	P5966+P5951
NHJ4-10	T22A S101A Y209E	14	P5950+P5957
		15	P5956+P5969
		16	P5968+P5977
		17	P5976+P5951
NHJ4-11	S103G L111V G159E	18	P5950+P5963
		19	P5962+P5975
		20	P5974+P5951
NHJ4-12	T22A S103G G159E	21	P5950+P5957
		22	P5956+P5961
		23	P5960+P5975
		24	P5974+P5951
NHJ4-18	T22A N62E L111V	25	P5950+P5957
		26	P5956+P5959
		27	P5958+P5979
		28	P5978+P5951
NHJ4-20	S101A S103G V104L S128N	29	P5950+P5967
		30	P5966+P5971
		31	P5970+P5951

[000675] Para expressar o grupo NHJ4 de proteínas variantes para

análises bioquímicas adicionais, as cepas de *B. subtilis* carregando os plasmídios com a variante foram inoculadas em placas de microtitulação contendo 150 µl de meio caldo Luria suplementado com 10 µg/ml de neomicina. As culturas foram cultivadas para expressão de proteína conforme descrito no Exemplo 2, e foram filtradas através de uma placa com microfiltros (0,22 µm; Millipore) também conforme descrito no Exemplo 2. O filtrado resultante foi usado para análise bioquímica. O teste de inibição de eglina c para determinação do teor de proteína e os testes em amostras de tecido com SLT feitos em vários detergentes foram executados conforme descrito no Exemplo 1. Os índices de desempenho também foram calculados conforme descrito na descrição do teste com SLT no Exemplo 1. A Tabela 4-4 fornece informações referentes a estas variantes com múltiplas mutações e os resultados obtidos para elas. Os valores de PI são em relação a GG36. Nas tabelas a seguir, as composições detergentes ("Det.") correspondem às aquelas mostradas na Tabela D, acima. Além disso, conforme indicado, a posição do aminoácido é mencionada de acordo com a numeração de BPN'.

TABELA 4-4. Variantes de NHJ4 com múltiplas mutações com índices de desempenho de limpeza de SLT de pelo menos 0,2 em relação a GG36 nos detergentes 7, 8 ou 9 a 16°C.		
Nome da variante	Criada por	Mutações (numeração de acordo com BPN')
		GG36
NHJ4-1	PCR de extensão	S101G S103A V104I
NHJ4-10	PCR de extensão	T22A S101A Y209E
NHJ4-11	PCR de extensão	S103G L111V G159E
NHJ4-12	PCR de extensão	T22A S103G G159E
NHJ4-13	QCMS	T22A L111V G159E
NHJ4-14	QCMS	T22A S128N E271F Y209E
NHJ4-15	QCMS	T22A S103G L111V
NHJ4-16	QCMS	N62E L111V S128N
NHJ4-17	QCMS	T22A L111V S128N

TABELA 4-4. Variantes de NHJ4 com múltiplas mutações com índices de desempenho de limpeza de SLT de pelo menos 0,2 em relação a GG36 nos detergentes 7, 8 ou 9 a 16°C.		
Nome da variante	Criada por	Mutações (numeração de acordo com BPN')
NHJ4-18	PCR de extensão	T22A N62E L111V
NHJ4-19	QCMS	S101A S103G V104L S188D
NHJ4-2	PCR de extensão	S101G S103A V104I G159D
NHJ4-20	PCR de extensão	S101A S103G V104L S128N
NHJ4-24	QCMS	T22A S101A G159E
NHJ4-3	PCR de extensão	S101A S103G V104L
NHJ4-4	PCR de extensão	S101A S103G V104L G159E
NHJ4-5	PCR de extensão	T22A S101A S103G V104L
NHJ4-6	QCMS	S101A S103G V104L Y209E
NHJ4-7	QCMS	T22A Y209E E271F
NHJ4-8	QCMS	T22A S101A E271F
NHJ4-9	QCMS	S101A Y209E E271F

Exemplo 5

Construção e desempenho de limpeza do grupo NHJ3 de variantes de GG36

[000676] O grupo NHJ3 de variantes aqui descrito se baseia em uma variante de GG36 (chamada de GG36-9) contendo as seguintes mutações: S101G, S103A, V104I, G159D, A232V, Q236H, Q245R, N248D, e N252K (numeração de acordo com BPN'). Estas variantes foram criadas usando o kit de mutagênese QUIKCHANGE® Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (kit QCLDS; Stratagene), com o plasmídio pRA68 (*vide* figura 3) como o molde de DNA. O plasmídio pRA68 foi gerado a partir do vetor pBN3 (*vide* Babé *et al.*, Biotech. Appl. Biochem. 27:117-124 [1998]).

[000677] A sequência de DNA da variante GG36-9 (a sequência de sinal é mostrada em letras minúsculas, o pró-peptídeo em letras minúsculas sublinhadas, e a sequência madura de GG36-9 em letras maiúsculas) é fornecida abaixo:

Gtgagaagcaaaaaattgtggatcgctcgctcgaccgcactactcatttctgttg-

cttttagttcatcgatcgcacgctgctgaagaagcaaaagaaaaatatttaattggcttta-
atgagcaggaagctgtcagtgagttttagaacaagtagaggcaaatgacgaggtcgccatt-
ctctctgaggaagaggaagtcgaaattgaattgcttcatgaattgaaacgattcctgttt-
tatccgttgagttaagcccagaagatgtggacgcgcttgaactcgatccagcgatttcta-
tattgaagaggatgcagaagtaacgacaatgGCGCAATCAGTGCCATGGGGA-
 ATTAGCCGTGTGCAAGCCCCGGCTGCCATAACCGTGGATTGA-
 CAGGTTCTGGTGTAAGTTGCTGTCCTCGATACAGGTATTT-
 CCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTTGTAC-
 CAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGCATGGCACG-
 CATGTGGCCGGGACGATTGCTGCTCTAAACAATTCGATTGGCG-
 TACTTGCGTAGCGCCGAGCGCGGAAGTATACGCTGTAAAGTA-
 TTAGGGGCGAGCGGTGGGGGCGCCATCAGCTCGATTG-
 CCCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTTGC-
 TAATTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCAAGTGCCACACTTGAG-
 CAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGGGGCGTTCTTGTTGTAG-
 CGGCATCTGGAAATTCGGGTGCAGACTCAATCAGCTATCCGG-
 CCCGTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGACCAAAA-
 CAACAACCGCGCCAGCTTTTTCACAGTATGGCGCAGGGCTTGACA-
 TCGTCGCACCAGGTGTAAACGTGCAGAGCACATACCCAGGTT-
 CAACGTATGCCAGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCT-
 CATGTTGCAGGTGCAGCAGTCCTTGTTAAACATAAGAAC-
 CCATCTTGGTCCAATGTACGAATCCGCGATCATC-
 TAAAGAAAACGGCAACGAGCTTAGGAAGCACGAACTTGTATGGA-
 AGCGGACTTGTCATGCCGAAGCTGCAACTCGTTAA (SEQ ID
 NO:5)

[000678] A sequência de proteína da variante GG36-9 (a sequência de sinal é mostrada em letras minúsculas, o pró-peptídeo em letras minúsculas sublinhadas, e a sequência madura da protease GG36-9 em letras maiúsculas) é fornecida abaixo:

vrskklwivastallisvafssssiasaaeeeakekyligfnegeavsefveqvean-

devailseeeveieillhefetipvlsvlspedvdaleldpaisyieedaevttmAQSV-
 PWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFV-
 PGEPSTQDGNGHGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVL-
 GASGGGAISSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSPSPSATLEQAVN-
 SATSRGVLVVAASGNSGADSIYPARYANAMAVGATDQNNNRAS-
 FSQYGAGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAA-
 VLVKHKNPSWSNVRIRDHLKKTATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR
 (SEQ ID NO:6)

[000679] Para criar as variantes de NHJ3 usando o kit QCLSD, iniciadores mutagênicos foram desenhados como mostrado na Tabela 5-1 para cada uma das variantes A reação de mutagênese para cada variante consistiu em 0,5 µl de tampão 10X, 0,5 µL de DNA do plasmídeo pRA68 (168 ng/µL), 0,5 µl de iniciador mutagênico senso "f" (25 µM), 0,5 µl de iniciador mutagênico antissenso (25 µM), 1 µl de dNTPs (fornecidas no kit QCLSD), 1,5 µl de solução Quik (fornecida no kit QCLMS), 1 µl de mistura de enzimas (fornecida no kit QCLSD), e 40 µl de água deionizada destilada para fazer um volume de reação de 50 µL, de acordo com as instruções do fabricante. O programa de ciclagem foi 1 ciclo a 95°C durante 2 minutos, 18 ciclos de 95°C durante 20 segundos, 60°C durante 10 segundos e 68°C durante 3 minutos, 22 segundos, e um ciclo final de 68°C durante 5 minutos. A seguir, 1 µL da enzima de restrição *DpnI* fornecida no kit foi usado para digerir o DNA plasmidial na reação e, então, 2 µL da reação foram usados para transformar células competentes *E. coli* TOP 10 (Invitrogen). Os transformantes de *E. coli* foram selecionados em placas com meio caldo Luria contendo 50 µg/mL (ppm) de carbenicilina após cultura de um dia para o outro a 37°C. O DNA plasmidial foi extraído a partir de 4 a 8 colônias de *E. coli* cultivadas em meio LA contendo 50 µg/mL (ppm) de carbenicilina usando o kit QIAprep spin miniprep (Qiagen). Os plasmídios foram sequenciados para confirmar a presença das mutações de-

sejadas. Os plasmídios variantes foram então transformados em células de *B. subtilis* conforme descrito no Exemplo 2. As cepas variantes de *B. subtilis* foram cultivadas conforme descrito no Exemplo 2 para análise bioquímica adicional, como, por exemplo, determinação do teor de proteína usando o teste de inibição de eglina c (Exemplo 1) e um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT (Exemplo 1). Os resultados são fornecidos abaixo nas Tabelas 5-2 e 5-3. Os PIs são em relação a GG36. Nas tabelas a seguir, as composições detergentes ("Det.") correspondem às aquelas mostradas na Tabela D, acima. Além disso, conforme indicado, a posição do aminoácido é mencionada de acordo com a numeração de BPN'.

TABELA 5-1. Lista dos iniciadores mutagênicos usados para criar o grupo NHJ3 de variantes ("f" se refere aos iniciadores senso (Forward) e "r" se refere aos iniciadores antissenso (Reverse))

Variante	Mutação Incorporada (numeração de acordo com BPN')	Nome do iniciador mutagênico	sequência do iniciador mutagênico na direção 5' para 3'
NHJ3-1	G101S	p158_G101S f	GTAAAGTATTAGGGGCGAGCGGTAG-CGGCGCCATCAGCTCGATTGCC (SEQ ID NO:53)
		p159_G101S r	GGCAATCGAGCTGATGGCGCCGCTACCG-CTCGCCCCTAATACTTTAAC (SEQ ID NO:54)
NHJ3-2	A103S	p160_A1013 f	GTATTAGGGGCGAGCGGTGGGGGCAG-CATCAGCTCGATTGCCCAAGGATTG (SEQ ID NO:55)
		p161_A1013 r	CAATCCTTGGGCAATCGAGCTGATGCTG-CCCCCACCGCTCGCCCCTAATAC (SEQ ID NO:56)
NHJ3-3	I104V	p142_I104V f	GGGCGAGCGGTGGGGGCGCCGTTAG-CTCGATTGCCCAAGGATTG (SEQ ID NO:57)

TABELA 5-1. Lista dos iniciadores mutagênicos usados para criar o grupo NHJ3 de variantes ("f" se refere aos iniciadores senso (Forward) e "r" se refere aos iniciadores antissenso (Reverse))

Variante	Mutação Incorporada (numeração de acordo com BPN')	Nome do iniciador mutagênico	sequência do iniciador mutagênico na direção 5' para 3'
		p143_I104V r	CAATCCTTGGGCAATCGAGCTAACGGCG-CCCCACCGCTCGCCC (SEQ ID NO:58)
NHJ3-4	D159G	p144_D159G f	GCATCTGGAAATTCGGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCGT (SEQ ID NO:59)
		p145_D159G r	ACGGGCCGGATAGCTGATTGAGCCTG-CACCCGAATTTCCAGATGC (SEQ ID NO:60)
NHJ3-5	V232A	p146_V232A f	CTCATGTTGCAGGTGCAGCAGCACTTGT-TAAACATAAGAACCC (SEQ ID NO:61)
		p147_V232A r	GGGTTCTTATGTTTAAACAAGTGCTGCTG-CACCTGCAACATGAG (SEQ ID NO:62)
NHJ3-6	H236Q	p148_H236Q f	GTGCAGCAGTCCTTGTTAAACAAAAGAAC-CCATCTTGGTCCAAT (SEQ ID NO:63)
		p149_H236Q r	ATTGGACCAAGATGGGTTCTTTTGTTTAA-CAAGGACTGCTGCAC (SEQ ID NO:64)
NHJ3-7	R245Q	p150_R245Q f	CCATCTTGGTCCAATGTACAAATCCG-CGATCATCTAAAGAAAAC (SEQ ID NO:65)
		p151_R245Q r	GTTTTCTTTAGATGATCGCGGATTTGTACA-TTGGACCAAGATGG (SEQ ID NO:66)
NHJ3-8	D248N	P152_D248N f	GGTCCAATGTACGAATCCGCAATCATC-TAAAGAAAACGGCAAC (SEQ ID NO:67)
		P153_D248N r	GTTGCCGTTTTCTTTAGATGATTGCGGA-TTCGTACATTGGACC (SEQ ID NO:68)
NHJ3-9	K252N	P154_K252N f	GAATCCGCGATCATCTAAAGAATACGG-CAACGAGCTTAGGAAG (SEQ ID NO:69)

TABELA 5-1. Lista dos iniciadores mutagênicos usados para criar o grupo NHJ3 de variantes ("f" se refere aos iniciadores senso (Forward) e "r" se refere aos iniciadores antissenso (Reverse))

Variante	Mutação Incorporada (numeração de acordo com BPN')	Nome do iniciador mutagênico	sequência do iniciador mutagênico na direção 5' para 3'
		P155_K252N r	CTTCCTAAGCTCGTTGCCGTATTCTTTA-GATGATCGCGGATTC (SEQ ID NO:70)

TABELA 5-2. Variantes de NHJ3 com múltiplas mutações com índices de desempenho de limpeza de SLT de pelo menos 1,1 em relação a GG36 nos detergentes 7, 8 ou 9 a 16°C.

Variante	sequência da variante em relação a GG36 (numeração de acordo com BPN')
	GG36
NHJ3-1	S103A-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-2	S101G-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-3	S101G-S103A-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-4	S101G-S103A-V104L-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-5	S101G-S103A-V104L-G159D-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-6	S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-7	S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-N248D-N252K
NHJ3-8	S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N252K
NHJ3-9	S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D

TABELA 5-3. Variantes de NHJ3 com múltiplas mutações com índices de desempenho de limpeza de SLT de pelo menos 0,3 em relação a GG36 nos detergentes 10 ou 11 a 16°C.

Variante	sequência da variante em relação a GG36 (numeração de acordo com BPN')
	GG36
NHJ3-1	S103A-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-2	S101G-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K

TABELA 5-3. Variantes de NHJ3 com múltiplas mutações com índices de desempenho de limpeza de SLT de pelo menos 0,3 em relação a GG36 nos detergentes 10 ou 11 a 16°C.

Variante	sequência da variante em relação a GG36 (numeração de acordo com BPN')
NHJ3-3	S101G-S103A-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-4	S101G-S103A-V104L-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-5	S101G-S103A-V104L-G159D-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-6	S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-7	S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-N248D-N252K
NHJ3-8	S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N252K
NHJ3-9	S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D

Exemplo 6

Construção e desempenho de limpeza do grupo NHJ5 de variantes de GG36

[000680] O grupo NHJ5 de variantes aqui descrito se baseia em uma variante de GG36 (chamada de GG36-7) contendo as seguintes mutações: S101G, S103A, V104I, G159D, A232V, Q245R, N248D, e (numeração de acordo com BPN'). Estas variantes foram criadas usando o kit QUIKCHANGE® Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit ("kit QCLMS") com o plasmídio pRA96 como o molde de DNA (*vide* figura 4). As mutações incorporadas e as sequências dos iniciadores usados para introduzir as mutações em GG36-7 são mostradas na Tabela 6-1. As variantes foram geradas usando os métodos descritos no Exemplo 4. As cepas variantes de *B. subtilis* foram cultivadas conforme descrito no Exemplo 2 para análise bioquímica adicional, como, por exemplo, determinação do teor de proteína usando o teste de inibição de eglina c (Exemplo 1) e um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT (Exemplo 1). Os resultados são fornecidos abaixo na Tabela 6-2. Os valores de PI são em relação a GG36. Nas tabelas a seguir, as composições detergentes ("Det.") correspondem àquelas mostradas na Tabela D, acima. Além disso, conforme indicado, a posi-

ção do aminoácido é mencionada de acordo com a numeração de BPN'.

[000681] A sequência de DNA da variante GG36-7 (a sequência de sinal é mostrada em letras minúsculas, o pró-peptídeo em letras minúsculas sublinhadas, e a sequência madura da protease GG36-7 em letras maiúsculas) é fornecida abaixo:

Gtgagaagcaaaaaattgtggatcgtcgcgtcgaccgcactactcatttctgttg-
 ctttagttcatcgcgcgcgcgtgctgaagaagcaaaagaaaaatatttaattggcttta-
atgagcaggaagctgtcagtgagttttagaacaagtagaggcaaatgacgaggtcgccatt-
ctctctgaggaagaggaagtcgaaattgaattgcttcatgaattgaaacgattcctgttt-
tatccgttgagttaagcccagaagatgtggacgcgcttgaactcgatccagcgatttcta-
tattgaagaggatgcagaagtaacgacaatgGCGCAATCAGTGCCATGGGGA-
 ATTAGCCGTGTGCAAGCCCCGGCTGCCATAACCGTGGATTGA-
 CAGGTTCTGGTGTAAGTTGCTGTCCTCGATACAGGTATTT-
 CCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTTGTAC-
 CAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGCATGGCACG-
 CATGTGGCCGGGACGATTGCTGCTCTAAACAATTCGATTGGCG-
 TACTTGGCGTAGCGCCGAGCGCGGAAGTATACGCTGTAAAGTA-
 TTAGGGGCGAGCGGTGGGGGCGCCATCAGCTCGATTG-
 CCCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTTGC-
 TAATTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCAAGTGCCACACTTGAG-
 CAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGGGGCGTTCTTGTTGTAG-
 CGGCATCTGGAAATTCGGGTGCAGACTCAATCAGCTATCCGG-
 CCCGTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGACCAAAA-
 CAACAACCGCGCCAGCTTTTACAGTATGGCGCAGGGCTTGACA-
 TCGTCGCACCAGGTGTAAACGTGCAGAGCACATACCCAGGTT-
 CAACGTATGCCAGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCT-
 CATGTTGCAGGTGCAGCAGTCCTTGTTAAACAAAAGAAC-
 CCATCTTGGTCCAATGTACGAATCCGCGATCATCTAAAGAATA-
 CGGCAACGAGCTTAGGAAGCACGAACTTGTATGGAAGCGGAC-

TTGTCAATGCCGAAGCTGCAACTCGT (SEQ ID NO:7)

[000682] A sequência de proteína da variante GG36-7 (a sequência de sinal é mostrada em letras minúsculas, o pró-peptídeo em letras minúsculas sublinhadas, e a sequência madura da protease GG36-7 em letras maiúsculas) é fornecida abaixo:

vrskklwivastallisvafssssiasaaeeakekyligfnegeavsefveqvean-
devailseeeeveieillhefetipvlsvlspedvdaleldpaisyieedaevttmAQSV-
 PWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFV-
 PGEPTQDGNGHGHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVL-
 GASGGGAISSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSPSPSATLEQAVN-
 SATSRGVLVVAASGNSGADSIYPARYANAMAVGATDQNNNRAS-
 FSQYGAGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAA-
 VLVKQKNPSWSNVRIRDHLKNTATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR
 (SEQ ID NO:8)

TABELA 6-1. Lista dos iniciadores usados para criar o grupo NHJ5 de variantes

Nº do Iniciador	Mutações usando a numeração de GG36 (Numeração de BPN' mostrada entre parênteses)	Sequência iniciadora
168	H243R (H249R)	GTACGAATCCGCGATAGACTAAAGAATACGG-CAACGAG (SEQ ID NO:71)
170	E265F (E271F)	GCGGACTTGTCAATGCCTTTGCTGCAACTCG-TTAAAGCTTACAT (SEQ ID NO:72)
172	D157E (D159E)	GGAAATTCGGGTGCAGAATCAATCAGCTA-TCCGGCCCGTTA (SEQ ID NO:73)
174	A156E (A158E)	CTGGAAATTCGGGTGAAGACTCAATCAGCTA-TCCGGCC (SEQ ID NO:74)
176	A156E-D157G (A158E-D159E)	CGGCATCTGGAAATTCGGGTGAAGGCTCAA-TCAGCTATCCGGCCCGTTATG (SEQ ID NO:75)
178	T22A	CATAACCGTGGATTGGCAGGTTCTGGTG-TAAAAGTTGCTGTC (SEQ ID NO:76)
180	N60E (N62E)	TCCACTCAAGATGGGGAAGGGCATGGCACG-CATGTGGC (SEQ ID NO:77)
182	N232R (N238R)	CTTGTTAAACAAAAGAGACCATCTTGGTCCA-ATGTACGAATC (SEQ ID NO:78)

TABELA 6-1. Lista dos iniciadores usados para criar o grupo NHJ5 de variantes

N° do Iniciador	Mutações usando a numeração de GG36 (Numeração de BPN' mostrada entre parênteses)	Sequência iniciadora
184	D242R (D248R)	AATGTACGAATCCGCAGACATCTAAAGAATA-CGGCAACGAGC (SEQ ID NO:79)
186	T247R (T253R)	CGATCATCTAAAGAATAGAGCAACGAGCT-TAGGAAGCACGAAC (SEQ ID NO:80)
188	S24R	GTGGATTGACAGGTAGAGGTGTAAAAGTTG-CTGTCCTCGATA (SEQ ID NO:81)
190	N74D (N76D)	ACGATTGCTGCTCTAGATAATTTCGATTGGCG-TACTTGGCGTAG (SEQ ID NO:82)

TABELA 6-2: Variantes de NHJ5 com múltiplas mutações com índices de desempenho de limpeza de SLT de pelo menos 0,6 em relação a GG36 nos detergentes 7 a 11, a 16°C.

Variante	sequência da variante em relação a GG36 (numeração de acordo com BPN')
	GG36
GG36-7	S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D
NHJ5-1	S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F
NHJ5-2	S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N238R
NHJ5-3	S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N248R
NHJ5-4	S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-T253R
NHJ5-5	S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-S24R
NHJ5-6	S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N76D
NHJ5-7	S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R
NHJ5-8	S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-E271F
NHJ5-9	S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R
NHJ5-10	S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-E271F
NHJ5-11	T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R
NHJ5-12	T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F
NHJ5-13	N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R
NHJ5-14	N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F

Exemplo 7**Construção da biblioteca combinatória NHJ2**

[000683] Este Exemplo descreve a construção de uma biblioteca combinatória de GG36 envolvendo uma ou mais das seguintes mutações: A16S, T22A, S101A, S103G, V104L, L111V, S128N, e L148I (numeração de acordo com BPN'). O plasmídio de expressão pHPLT-GG36 de *B. subtilis* foi fornecido para a empresa DNA 2.0 Inc. para a geração da biblioteca combinatória de NHJ2. Uma reação de ligação da biblioteca de NHJ2 construída foi fornecida pela DNA 2.0, Inc. para transformação na cepa de *B. subtilis* (genótipo: $\Delta aprE$, $\Delta nprE$, *amyE::xylRPxylAcomK-phleo*). As variantes geradas contendo uma ou várias das mutações aqui descritas podem ser testadas em aplicações para limpeza em água fria usando os métodos e as composições de detergentes aqui descritas.

Exemplo 8

Construção de bibliotecas e variantes de GG36 adicionais

[000684] Bibliotecas e variantes adicionais são construídas usando o seguinte conjunto de mutações: A1R, A230E, E271L, G115R, G20R, H249R, K235F, K27V/F/L, L75E, L82R, N18R, N269R, N43D, N43R, N76D, R45T, S212F, S242R, S24R, S78R, S9A, T22R, V121E, V244R, V28E, V30E, V4R, W241R (numeração de acordo com BPN'). O plasmídio de expressão pHPLT-GG36 de *B. subtilis* foi usado para construir as bibliotecas e variantes na empresa DNA2.0, Inc. Uma reação de ligação da biblioteca ou variante foi transformada na cepa de *B. subtilis* (genótipo: $\Delta aprE$, $\Delta nprE$, *amyE::xylRPxylAcomK-phleo*). As variantes geradas contendo uma ou mais destas mutações são testadas em aplicações para limpeza em água fria no teste de limpeza de amostra de tecido com SLT (Exemplo 1) usando os métodos e as composições de detergentes aqui descritas. Os resultados são fornecidos abaixo na Tabela 8-1. Nas tabelas a seguir, as composições de detergentes ("Det.") correspondem às aquelas mostradas na Tabela 1-2, acima. Além disso, conforme indicado, a posição do aminoácido é mencionada de acordo

com a numeração de BPN'.

[000685] Conjuntos adicionais de variantes de GG36 são construídos e testados para aplicações de limpeza em água fria usando os métodos e composições as detergentes aqui descritas e incluem: G20R-N43R-H249R, G20R-T22R-N43R, G20R-N43R-S242R, G20R-N43R-E271L, G20R-N43R-V244R, G20R-S24R-N43R-S242R, S9A-T22R-S78R-S212F-W241R, S9A-G20R-N43R-S212F, S9A-N43R-S212F, G20R-N43R-S212F, G20R-T22R-N43R-S212F, S24R-S78R-S212F, S9A-N43R-S78R, S9A-N43R-S78R-S242R, S9A-G20R-N43R-S78R, G20R-S24R-N43R-S78R-S242R, T22R-S24R-S78R-S212F, S9A-G20R-N43R-S78R-S242R, G20R-N43R-S78R-H249R, G20R-N43R-S78R, S9A-S78R-S212F, S9A-T22R-N43R-S78R, S9A-G20R-S24R-N43R, S9A-T22R-S78R-S212F, V4R-S9A-T22R-S78R-S212F, G20R-S24R-N43R, A1R-S9A-N43R, G20R-S24R-N43R-G115R, S9A-S24R-N43R, G20R-T22R-S24R-N43R, A1R-S24R-N43R, S9A-G20R-S24R-N43R-S242R, S9A-G20R-T22R-S78R-S212F, S9A-S24R-N43R-V244R, S9A-S24R-N43R-S242R, V4R-S9A-T22R-S24R-S212F, e T22R-S24R-N43R (numeração de acordo com BPN').

TABELA 8-1: Desempenho de limpeza de SLT das variantes WCE4. PI = índice de desempenho em relação a GG36 PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = + no detergente 36 k ou I	
sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação a GG36; detergente 36k ou I, teste de SLT, 16°C
V004R-S009A-G020R-S242R	+++
G020R-N043R-W241R	+++
G020R-S242R-N269R	+++
V004R-S009A-G020R-N043R-	+++
V004R-G020R-H249R-	+++
N018R-S024R-V244R	+++
S009A-T022R-S212F-W241R	+++
G020R-N043R-N269R-	+++

TABELA 8-1: Desempenho de limpeza de SLT das variantes WCE4. PI = índice de desempenho em relação a GG36 PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = + no detergente 36 k ou I	
sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação a GG36; detergente 36k ou I, teste de SLT, 16°C
N018R-S024R-S242R	+++
V004R-S009A-N043R-W241R-	+++
G020R-N043R-V244R-	+++
G020R-T022R-S242R-	+++
V004R-G020R-N043R-	+++
V004R-S009A-G020R-N043R-S242R-	+++
G020R-N043R-S242R-	+++
G020R-N043R-S242R-H249R-	+++
G020R-S212F-H249R-	+++
V004R-S009A-W241R-	+++
A001R-S009A-N043R-	+++
G020R-N043R-H249R-	+++
S009A-G020R-N043R-W241R	+++
G020R-T022R-N043R-	+++
G020R-H249R-N269R-	+++
G020R-T022R-W241R-	+++
V004R-S009A-S024R-N043R-W241R-	+++
S009A-N043R-S078R	+++
V004R-G020R-S024R-V244R-	+++
G020R-T022R-S078R-S242R-	+++
G020R-S024R-S242R-H249R-	+++
V004R-S009A-S078R-W241R-	+++
S009A-N043R-S078R-S242R	+++
V004R-G020R-S024R-	+++
S009A-N043R-S212F	+++
G020R-N043R-S212F-	+++
S024R-S078R-S212F-	+++
S009A-G020R-S024R-N043R	+++
S009A-T022R-N043R-S078R	+++

TABELA 8-1: Desempenho de limpeza de SLT das variantes WCE4. PI = índice de desempenho em relação a GG36 PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = + no detergente 36 k ou I	
sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação a GG36; detergente 36k ou I, teste de SLT, 16°C
G020R-T022R-S212F-W241R-	+++
G020R-N043R-S212F-W241R-	+++
S009A-N043R-W241R	+++
G020R-N043R-E271L	+++
G020R-T022R-S078R-W241R-	+++
G020R-S024R-N043R-S242R-	+++
G020R-T022R-N043R-W241R-	+++
S009A-G020R-N043R-S212F	+++
V004R-S009A-G020R-S024R-S242R-	+++
G020R-N043R-H249R-E271L	+++
G020R-T022R-S024R-S242R-	+++
S009A-T022R-S078R-S212F	+++
G020R-N043R-S242R-E271L	+++
S009A-T022R-S078R-S212F-W241R	+++
V004R-G020R-S024R-H249R-	+++
G020R-T022R-E271L	+++
G020R-T022R-N043R-S212F-	+++
V004R-G020R-S024R-N043R-S242R-	+++
V004R-G020R-S024R-N043R-	+++
V004R-S009A-T022R-S078R-S212F-	+
G020R-T022R-S078R-S212F-W241R-	+
G020R-T022R-N269R-	+

Exemplo 9

Construção e desempenho de limpeza da biblioteca WCE2 de GG36

[000686] A biblioteca combinatória WCE2 foi gerada pela DNA 2.0, Inc. usando o plasmídio de expressão pHPLT-GG36 de *B. subtilis*. Uma reação de ligação da biblioteca WCE2 construída foi transformada na cepa de *B. subtilis* (genótipo: $\Delta aprE$, $\Delta nprE$,

amyE::xylRPxylAcomK-phleo). O conjunto de mutações usado para gerar a biblioteca WCE2 é A230E, G20R, H249R, N18R, N43R/D, N76D, R45T, S242R, e S24R (numeração de BPN'). As variantes geradas contendo uma ou mais destas mutações são testadas em aplicações para limpeza em água fria no teste de limpeza de amostra de tecido com SLT (Exemplo 1) usando os métodos e as composições detergentes aqui descritas. Os resultados são fornecidos abaixo na Tabela 9-1. Na tabela a seguir, as composições detergentes ("Det.") correspondem às aquelas mostradas na Tabela 1-2, acima. Além disso, conforme indicado, a posição do aminoácido é mencionada de acordo com a numeração de BPN'.

TABELA 9-1: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE2 de GG36. PI = índice de desempenho em relação a GG36 PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = + no detergente 36h ou 36i	
sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36h ou 36i, 16°C
N018R-G020R-N043D-R045T-A230E	+++
N018R-N043R-R045T-S242R-H249R	+++
S024R-N043D-H249R	+++
N018R-G020R-R045T	+++
G020R-S024R-N076D-H249R	+++
S024R-N043R-A230E-S242R	+++
N018R-S024R-N043D-A230E	++
G020R-N076D	++
N018R-S024R-N043D-N076D-H249R	++
S024R-N043R-N076D-H249R	+++
N018R-S024R-R045T-S242R	++

TABELA 9-1: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE2 de GG36.

PI = índice de desempenho em relação a GG36

PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = + no detergente 36h ou 36i

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36h ou 36i, 16°C
G020R-N043D-N076D-A230E-H249R	++
G020R-N043R-R045T-S242R	+++
N018R-S024R-N076D-H249R	++
N018R-G020R-S024R-N043D-R045T-L233I-S242R	+++
S024R-N043R-A230E	+++
N018R-G020R-N043D	+++
N043R-S242R-H249R	+++
G020R-N043R-R045T-A230E	+++
N043R-N076D-S242R-H249R	+++
G020R-S024R-R045T-A230E-S242R	+++
S024R-R045T-N076D-A230E-S242R-H249R	+++
S024R-R045T	+++
S024R-N043R-R045T-N076D-A230E-H249R	++
N018R-S024R-N043D-R045T-H249R	++
N018R-N043R-R045T-H249R	+++
S024R-N043R-S242R	+++
N018R-G020R-N043R-N076D-H249R	+++
G020R-S024R-N043D-H249R	+++
G020R-N043R-A230E-S242R	+++

TABELA 9-1: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE2 de GG36.

PI = índice de desempenho em relação a GG36

PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = + no detergente 36h ou 36i

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36h ou 36i, 16°C
G020R-N043R-S242R	+++
N018R-N043R-N076D-A230E	++
G020R-S024R-N043D-S242R	+++
G020R-N043R-A230E	+++
N018R-G020R-N043R-N076D-S242R-H249R	+++
N043D-R045T-N076D-H249R	+
N018R-N043R-S242R-H249R	+++
N018R-G020R-N043R-R045T-S242R	+++
N018R-G020R-N043D-A230E-S242R	+++
G020R-S024R-N043R-R045T-H249R	+++
S024R-N043R-H249R	+++
G020R-S024R-K027E-N043R-N076D-A230E	+++
S024R-N043R-R045T-S242R	+++
N018R-G020R-S024R-N043R-R045T-N076D-A230E	+++
G020R-N043R-N076D-A230E-H249R	+++
N018R-N043R-R045T-S242R	+++
G020R-S242R-H249R	+++
N018R-N043R-N076D-A230E-S242R-H249R	++

TABELA 9-1: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE2 de GG36.

PI = índice de desempenho em relação a GG36

PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = + no detergente 36h ou 36i

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36h ou 36i, 16°C
N018R-S024R-N076D	++
G020R-S024R-K27R-N043D-S242R-H249R	+++
N018R-G020R-S024R-N043D-N076D-S242R	++
N018R-N043R-N076D-S242R-H249R	+++
N018R-S024R-N043D-A230E-H249R	+++
N018R-G020R-N043D-H249R	++
N018R-G020R-N043D-R045T-N076D-S242R	+++
S024R-N043R-N076D-A230E-S242R	+++
G020R-S024R-T38I-N043R-R045T-N076D-S242R-H249R	+++
N018R-G020R-N043R	+++
N018R-S024R-R045T-A230E-S242R	++
N018R-G020R-H249R	+++
S024R-N043R-N076D	+++
N018R-G020R-S024R-N043R-R045T-N076D-H249R	++
N018R-N043D-R045T-N076D-S242R-H249R	+++
S024R-N043D-S242R-H249R	+++

TABELA 9-1: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE2 de GG36.

PI = índice de desempenho em relação a GG36

PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = + no detergente 36h ou 36i

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36h ou 36i, 16°C
N018R-G020R-S024R-N043D-R045T-S242R	++
G020R-S024R-N043R-N076D	++
N018R-G020R-N043D-R045T-A230E-S242R	++
G020R-S024R-N043R-R045T-N076D-S242R-H249R	++
N018R-N043R-R045T-N076D-S242R	++
N018R-G020R-N043R-N076D-A230E-S242R	++
N018R-S024R-N043D-H249R	++
N018R-S024R-N043R-R045T-A230E-H249R	++
N018R-G020R-N043R-R045T-N076D-H249R	+++
N018R-S024R-S242R	++
N018R-N043R-R045T-N076D-A230E-S242R	++
R045T-S242R-H249R	+++
N018R-S024R-N043D-S242R	+++
N018R-G020R-N043D-R045T-S240P	++
S024R-N043R-R045T-S242R-H249R	++

TABELA 9-1: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE2 de GG36.

PI = índice de desempenho em relação a GG36

PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = + no detergente 36h ou 36i

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36h ou 36i, 16°C
N018R-S024R-V30S-L31S-D32I-T33Q-G34V-I35F	++
N018R-G020R-N043R-N076D	+++
G020R-N043D-R045T-N076D-S242R-H249R	++
N018R-S024R-N043D-A230E-S242R	++
N018R-S024R-N043D-S242R-H249R	+++
S024R-N043D-R045T-S242R-H249R	++
N043R-A230E-H249R	+
N043R-A230E-H249R	+
G020R-S024R-N043D-N076D-H249R	++
S024R-R045T-S242R-A273V	+
G020R-S024R-R045T-N076D-S242R-H249R	+
N018R-S024R-N043D-N076D-S242R	+
N018R-N043R-N076D-A230E-H249R	+
N018R-G020R-N043R-R045T-H249R	+
N018R-N043R-R045T-A230E-S242R	+
G020R-S024R-N043D-R045T-A230E-S242R	+
N018R-N043D-A230E-H249R	+
N018R-N043R-N076D-S242R	+++

TABELA 9-1: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE2 de GG36.

PI = índice de desempenho em relação a GG36

PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = + no detergente 36h ou 36i

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36h ou 36i, 16°C
N018R-G020R-N076D	+
N018R-G020R-N043D-N076D-S242R-H249R	+
G020R-S024R-N043D-N076D-S242R-H249R	+++
N043D-S242R-H249R	+++
N018R-G020R-S024R-N043R-N076D	+
N018R-G020R-N043D-R045T-N076D-H249R	+
N018R-G020R-N043R-R045T-N076D-A230E-H249R	+
N018R-N076D-S242R	+
G020R-N043R-H249R	+
N018R-N076D-S242R-H249R	+
N018R-S024R-R045T-A230E-H249R	+
A230E-H249R	+++
N018R-R045T-H249R	+
G020R-N043R-N076D	+++
N043R-R045T-H249R	+++
N018R-N043D-N076D-S242R-H249R	+
N043R-N076D-H249R	+++
N018R-R045T	+

TABELA 9-1: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE2 de GG36.

PI = índice de desempenho em relação a GG36

PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = + no detergente 36h ou 36i

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36h ou 36i, 16°C
G020R-N076D-A230E-S242R	+
G020R-S024R-N043D-R045T	+++
S024R-N043D-N076D-S242R-H249R	+++
G020R-R045T-H249R	+
N043R-N076D-S153A-H249R	+
N043R-N076D-A230E-H249R	+++
N018R-N043D-N076D-H249R	+
G020R-N043R-N076D-V227I	+

Exemplo 10

Construção e desempenho de limpeza do grupo WCE3 de variantes de GG36

[000687] Este exemplo descreve o grupo WCE3 de mutantes com base nas variantes de GG36, GG36-7 (Exemplo 5) e GG36-9 (Exemplo 4). Estas variantes são: S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-G159R-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248R, S101G-S103A-V104I-G159R-A232V-Q245R-N248R, e S101G, S103A, V104I, A232V, Q236H, Q245R, e N252K. Elas foram criadas usando o kit de mutagênese QuikChange® Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (kit QCLMS; Stratagene) com o plasmídio pRA96 como o molde de DNA descrito

no Exemplo 5. As variantes geradas foram testadas para limpeza em água fria no teste com amostra de tecido com SLT (Exemplo 1) com o uso dos detergentes descritos na Tabela 1-2.

TABELA 10-1. Desempenho da limpeza de SLT das variantes WCE3. PI = índice de desempenho em relação a GG36 PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = + no detergente 36h ou 36i	
sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36h ou 36i, 16°C
S101G-S103A-V104I-A232V-Q236H-Q245R-N252K	++
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248R	++
S101G-S103A-V104I-G159R-A232V-Q245R-N248D	++
S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248R	+
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R	+
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248D	+

Exemplo 11

Construção de bibliotecas e variantes adicionais de GG36

[000688] Este exemplo descreve a construção de variantes e bibliotecas de GG36 com o uso de uma ou mais das seguintes mutações: A16S, T22A, S24R, N62E, N76D, E89P, S101A/G, S103G/A, V104L/I, L111V, S128N, P129E, A232V, L148I, A158E, G159D/E, S166D,

R186H, S188D, Y209E, Q236H, N238R, Q245R, N248D/R, H249R, N252K/R, T253R, E271F (numeração de BPN') usando um plasmídio de expressão de *B. subtilis* (*por exemplo*, pHPLT-GG36; figura 2). As variantes combinatórias foram construídas pela empresa DNA2.0, Inc., com o uso de um plasmídio de expressão de *B. subtilis* (*por exemplo*, pHPLT-GG36; figura 2) e a cepa de *B. subtilis* (genótipo: Δ aprE, Δ nprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo). No caso de bibliotecas de DNA, uma reação de ligação de cada uma das bibliotecas construídas usando um plasmídio de expressão de *B. subtilis* (*por exemplo*, pHPLT-GG36; figura 2) foi transformada na cepa de *B. subtilis* (genótipo: Δ aprE, Δ nprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo). As variantes geradas contendo uma ou mais das mutações mencionadas acima foram testadas para limpeza em água fria no teste em amostra de tecido com SLT (Exemplo 1) usando as composições detergentes descritas na Tabela 1-2.

TABELA 11-1. Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca NHJ6. PI = índice de desempenho PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = + no detergente 36b, 36d ou 36e	
sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT; detergente 36b, 36d ou 36e, 16°C
S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++

TABELA 11-1. Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca NHJ6.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36b, 36d ou 36e**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT; detergente 36b, 36d ou 36e, 16°C
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-Q245R-N248D	+++
S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++

TABELA 11-1. Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca NHJ6.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36b, 36d ou 36e**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT; detergente 36b, 36d ou 36e, 16°C
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D	+++
A016S-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D	+++

TABELA 11-1. Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca NHJ6.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36b, 36d ou 36e**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT; detergente 36b, 36d ou 36e, 16°C
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++

TABELA 11-1. Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca NHJ6.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36b, 36d ou 36e**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT; detergente 36b, 36d ou 36e, 16°C
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++

TABELA 11-1. Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca NHJ6.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36b, 36d ou 36e**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT; detergente 36b, 36d ou 36e, 16°C
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D	++
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++

TABELA 11-1. Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca NHJ6.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36b, 36d ou 36e**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT; detergente 36b, 36d ou 36e, 16°C
S024R-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D	++
T022A-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-S188D-A232V-Q245R-N248D	++
S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++

TABELA 11-1. Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca NHJ6.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36b, 36d ou 36e**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT; detergente 36b, 36d ou 36e, 16°C
T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D	++
S101G-S103A-V104I-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D	++
S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
T022A-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	++

TABELA 11-1. Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca NHJ6.

PI = índice de desempenho

PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = + no detergente 36b, 36d ou 36e

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT; detergente 36b, 36d ou 36e, 16°C
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D	++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-Q245R-N248D	++
S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D	++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++

TABELA 11-1. Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca NHJ6.

PI = índice de desempenho

PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = + no detergente 36b, 36d ou 36e

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT; detergente 36b, 36d ou 36e, 16°C
S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-A232V-Q245R-N248D	++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-G159E-A232V-Q245R-N248D	+
T022A-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D	+
S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+

TABELA 11-1. Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca NHJ6. PI = índice de desempenho PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = + no detergente 36b, 36d ou 36e	
sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT; detergente 36b, 36d ou 36e, 16°C
S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+
T022A-S024K-S101G-S103A-V104I-S128N-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D	+
S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-S188D-A232V-Q245R-N248D	+
S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A232V-Q245R-N248D	+
T022A-S101G-S103A-V104I-L148I-S188D-A232V-Q245R-N248D	+
S024R-S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+
S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D	+
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-L148I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+
S101G-S103A-V104I-L148I-G159E-A232V-Q245R-N248D	+

TABELA 11-1. Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca NHJ6.

PI = índice de desempenho

PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36b, 36d ou 36e

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT; detergente 36b, 36d ou 36e, 16°C
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D	+
S101G-S103A-V104I-S128N-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+

TABELA 11-2. Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca NHJ6.

PI = índice de desempenho

PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT; detergente 36g, 16°C
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++

TABELA 11-2. Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca NHJ6.

PI = índice de desempenho

PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT; detergente 36g, 16°C
S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S101G-S103A-V104I-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-Q245R-N248D	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A232V-Q245R-N248D	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++

TABELA 11-2. Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca NHJ6.

PI = índice de desempenho

PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT; detergente 36g, 16°C
S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D	++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
A016S-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
T022A-S101G-S103A-V104I-P129E-A232V-N238R-Q245R-N248D	++
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-L148I-A158E-A232V-Q245R-N248D	+
S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	+
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-S188D-A232V-N238R-Q245R-N248D	+
T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-N238R-Q245R-N248D	+

TABELA 11-2. Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca NHJ6.

PI = índice de desempenho

PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT; de 36g, 16°C
T022A-S024R-S101G-S103A-V104I-P129E-A158E-A232V-Q245R-N248D	+
S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
T022A-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-G159E-A232V-Q245R-N248D	+

TABELA 11-3. Desempenho da limpeza SLT das variantes combinatórias de NHJ7.

PI = índice de desempenho

PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = + no detergente 36b, 36d, ou 36e

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36b, 36d ou 36e, 16°C
V104L-S128N-A158E-R186H-H249R	+++
S128N-A158E-S188D-H249R	+++
N062E-S128N-A158E-G159E-E271F	+++

TABELA 11-3. Desempenho da limpeza SLT das variantes combinatórias de NHJ7.**PI = índice de desempenho****PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36b, 36d, ou 36e**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36b, 36d ou 36e, 16°C
N062E-A158E-S188D-H249R-E271F	+++
N062E-A158E-R186H-H249R-E271F	+++
S128N-A158E-S188D-Y209E-E271F	+++
N062E-G159E-S188D-H249R	+++
A016S-N062E-A158E-R186H-H249R	+++
N062E-A158E-G159E-H249R	+++
S101A-S128N-A158E-Y209E-H249R	+++
S128N-A158E-R186H-E271F	+++
N062E-A158E-S188D-H249R	+++
N062E-A158E-R186H-E271F	+++
N062E-A158E-R186H-H249R	+++
N062E-S101A-R186H-H249R	+++
N062E-S101A-A158E-R186H-E271F	+++
N062E-V104L-A158E-S188D-H249R-E271F	+++
N062E-G159E-R186H-H249R	+++
N062E-G159E-H249R	+++
S128N-A158E-R186H-H249R	+++
S128N-A158E-S188D-E271F	+++
N062E-A158E-H249R	+++
N062E-R186H-S188D-H249R-E271F	+++
S128N-A158E-Y209E-	+++

TABELA 11-3. Desempenho da limpeza SLT das variantes combinatórias de NHJ7.**PI = índice de desempenho****PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36b, 36d, ou 36e**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36b, 36d ou 36e, 16°C
N062E-S101A-A158E-H249R	+++
V104L-S128N-A158E-R186H-E271F	+++
N062E-S101A-A158E-R186H- H249R-E271F	+++
A016S-N062E-A158E-H249R	+++
N062E-S101A-G159E-H249R	+++
S128N-A158E-R186H-S188D-E271F	+++
S101A-S128N-A158E-R186H-E271F	+++
N062E-S101A-S188D-H249R	+++
S101A-V104L-A158E-R186H-S188D- H249R	+++
N062E-G159E-H249R-E271F	+++
S128N-A158E-G159E-E271F	+++
A016S-N062E-V104L-A158E-R186H- E271F	+++
T022A-S128N-A158E-H249R	+++
S128N-A158E-H249R	+++
N062E-S101A-V104L-A158E-R186H- E271F	+++
A016S-N062E-A158E-R186H-E271F	+++
V104L-S128N-A158E-H249R	+++
V104L-S128N-A158E-S188D-H249R	+++

TABELA 11-3. Desempenho da limpeza SLT das variantes combinatórias de NHJ7.**PI = índice de desempenho****PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36b, 36d, ou 36e**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36b, 36d ou 36e, 16°C
T022A-N062E-A158E	+++
N062E-S101A-S188D-H249R-E271F	+++
N062E-A158E-H249R-E271F	++
V104L-S128N-A158E-R186H-S188D-E271F	++
N062E-S101A-R186H-E271F	++
N062E-V104L-G159E-H249R	++
N062E-R186H-H249R	++
N062E-S101A-R186H-H249R-E271F	++
S101A-A158E-R186H-S188D-H249R	++
N062E-S101A-R186H	++
S101A-S128N-P129E-R186H-H249R	++
S101A-S103G-A158E-R186H-H249R	++
A016S-N062E-V104L-R186H-S188D-E271F	++
V104L-A158E-R186H-H249R	++
S101A-S128N-A158E-S188D-Y209E-E271F	++
N062E-S101A-R186H-S188D-E271F	++
A016S-N062E-A158E-H249R-E271F	++
N062E-S128N-A158E	++
N062E-S128N-G159E-H249R	++

TABELA 11-3. Desempenho da limpeza SLT das variantes combinatórias de NHJ7.**PI = índice de desempenho****PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36b, 36d, ou 36e**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36b, 36d ou 36e, 16°C
N062E-S101A-A158E-S188D-H249R	++
S101A-S128N-A158E-H249R	++
N062E-A158E-R186H-S188D-H249R	++
A016S-V104L-A158E-R186H-E271F	++
N062E-L148I-G159E	++
N062E-S101A-A158E-R186H-H249R	++
N062E-S101A-R186H-S188D-H249R	++
V104L-A158E-R186H-S188D-H249R	++
N062E-S101A-V104L-R186H-S188D-E271F	++
T022A-S101A-A158E-R186H-H249R	++
S101A-S128N-A158E-Y209E	++
A158E-R186H-S188D-H249R-E271F	++
V104L-A158E-R186H-S188D-H249R-E271F	++
S101A-V104L-A158E-R186H-H249R	++
V104L-A158E-H249R	++
S101A-V104L-S128N-A158E-R186H-E271F	++
A016S-V104L-S188D-H249R	++
S101A-V104L-A158E-R186H-S188D-E271F	++

TABELA 11-3. Desempenho da limpeza SLT das variantes combinatórias de NHJ7.**PI = índice de desempenho****PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36b, 36d, ou 36e**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36b, 36d ou 36e, 16°C
V104L-S128N-G159E-E271F	++
V104L-A158E-R186H-H249R-E271F	++
A158E-R186H-H249R	++
S101A-A158E-R186H-H249R	++
V104L-A158E-S188D-H249R-E271F	++
A016S-S128N-A158E-R186H	++
V104L-S128N-R186H-S188D-H249R	++
A016S-S101A-S128N-R186H	++
A016S-N062E-S128N-R186H-E271F	++
A016S-S128N-R186H-E271F	+
S128N-P129E-R186H	+
A158E-R186H-H249R-E271F	+
A016S-A158E-H249R	+
A016S-A158E-R186H-H249R	+
A016S-T022A-A158E-R186H-E271F	+
E089P-S101A-P129E-R186H	+
T022A-S128N-A158E-R186H	+
S101A-V104L-S128N-A158E-R186H	+
T022A-S128N-R186H-S188D-	+
N062E-V104L-A158E-R186H-S188D- H249R	+
T022A-A158E-R186H-H249R-E271F	+

TABELA 11-3. Desempenho da limpeza SLT das variantes combinatórias de NHJ7.**PI = índice de desempenho****PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = + no detergente 36b, 36d, ou 36e**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36b, 36d ou 36e, 16°C
T022A-V104L-A158E-H249R	+
S101A-L111V-P129E	+
A016S-A158E-H249R-E271F	+
A016S-L111V-S188D-	+
T022A-V104L-R186H-S188D-H249R	+
V104L-L148I-S188D-H249R	+

Exemplo 12**Construção de bibliotecas e variantes adicionais de GG36**

[000689] Este exemplo descreve a construção de variantes e bibliotecas de GG36 em *B. subtilis* com o uso de uma ou mais das seguintes mutações (numeração de BPN'): A1R, Q2S, Q2M, Q2A, Q2R, Q2W, S3R, V4R, V4S, V4C, I8A, S9A, S9F, S9W, R10S, R10A, R10H, R10M, Q12F, Q12R, P14K, P14F, P14Q, A15R, A15F, A16S, H17R, H17M, H17F, N18R, N18K, G20F, G20K, G20R, T22A, T22R, T22Y, T22V, T22Q, T22L, T22W, G23A, G23S, G23F, S24R, S24F, S24W, S24Q, S24H, S24L, G25V, G25F, G25R, V26F, K27L, K27F, K27R, K27V, V28A, V28N, V28E, A29T, V30E, L31F, T33S, T33G, T33D, G34P, I35M, S36T, S36F, S36R, T38L, T38F, T38R, P40N, P40L, P40T, P40W, P40H, P40R, L42I, N43A, N43F, N43I, N43S, N43R, N43M, N43W, N43D, R45T, G46R, A48R, F50C, V51W, V51F, V51H, P52F, P52E, P52N, P55Y, T57R, Q59A, Q59F, Q59R, D60P, D60Q, D60A, N62E, N62Q, G63V, G63M, G63T, G63I, G63A, G63S, G63H,

G63Q, G63D, G63E, G63P, H64F, H64T, V68A, V68C, A69N, A69T, A69P, A69W, T71G, I72C, A74C, L75A, L75F, L75E, L75R, N76D, S78R, S78N, S78I, I79W, I79Q, V81R, L82F, L82T, L82V, L82R, L82M, A85M, P86W, P86L, P86I, E89P, E89T, E89G, E89H, E89L, E89V, E89W, E89F, E89I, Y91N, Y91F, A92F, K94N, S99F, S99T, S99P, S99G, S99M, G100S, G100N, G100Q, G100I, S101A, S101N, S101G, S101T, S101D, S101E, S101P, S101F, G102A, G102T, G102N, G102H, G102E, S103G, S103N, S103D, S103A, V104L, V104I, V104E, V104D, S105T, S105E, S105Q, S106G, S106T, S106E, S106D, S106A, S106V, S106F, I107M, I107F, A108I, A108G, Q109M, L111V, L111I, E112V, E112L, E112Q, A114G, G115K, G115R, N116K, N116A, N116L, N117F, G118R, G118I, M119C, H120A, H120F, H120R, V121F, V121E, N123G, N123E, L124S, S128D, S128F, S128L, S128N, S128H, S128M, S128I, S128Q, P129E, S132A, S132E, A138G, S144R, V147L, L148I, A158E, G159D, G159E, G159C, S160D, S166D, S166E, Y167W, M175V, V177C, D181A, Q182R, N183I, N183D, N183M, N183F, N183R, N185E, N185V, N185I, R186H, R186K, S188E, S188D, S188R, Y192H, Y192W, A194E, A194V, A194F, D197F, I198L, I198F, V203E, V203C, T208S, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, Y209L, P210R, P210V, P210L, G211Q, G211R, S212I, S212M, S212F, T213A, Y214F, A215N, A215D, A215E, A215H, A215F, S216F, S216A, L217E, L217N, L217D, N218D, N218P, N218E, T224A, T224G, V227I, A230E, A231I, A231C, A232V, L233C, V234F, K235F, Q236F, Q236N, Q236H, N238R, N238K, N238L, P239K, P239G, P239R, P239H, P239T, P239N, P239S, P239F, S240R, W241R, S242L, S242R, N243F, N243R, V244R, Q245R, I246S, N248D, N248V, N248I, N248R, H249R, H249T, L250I, K251R, K251S, N252I, N252F, N252R, N252K, N252H, T253I, T253R, T253F, A254C, S256N, G258R, T260V, T260I, L262D, L262H, Y263F, S265F, L267V, L267N,

L267M, N269I, N269R, A270C, E271I, E271V, E271H, E271M, E271L, E271P, E271A, E271F, E271T, A272F, A272F, A272R, A273F, A273I, e T274G. As variantes e bibliotecas foram construídas pela empresa DNA2.0, Inc., conforme descrito no Exemplo 11. As variantes geradas contendo uma ou mais destas mutações foram testadas para limpeza em água fria no teste em amostra de tecido com SLT (Exemplo 1) e as composições detergentes descritas na Tabela 1-2.

TABLE 12-1: Desempenho da limpeza de SLT das variantes WCE6 e WCE8.

PI = índice de desempenho

PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = + no detergente 36k ou 36l

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
A001R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
V004R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-E271L	+++
S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
V004R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-E271L	+++

TABLE 12-1: Desempenho da limpeza de SLT das variantes WCE6 e WCE8.**PI = índice de desempenho****PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
G020R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
S024R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-G025R-N116A-Y167W	+++
N018R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
T022R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
S078R-S103N-S106G-Y167W-Q236N	+++
N018R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
S024R-S101A-H120F-A194F-H249R	+++
G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
S101G-S103A-V104I-S212F-A232V-Q245R	+++
G020R-S144R-N185I-L233C-Q236N	+++
G023A-S078R-S216F-Q236N-H249R	+++
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-	+++

TABLE 12-1: Desempenho da limpeza de SLT das variantes WCE6 e WCE8.**PI = índice de desempenho****PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N269R	
S101G-S103A-V104I-G115R-A232V-Q245R	+++
P052N-S078R-S103N-L148I-T213A	+++
N018R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+++
S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+++
S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
G025R-E089I-N116A-P239S-A270C	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
L148I-T213A-N252R	+++
S024R-G025R-N183D-Y192W-P239S	+++
G046R-A194F-S212M	+++
V104L-L217E-T224A-H249R-N252R	+++
G023A-Y091F-V121F-Y192W-Q236N	+++
S101G-S103A-V104I-A232V-V244R-Q245R	+++
S099F-S144R-Y167W-N252R	+++
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-	+++

TABLE 12-1: Desempenho da limpeza de SLT das variantes WCE6 e WCE8.**PI = índice de desempenho****PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
H249R	
N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
T022W-S078R-Y167W-S212M-A270C	+++
V121F-N252R-A270C	+++
G020R-S103N-S216F-Q236N-N252R	+++
N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+++
G023A-P052N-Y192W-I198L-N252R	+++
G025R-G046R-V121F	+++
S024R-S078R-V104L-N116A-N183D	+++
G046R-Q059A-S103N-G211Q-S212M	+++
G020R-P052N-N062Q-Y091F-Y192W	+++
G023A-P052N-S144R-Y192W-S216F	+++
S101G-S103A-V104I-A232V-S242R-Q245R	+++
P052N-S103N-N116A-L148I-Y192W	+++
E089I-N116A-N117F-T224A-H249R	+++
S144R-G211Q-N238L-P239S-H249R	+++
N043A-N062Q-A194F-G211Q	+++
G020R-S024R-P052N-Q059A-S216F	+++
S024R-Y167W-T224A-H249R	+++

TABLE 12-1: Desempenho da limpeza de SLT das variantes WCE6 e WCE8.**PI = índice de desempenho****PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
T057R-Y167W-H249R	+++
G025R-S103N-R186K-A194F-T224A	+++
S105T-S128N-S144R-L148I-S212M	+++
G020R-Q059A-S144R-Y192W-T224A	+++
S024R-N043A-N117F-A194F-G211Q	+++
N117F-A194F-T213A-A270C	+++
S078R-Y091F-V121F-L233C-N252R	+++
T057R-S099F-S105T-I198L-T213A	+++
G023A-Y091F-S101A-I198L-N252R	+++
N062Q-S103N-V121F-S144R-H249R	+++
N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-S242R-Q245R	+++
G023A-S024R-N117F-S212M-S216F	+++
V104L-T213A-S216F	+++
A194F-G211Q-Q236N	+++
N062Q-S103N-N117F-A194F	+++
S024R-N062Q-V104L-S106G-H249R	+++
T057R-E089I-I198L	+++
G046R-Q059A-S106G-L217E-H249R	+++
N117F-T213A-A215F	+++
S101A-H120F-Y192W-A215F-T224A	+++
N043A-T057R-N117F-S144R-N183D	+++

TABLE 12-1: Desempenho da limpeza de SLT das variantes WCE6 e WCE8.**PI = índice de desempenho****PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
G046R-N183D-N238L	+++
G025R-N043A-E089I-N117F	+++
S078R-V104L-T213A-A215F-T224A	+++
Y091F-S099F-S101A-S105T-Y167W	+++
S106G-N117F-N238L	+++
G046R-E089I-Y091F-S101A-N116A	+++
G020R-N062Q-E089I-R186K-S212M	+++
T057R-S099F-V121F-N185I-Y192W	+++
G046R-E089I-Y192W-L233C-A270C	+++
E089I-N117F-N185I-A215F-L233C	++
P052N-V104L-N183D-S216F-H249R	++
S078R-S099F-N116A-R186K-T224A	++
G025R-S105T-S128N-S144R-A270C	++
S105T-G211Q-S216F	++
S024R-G046R-Y091F-V121F	++
S106G-N185I-S216F-Q236N	++
N062Q-S101A-Q236N-N252R-A270C	++
G025R-N043A-Y091F-I198L-A270C	++
G020R-G023A-V104L-Y192W-L233C	++
S024R-N043A-S105T-S106G-I198L	++
G020R-E089I-L217E	++
S024R-Y091F-I198L-A215F-P239S	++

TABLE 12-1: Desempenho da limpeza de SLT das variantes WCE6 e WCE8.**PI = índice de desempenho****PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
G046R-E089I-S099F-R186K-S212M	++
V104L-H120F-R186K-S216F-N252R	++
T022W-A194F-T213A-L233C-N238L	+
S099F-S105T-S106G-A194F-S212M	+
E089I-S105T-N116A-A215F-S216F	+
G025R-N116A-H120F-T224A-A270C	+
N043A-Q059A-S101A-S216F-T224A	+
T057R-N183D-Q236N	+
G025R-N062Q-S128N-S144R-N185I	+
S103N-H120F-Y167W-I198L-L233C	+
T022W-E089I-S216F	+
S024R-S106G-N116A-S212M-T224A	+
G020R-P052N-S101A-I198L-L233C	+
E089I-Y091F-N185I-G211Q-A270C	+
L111I-A215F-P239S	+
S024R-N116A-R186K-L233C-Q236N	+
G023A-S103N-S106G-S212M-A215F	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116S-T213A-A215F-A232V-Q245R	+++
N018R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
S024R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-A232V-Q245R	+++
G020R-T22W-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-A232V-Q245R	+++
N018R-V104I-A232V-H249R	+++
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-H249R	+++
N018R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R	+++
N018R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N018R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
G020R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
S024R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
N018R-S103A-A232V-H249R	+++
N018R-S101G-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-S024R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R-H249R	+++
N018R-T22K-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N043R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
G020R-T22W-S101G-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R	+++
S024R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
G020R-T22W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V	+++
N018R-S024R-N076D-N116A-A215F-H249R	+++
N018R-N043R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
S024R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R	+++
G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-T213A-A215F-A232V-Q245R	+++
N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-H249R	+++
N018R-S024R-N076D-N116A-G211Q-H249R	+++
N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-	+++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
S103A-V104I-A232V-Q245R	
N018R-S101G-Q245R	+++
G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-G211Q-T213A-A232V-Q245R	+++
G020R-S024R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	+++
R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
N018R-S101G-S103A-H249R	+++
N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-N116A-A232V-Q245R	+++
N018R-S101G-V104I-A232V-H249R	+++
G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R	+++
N018R-S024R-N076D-G211Q-T213A-H249R	+++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
G020R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-S101G-V104I-T213A-A215F-A232V-Q245R	+++
G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-A215F-A232V-Q245R	+++
S024R-S103A-V104I-H249R	+++
N018R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
S024R-S101G-V104I-Q245R	+++
G020R-S101G-S103A-V104I-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	+++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
S024R-S103A-V104I-A232V-H249R	+++
N018R-S024R-N076D-N116A-G211Q-A215F-H249R	+++
N018R-Q245R	+++
S024R-S103A-Q245R	+++
S024R-S103A-V104I-Q245R	+++
G020R-S078R-S101G-A232V-Q245R	+++
N018R-S024R-N076D-V104I-H249R	+++
N018R-S024R-V104I-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-S024R-N076D-G211Q-A215F-H249R	+++
R019H-G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R	+++
N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-H249R	+++
N018R-S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-T22W-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-S103A-V104I-H249R	+++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R	+++
N018R-S024R-S101G-V104I-A232V	+++
S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
S024R-N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-G020R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R	+++
N018R-S024R-S101G-V104I	+++
G020R-S101A-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R	+++
N018R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-S101G-S103A-Q245R	+++
N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-G211Q-A215F-A232V-Q245R	+++
G020R-T22W-S078R-S101G-S103A-	+++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
V104I-N116A-T213A-A215F-A232V-Q245R	
G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R	+++
G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R	+++
N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-S101G-S103A-A232V-Q245R	+++
G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R	+++
N018R-G020R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-S101G-V104I-H249R	+++
G020R-T22W-S078R-S101G-S103A-	+++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R	
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-I198L-G211Q-T213A-A232V-Q245R	+++
G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R	+++
S024R-N076D-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-G020R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-S024R-N076D-S101G-V104I-A232V-H249R	+++
N018R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
A001T-N018R-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R	+++
N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-A232V-Q245R	+++
N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N018R-N076D-S101G-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R	+++
N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-A215F-H249R	+++
R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R	+++
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R	+++
G020R-S101G-I198L-A215F-A232V-Q245R	+++
N018R-S024R-N076D-T213A-A215F-H249R	+++
G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-G211Q-A232V-Q245R	+++
G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-	+++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R	
G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R	+++
S024R-A232V-Q245R	+++
N018R-S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
N018R-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R	+++
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R	+++
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-S024R-N076D-G211Q-T213A-A215F-H249R	+++
N018R-S024R-N076D-N116A-T213A-A215F-H249R	+++
N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+++
G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-	+++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R	
N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-A215V-H249R	+++
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-H249R	+++
G020R-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-G211Q-A215F-A232V-Q245R	++
S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-A232V-Q245R	++
N018R-T22W-S024R-N076D-I198L-A215F-H249R	++
G020R-T022W-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-G211Q-T213A-A232V-Q245R	++
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	++
N018R-N043R-R045T-N076D-S101G-	++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
S103A-V104I-A232V-Q245R	
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-T213A-A215F-H249R	++
N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R	++
G020R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-T180A-A232V-Q245R	++
G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R	++
N018R-S101G-S103A-V104I	++
G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	++
N018R-S024R-N076D-S103A-A232V-Q245R	++
G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R	++
N018R-S024R-N076D-G211Q-H249R	++
G020R-S101A-S103A-V104I-T213A-	++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
A215F-A232V-Q245R	
N018R-G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-G211Q-A232V-Q245R	++
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-A215F-A232V-Q245R	++
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-A232V-Q245R	++
N018R-S024R-N076D-A232V-H249R	++
N018R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
N018R-N076D-Q245R	++
S024R-V104I-Q245R	++
S101G-A232V	++
G020R-T22W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-A215F-A232V-Q245R	++
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R	++
G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-	++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
V104I-I198L-A232V-Q245R	
S024R-Q245R-H249R	++
G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-G211Q-A232V-Q245R	++
N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-G211Q-H249R	++
S024R-S101G-V104I-H249R	++
N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R	++
N018R-S024R-V104I	++
G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N183D-I198L-T213A-A215F-A232V-Q245R	++
N018R-G020R-T22W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R	++
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
Q012H-G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-I198L-G211Q-T213A-A232V-Q245R	++
N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-A215F-H249R	++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N018R-S024R-N076D-T213A-H249R	++
S024R-V104I-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-G211Q-H249R	++
N018R-N076D-S103A-V104I-H249R	++
N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R	++
G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R-E271G	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-A215F-H249R	++
N018R-S024R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R	++
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R	++
G020R-N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	++
N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-N116A-A215F-H249R	++
N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R	++
N018R-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R	++
S024R-S103A-M175L-A232V-H249R	++
N018R-S024R-N076D-N116A-T213A-H249R	++
G020R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	++
S024R-N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-	++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
I198L-T213A-A215F-H249R	
N043R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-Q245R	++
G020R-S024R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
S024R-A232V	++
G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R	++
S024R-N076D-S101G-A232V-Q245R	++
N018R-N076D-S101G-S103A-V104I-H249R	++
N018R-S024R-N076D-I198M-G211Q-T213A-A215F-H249R	++
N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R	++
N018R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
G020R-T022W-S103A-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R	++
R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-H249R	++
N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-A215F-H249R-V268G	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-H249R	++
S101G-S103A-V104I-Q245R	++
N018R-N076D-S101G-A232V-Q245R	++
N018R-G020R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-H249R	++
S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-	++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
Q245R-H249R	
N018R-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R	++
G020R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
N018R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	++
R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
S024R-S103A-A232V	++
N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-H249R	++
N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	++
N018R-N043R-R045T-N076D-S076T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-A273T	++
N018R-G020R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N183D-A215F-A232V-Q245R	++
N018R-S024R-N076D-S101G-A232V	++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
A232V-Q245R	++
N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-V234I-Q245R	++
S024R-N076D-S103A-V104I-Q245R	++
G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-G211Q-T213A-A232V-Q245R	++
N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R-A272V	++
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R	++
N018R-S103A-V104I-A232V	++
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R	++
S024R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-T213A-A215F-H249R	++
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R	++
G020R-T22W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-	++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
Q245R	
G020R-T022W-S078R-S101G-S103A-V104I-G211Q-T213A-A232V-Q245R	++
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R	++
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R	++
N018R-S024R-N076D-N116A-M117I-N183D-T213A-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-H249R	++
N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-I198L-T213A-A215F-H249R	++
N018R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	++
N018R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	++
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-A232V-Q245R	++
N018R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-	++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
Y209H-T213A-H249R	
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R	++
S024R-N076D-S101G-M175L-A232V-Q245R	++
N018R-N043D-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-A215F-A232V-Q245R	++
N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	++
N018R-S024R-N076D-I198L-T213A-A215F-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-A215F-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-T213A-A215F-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-	++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N116A-I198L-T213A-A215F-H249R	
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-H249R	++
N018R-S024R-Q245R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-A215F-H249R	++
S024R-N076D-V104I-Q245R	++
K027R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R	++
N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-H249R	++
N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R	++
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	++
N018R-N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-T213A-A215F-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-A215F-H249R	++
G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R	++
N018R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
N018R-S101G-V104I	++
G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	++
G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-H249R	++
N018R-S024R-N076D-I198L-G211Q-T213A-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R	++
N018R-N076D-H249R	++
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-	++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N116A-N183D-I198L-H249R	
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-H249R	++
G020R-T022W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	++
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-A114T-T213A-A215F-A232V-Q245R	++
N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-H249R	++
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-H249R	++
G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-H249R	++
N018R-T022K-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
N018R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-	++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
A232V	
N018R-S024R-N076D-N116A-H249R	++
G020R-S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-T213A-A215F-H249R	++
N018R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
G020R-T22W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R	++
G020R-S101G-S103A-V104I-N183D-G211Q-A232V-Q245R-	++
N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-T213A-H249R	++
N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-H249R	++
N018R-S024R-R045T-N076D-S101G-	++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	
N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-H249R	++
N018R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
G020R-S078R-S101G-S103A-V104I-N116A-A131V-N183D-T213A-A232V-Q245R	++
N018R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-H249R	++
N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	++
S024R-S101G-Q245R	++
S024R-N076D-S101G-Q245R	++
N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	++
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-A215F-H249R	++
S024R-S101G	++
N018R-T22W-S024R-N076D-T213A-	++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
A215F-H249R	
G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N183D-I198L-T213A-A215F-A232V-Q245R	++
N018R-N043D-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-I198L-G211Q-A215F-A232V-Q245R	++
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R	++
N018R-G020R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R	++
N018R-V104I	++
N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-	++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
A215F-H249R	
N018R-S024R-N076D-L088I-S101A-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-H249R	++
N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
N018R-N076D-S101G-V104I-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-T213A-A215F-H249R	++
N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-A215F-H249R	++
N018R-G020R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	++
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R-N269R	++
S024R-N076D-Q245R	++
N018R-G020R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
N018R-G020R-S024R-N076D-A215F-H249R	++
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-	++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N183D-I198L-T213A-H249R	
N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-A215F-H249R	++
N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
G020R-T22W-S078R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R	++
N018R-S024R-N076D-I198L-G211Q-A215F-H249R	++
N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-T213A-H249R	++
G020R-T022W-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R	++
N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-N218S-A232V-Q245R	++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N018R-S103A	++
G020R-T22W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R	++
N018R-S024R-N076D-S101A-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-G211Q-T213A-H249R	++
S024R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R	++
G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	++
K027R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	++
G020R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	++
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R	++
N018R-S024R-N076D-V104I	++
S101G-S103A-V104I-A232V-H249R	++
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-	++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
G211Q-H249R	
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-A215F-H249R	++
N018R-S024R-N076D-N183D-T213A-A215F-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-G211Q-H249R	++
N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R-R275S	++
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R	++
N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-H249R	++
N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-H249R	++
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-H249R	++

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
V004M-N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-H249R	++
V104I-A232V-H249R	++
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A215F-A232V-Q245R	++
G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R-T274I	+
G020R-S101A-S103A-V104I-T213A-A232V-Q245R	+
G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R	+
G020R-S024R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N018R-S024R-N076D-S103A-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
T213A-A215F-H249R-A270V	
N018R-N043D-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N183D-A232V-Q245R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-T213A-H249R	+
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R	+
N018R-T22W-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-H249R	+
N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
N018R-S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V	+
S101G-H249R	+
S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
M175L-H249R	
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R-N269S	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-T213A-A215F-H249R-T260K	+
N018R-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-H249R	+
S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-Q245R	+
S024R-N076D-S103A-H249R	+
N018R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N018R-S024R-N076D-I198L-G211Q-H249R	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-H249R	+
G020R-S024R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-A272D	+
N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R	+
N018R-T22W-S024R-N076D-S101A-I198L-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-H249R	+
S024R-N076D-S101G-S103A-A232V	+
S024R-S103A-V104I	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R	+
S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = + no detergente 36k ou 36l

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
S024R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	+
G020R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R	+
N018R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N018R-S024R-N076D-I198L-T213A-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-H249R	+
G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
S024R-N076D-S103A-Q245R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
S103A-V104I-Q245R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
A016T-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-A215F-H249R	+
N043R-N076D-S101G-S103T-V104I-A232V-Q245R-H249R-N269R	+
G020R-S078R-S101A-S103A-V104I-G115E-N116A-N183D-G211Q-T213A-	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
A232V-Q245R	
N018R-S024R-N076D-I198L-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-H249R	+
G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R	+
N018R-S024R-N076D-S101G	+
N076D-S101G-A232V-Q245R	+
N018R-N076D-S101G-S103A-V104I-Q245R	+
N018R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N018R-S024R-N076D-A215F-H249R	+
N018R-V104I-A232V	+
N043D-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
S024R-N076D-S101G-A232V-H249R	+
S103A-A232V-Q245R	+
G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R	
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
S024R-N076D-S103A-V104I-H249R	+
S024R-S101G-S103A-V104I	+
G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A215F-A232V-Q245R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-A215F-H249R	+
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	+
G020R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-A131T-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N018R-S024R-N076D-I198L-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N043R-S101G-S103A-V104I-Q245R-H249R	+
N018R-N076D-A232V-H249R	+
N018K-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R-N269R	+
N018R-G020R-S024R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R-L267I	+
A232V-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N076D-V104I-Q245R	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-H249R	+
S024R-S101G-S103A-A232V	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R	+
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A215F-A232V-Q245R	+
N018R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-H249R	+
S103A-A232V-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-T213A-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-T213A-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R	+
N018R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
N018R-G020R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R	+
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A232V-Q245R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-I198L-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-H249R	+
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R-T274I	+
S024R-S103A-Q245R-H249R	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-H249R	+
N018R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-H249R	+
N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N018R-S024R-N076D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-H249R	+
S103A-A232V	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N183D-A215F-H249R	
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-H249R	+
N018R-N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-A215F-H249R	+
N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-T213A-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-I198L-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-I198L-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
G211Q-H249R	
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A215F-A232V-Q245R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-H249R	+
N018R-S024R-N076D-A232V	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-H249R	+
G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	+
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R-N263S	+
S024R-N076D-S101G-V104I-A232V-H249R	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
S024R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-I198L-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-V197A-T213A-A215F-H249R	+
S024R-S101G-S103A	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-A215F-H249R	+
N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R	+
S024R-V104I-A232V	+
N018R-S024R-N076D-N183D-G211Q-H249R	+
G020R-N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N116A-A150T-T213A-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N183D-T213A-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-H249R	+
S024R-N076D-A232V-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116T-I198L-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-T022R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-H249R	+
G020R-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A232V-Q245R	+
N076D-S101G-S103A-Q245R	+
G020R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-H249R	+
N018R-T22W-S024R-N076D-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-G211Q-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-H249R	+
N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
L217E-A232V-Q245R	
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R	+
N076D-S101G-V104I-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N183D-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-H249R	+
G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-A232V-Q245R	+
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R	+
N018R-G020R-S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N018R-N076D-S078R-S101G-S103A-	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
V104I-L217E-A232V-Q245R	
G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-A232V-Q245R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-Y209H-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N183D-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N076D-Q245R	+
N076D-S101G-V104I-Q245R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R	
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-T213A-H249R	+
G020R-S024R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R	+
G020R-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R	+
S101G-S103A-V104I	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N204D-T213A-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A209V-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R	
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R	+
N018R-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
H249R	
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-I198L-T213A-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-G211Q-A215F-H249R-N269D	+
N018R-G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-H249R	+
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N183D-A215F-A232V-Q245R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-Y209H-G211Q-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R	+
N076D-A232V-Q245R	+
N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-A215F-Q245R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-T213A-H249R	+
G020R-S024R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R	+
G020R-A090S-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R	+
N043D-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-A215F-H249R	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-H249R	+
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	+
N018R-G020R-S024R-N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R	+
N076D-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-H249R	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = + no detergente 36k ou 36l

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-G020R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R	+
N076D-S103A-V104I-Q245R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101G-Q245R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R	+
N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N116A-I198L-T213A-A215F-H249R	
N076D-V104I-A232V-Q245R	+
K027R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S103A-V104I-L135I-A232V	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-H249R	+
P005S-N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-T213A-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
A215F-H249R	
N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-I198L-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
I198L-G211Q-A215F-H249R	
N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-A215F-H249R	+
N018R-G020R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N183D-I198L-A215F-A232V-Q245R	+
N076D-S101G-S103A-V104I-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-I198L-A215F-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-G211Q-N243D-H249R	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N018R-G020R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
S024R-N076D-S101G	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-I198L-T213A-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-A215F-H249R	+
N018R-N043D-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-Q245R	+
G020R-S024R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N018R-G020R-R045T-S101G-S103A-	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
V104I-A232V-Q245R-H249R	
N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R-N269S	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N183D-T213A-A215F-A232V-Q245R	+
N018R-S024R-N076D-A086V-S101A-N183D-I198L-G211Q-H249R	+
N018R-N076D-S101G-I198T-A232V	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N018R-S024R-N076D-N183D-H249R-A248T	+
N018R-N076D-V104I-Q245R-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R	+
N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R	+
N043R-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N018R-N076D-S101G-V104I	+
G020R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N043D-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-H249R	+
N018R-N076D-V104I	+
N018R-G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N183D-G211Q-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
S101G-V104I	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R-N263D	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-A215F-H249R-R269H	+
N018R-N043D-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N018R-S024R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-I198L-T213A-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-G211Q-H249R	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-H249R	+
G020R-T022W-S101G-S103A-V104I-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	+
V104I-A232V	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-H249R	+
N043D-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-H249R	+
N018R-G020R-N043R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R	+
S024R-N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
N043R-R045T-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-Y166F-A176P-A179V-N184T-A187P-A194P	+
N018R-T022W-S024R-D041E-N076D-S101A-S160T-N183D-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-I198L-T213A-H249R	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = + no detergente 36k ou 36l

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-G211Q-A215F-H249R	+
S024R-N076D-V104I	+
N018R-N076D-S101G-A232V	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-A215F-H249R	+
N018R-S024R-L031F-N076D-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-T213A-H249R-N269S	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-A215F-H249R	+
N018R-N043R-N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N114T-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
S024R-N043R-S078R-S101G-S103A-	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
V104I-L217E-A232V-Q245R	
S024R-N076D-S103A-V104I-A232V	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
S101G-V104I-A232V	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-T213A-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N183D-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-A215F-H249R-T260A	+
N076D-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = + no detergente 36k ou 36l

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
G211Q-A215F-H249R	
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-T213A-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-H249R	+
N076D-V104I-H249R	+
G020R-T022W-S101A-S103A-V104I-N116A-N183D-G211Q-T213A-A215F-A232V-Q245R	+
S024R-N043R-R045T-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N183D-I198L-A215F-H249R	+
N018R-N076D-S101G-S103A	+
G020R-S024R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
S101G-S103A-A232V	+
S024R-N076D-S101G-A232V	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N183D-I198L-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-N116A-A156V-N183D-G211Q-A215F-H249R-N269S	+
R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-I198L-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-I198L-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-G211Q-A215F-H249R	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-N116A-H249R	+
N018R-N076D-S101G	+
N018R-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R	+
N018R-G020R-T022W-S024R-N076D-S101A-N116A-I198L-T213A-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-H249R	+
N018R-N076D-A232V	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-A232V-Q245R	+
N018R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N183D-T213A-A215F-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S101A-N116A-G211Q-T213A-N237D-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-G211Q-H249R-R275S	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-A215F-H249R	
S024R-N076D	+
N018R-S024R-N076D-N183D-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-N116A-N183D-I198L-T213A-A215F-H249R	+
N076D-V104I-A232V-H249R	+
N018R-N076D-S103A-A232V	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N116A-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-N183D-T213A-H249R	+
N018R-G020R-S024R-N076D-S101A-D175E-N183D-G211Q-A215F-H249R	+
N018R-G020R-N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-L217E-A232V-Q245R-A273E	+
G020R-S024R-N043D-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
P005S-S101G-S103A-V104I-A232V-	+

TABELA 12-2: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca WCE10 a WCE14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
Q245R-H249R	
S103A-V104I-A232V	+
N018R-G020R-S024R-V068A-N076D-S101A-N116A-T213A-A215F-H249R	+
N018R-T022W-S024R-N076D-S101A-I198L-A215F-H249R-R275S	+
N018R-S024R-N076D-N183D-I198L-G211Q-T213A-H249R	+
N043D-R045T-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+

TABELA 12-3: Desempenho da limpeza de SLT das variantes WCE15 e WCE16.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36m**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; detergente 36m, SLT, 16°C
N018R-S024R-N043R-N076D-H249R-N269R	+++
N018R-T022R-S024R-N043R-N076D-H249R	+++

TABELA 12-3: Desempenho da limpeza de SLT das variantes WCE15 e WCE16.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36m**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; detergente 36m, SLT, 16°C
N018R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
N043D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
T022R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N043R-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
T022R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N076D-S078R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-S024R-N043R-N076D-H249R	+++

TABELA 12-3: Desempenho da limpeza de SLT das variantes WCE15 e WCE16.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36m**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; detergente 36m, SLT, 16°C
N018R-S024R-N076D-S242R-H249R	+++
N018R-S024R-N076D-H249R-N269R	+++
N018R-T022R-S024R-N076D-H249R	+++
N018R-S024R-N076D-S078R-H249R	+++
N018R-S024R-N043D-N076D-H249R-N269R	+++
N018R-T022R-S024R-N043D-N076D-H249R	+++
N018R-S024R-N043D-N076D-S078R-H249R	+++
G020R-S101G-S103G-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-S101G-S103A-V104L-A232V-Q245R	+++
G020R-S101G-S103A-V104V-A232V-Q245R	+++
G020R-S101G-S103S-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-S101G-S103S-V104L-A232V-Q245R	+++
G020R-S101S-S103S-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-S101S-S103S-V104L-A232V-	+++

TABELA 12-3: Desempenho da limpeza de SLT das variantes WCE15 e WCE16.

PI = índice de desempenho

PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = + no detergente 36m

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; detergente 36m, SLT, 16°C
Q245R	
G020R-S101A-S103A-V104L-A232V-Q245R	+++
G020R-S101S-S103S-V104V-A232V-Q245R	+++
G020R-S101S-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-S101S-S103A-V104V-A232V-Q245R	+++
G020R-S101S-S103G-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-S101S-S103G-V104V-A232V-Q245R	+++
G020R-S101A-S103A-V104V-A232V-Q245R	+++
G020R-S101A-S103S-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-S101A-S103S-V104V-A232V-Q245R	+++
N018R-S024R-N043R-N076D-S078R-H249R	++
S024R-N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++

TABELA 12-3: Desempenho da limpeza de SLT das variantes WCE15 e WCE16.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36m**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; detergente 36m, SLT, 16°C
N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-H249R	++
S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-S242R-Q245R	++
N018R-G020R-S024R-N076D-L217E-H249R	++
N018R-S024R-N043R-N076D-L217E-H249R	++
N018R-S024R-N043D-N076D-S242R-H249R	++
N018R-G020R-S024R-N043R-N076D-H249R	++
G020R-S101A-S103G-V104V-A232V-Q245R	++
N043D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
N018R-S024R-N076D-L217E-H249R-N269R	+
N018R-S024R-N076D-L217E-S242R-H249R	+

TABELA 12-4: Desempenho da limpeza de SLT das variantes das bibliotecas WCE20 e WCE21.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36m ou 36n**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36m ou 36n, 16°C
G020R-S101A-S103A-V104I-G118R-A232V-Q245R	+++
G020R-S024R-N116A-T213A	+++
N043R-S101A-N116A-A215F-N269R	+++
S024R-N043R-S101A-N116A	+++
S024R-N043R-S101A-N116A-A215F-N269R	+++
G020R-S101G-S103A-V104I-A215F-A232V-Q245R	+++
N043R-S101A-N269R	+++
S024R-N043R-N116A-T213A-N269R	+++
G020R-S024R-N043R-R045T-S101A-T213A	+++
S024R-N043R-N116A-A215F-N269R	+++
G020R-S024R-T213A-A215F	+++
G020R-N116A-N269R	+++
S024R-N116A-T213A-N269R	+++
N043R-S101A-N116A-N269R	+++
S101G-S103A-V104I-N116A-T213A-A232V-Q245R-N269R	+++
S024R-N043R-R045T-S101A-N116A-A215F-N269R	+++

TABELA 12-4: Desempenho da limpeza de SLT das variantes das bibliotecas WCE20 e WCE21.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36m ou 36n**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36m ou 36n, 16°C
G020R-N043R-S101A-N269R	+++
S101A-S103A-V104I-T213A-A232V-Q245R-N269R	+++
S024R-A215F-N269R	+++
N043R-S101A-N116A-T213A-A215F-N269R	+++
N043R-S101A-T213A-N269R	+++
G020R-S024R-N043R-R045T-N116A-T213A	+++
S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
S024R-N043R-R045T-S101A-N116A-T213A-N269R	+++
S024R-N043R-R045T-N269R	+++
G020R-N043R-R045T-S101A-N269R	+++
S024R-N043R-N116A-N269R	+++
G020R-S024R-N043R-R045T	+++
N043R-N116A-N269R	+++
S024R-N043R-S101A-A215F-N269R	+++
S024R-N043R-R045T-T213A-A215F-N269R	+++
G020R-S024R-R045T-N269R	+++
G020R-N043R-S101A-N116A-T213A-A215F	+++
G020R-S101G-S103A-V104I-T213A-A215F-A232V-Q245R	+++

TABELA 12-4: Desempenho da limpeza de SLT das variantes das bibliotecas WCE20 e WCE21.**PI = índice de desempenho****PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36m ou 36n**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36m ou 36n, 16°C
G020R-S024R-R045T-N116A-N269R	+++
G020R-S101A-N116A-N269R	+++
S024R-N043R-A215F	+++
G020R-S024R-T213A	+++
S024R-N043R-S101A-A215F	+++
G020R-S024R-N043R-R045T-N116A	+++
G020R-S024R-N043R-R045T-S101A-N269R	+++
G020R-S024R-S101A-A215F	+++
G020R-S024R-N116A-T213A-A215F	+++
G020R-S024R-N116A	+++
G020R-S024R-S101A-N116A	+++
N043R-T213A-A215F-N269R	+++
S024R-S101A-N269R	+++
S024R-N043R-N116A-A215F	+++
G020R-T038A-N043R-S101A	+++
G020R-S024R-N116A-A215F	+++
S024R-N043R-S101A-T213A	++
P014L-G020R-S024R-N043R-R045T-S101A-A215F	++
G020R-S024R-A215F	++
G020R-N116A-A215F-N269R	++

TABELA 12-4: Desempenho da limpeza de SLT das variantes das bibliotecas WCE20 e WCE21.

PI = índice de desempenho

PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = + no detergente 36m ou 36n

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36m ou 36n, 16°C
G020R-R045T-N116A-N269R	++
G020R-S024R-N043R-R045T-A215F	++
G020R-S024R-N043R-R045T-N116A-T213A-A215F	++

TABELA 12-5. Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca NHJ8.

PI = índice de desempenho

PI > ou = 1,3 é +++; PI entre 1,29 e 1,2 = ++; PI entre 1,19 e 1,0 = + no detergente 36f

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36f, 16°C
N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	+++
S024R-N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F-E271F	+++
S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-	++

TABELA 12-5. Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca NHJ8. PI = índice de desempenho PI > ou = 1,3 é +++; PI entre 1,29 e 1,2 = ++; PI entre 1,19 e 1,0 = + no detergente 36f	
sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36f, 16°C
A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	
N076D-S101G-S103A-V104I-A114V-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	++
S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	+
S024R-N043R-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
S024R-N043R-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
S024R-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
N076D-S101G-S103A-V104I-S128L-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	+
N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	+

TABELA 12-6. Desempenho da limpeza de SLT das variantes das bibliotecas NHJ8, NHJ9, NHJ14.

PI = índice de desempenho

PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = + no detergente 36c

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36c, 16°C
T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-L217E-A232V-Q245R-N248D-E271F	+++
T022A-N043R-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-E271F	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F	+++
N043R-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F	++

TABELA 12-6. Desempenho da limpeza de SLT das variantes das bibliotecas NHJ8, NHJ9, NHJ14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36c**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36c, 16°C
T022A-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F	++
T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F	++
T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F	++
N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	++
N043R-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S024R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	++
N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	++
N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	++
S101G-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-	++

TABELA 12-6. Desempenho da limpeza de SLT das variantes das bibliotecas NHJ8, NHJ9, NHJ14.

PI = índice de desempenho

PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = + no detergente 36c

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36c, 16°C
A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	
S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	++
S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	++
S101G-S103A-V104I-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
N076D-S101G-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	+
N043R-N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S166D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
N076D-S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	+

TABELA 12-7. Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca NHJ9.

PI = índice de desempenho

PI > ou = 1,3 é +++; PI entre 1,29 e 1,2 = ++; PI entre 1,19 e 1,0 = + para o detergente 36f

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT; detergente 36f, 16°C
H017R-T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F	+++
T022A-N043R-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F	++
T022A-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	++
H017R-T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F	++
T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	+
T022A-S101G-G102A-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F	+
T022A-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271F	+

TABELA 12-8. Desempenho da limpeza de SLT das variantes NHJ11. PI = índice de desempenho PI> ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = + no de- tergente 36a ou 36c	
sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36a ou 36c1 sem alvejante 16°C
S101S-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S101S-S103G-V104V-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S101G-S103S-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S101A-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S101A-S103A-V104L-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S101G-S103G-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S101S-S103G-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S101S-S103S-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S101S-S103S-V104V-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S101A-S103S-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S101A-S103S-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++

S101S-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S101G-S103A-V104L-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S101A-S103A-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
S101A-S103S-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
S101G-S103S-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
S101S-S103A-V104L-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
S101A-S103G-V104V-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
S101S-S103A-V104V-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+

TABELA 12-9. Desempenho da limpeza de SLT das variantes NHJ12.

PI = índice de desempenho

PI > ou = 1,3 é +++; PI entre 1,29 e 1,2 = ++; PI entre 1,19 e 1,0 = + no detergente 36a

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36a, 16°C
V026F-V051W-V104L-S106E	+++
V026F-L031F-S078N-G102A-S160D	+++
G020K-G100S-N116L-A158E-S166D-N243F	+++
T033S-N043W-N218D-P239G-N243F	+++
T022L-T038F-A048R-N062E-G100S-R186K	+++

TABELA 12-9. Desempenho da limpeza de SLT das variantes NHJ12.**PI = índice de desempenho****PI > ou = 1,3 é +++; PI entre 1,29 e 1,2 = ++; PI entre 1,19 e 1,0 = +
no detergente 36a**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36a, 16°C
S101D-S103N-N116L-S144R-A215D	+++
V104L-S105T-T213A-L217E-S256N	+++
N043W-S101D-S212M-N243F	+++
V026F-A048R-S105T-T213A-N218D-T224A	+++
S024F-S101D-G118R-A215D-L250I-A272F	++
V121F-N185E-T224A-P239G	++
T022L-L031F-G102A-S128D-T224A-N243F	++
N062E-S078N-G102A-N116L-S144R-L250I	++
T022L-T038F-V121F-S160D-A272F	++
V026F-S078N-G159C-R186K-N243F	++
S024F-A048R-G118R-S166D-L217E	++
G023A-T038F-S078N-G100S-S212M-A215D	++
G100S-N116L-A158E-T213A	++
S078N-V104L-G118R-S128D	++
G102A-S103N-S105T-A194E	++
T022L-S078N-S128D-T213A	+
K027R-G100S-G118R-S160D-S188D-N243F	+
S024F-G102A-R186K-T213A-L217E-N243F	+
T033S-S105T-S188D-S216F	+
G023A-G100S-A194E-S212M	+

TABELA 12-9. Desempenho da limpeza de SLT das variantes NHJ12.**PI = índice de desempenho****PI > ou = 1,3 é +++; PI entre 1,29 e 1,2 = ++; PI entre 1,19 e 1,0 = +
no detergente 36a**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36a, 16°C
A048R-S128D-N185E-P239G	+
G020K-S024F-T033S-P129E-A194E	+
G020K-K027R-P129E-S166D-P239G	+
T022L-G023A-K027R-S101D-V104L-S216F	+
T033S-G118R-P129E-A194E-P239G	+
T022L-S078N-N116L-P129E-S256N	+
K027R-S101D-S103N-S105T-A272F	+
A048R-S078N-N116L-N185E-L217E-P239G	+
G023A-S024F-K027R-N062E	+
S024F-S103N-V104L-G118R-S188D	+
V026F-V104L-S256N-A272F	+
S024F-N043W-V104L-V121F-P129E	+
N062E-S078N-N116L-T224A	+
G023A-S024F-V051W-A158E	+
K027R-T038F-G102A-N116L	+
N062E-S078N-S144R-S212M	+
L031F-N116L-S256N-A272F	+
T022L-T033S-V104L-N116L-S160D-R186K	+
S024F-G118R-P129E-R186K-T213A	+
N043W-S105T-T213A-A215D-S216F	+
L031F-S105T-R186K-S188D	+

TABELA 12-9. Desempenho da limpeza de SLT das variantes NHJ12.

PI = índice de desempenho

PI > ou = 1,3 é +++; PI entre 1,29 e 1,2 = ++; PI entre 1,19 e 1,0 = + no detergente 36a

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36a, 16°C
V026F-A194E-T213A-S256N	+
S103N-S160D-L250I-S256N	+

TABELA 12-10. Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca NHJ15.

PI = índice de desempenho

PI > ou = 1,3 é +++; PI entre 1,29 e 1,2 = ++; PI entre 1,19 e 1,0 = + no detergente 36a

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36a, 16°C
T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F	+++
T022A-S024R-S103A-V104I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F	+++
T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D	+++
T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-	+++

TABELA 12-10. Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca NHJ15.

PI = índice de desempenho

PI > ou = 1,3 é +++; PI entre 1,29 e 1,2 = ++; PI entre 1,19 e 1,0 = + no detergente 36a

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36a, 16°C
G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D	
T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++
T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D	++
T022A-N043R-S101D-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F	++
T022A-S024R-N043R-S101D-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D	++
T022A-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-N248D	++
T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F	++
T022A-S024R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F	++
T022A-N043R-N062E-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-	++

TABELA 12-10. Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca NHJ15.**PI = índice de desempenho****PI > ou = 1,3 é +++; PI entre 1,29 e 1,2 = ++; PI entre 1,19 e 1,0 = + no detergente 36a**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36a, 16°C
E271F	
T022A-N043R-S103A-V104I-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D	++
T022A-S024R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F	++
T022A-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D	++
T022A-S024R-S101D-S103A-V104I-G118R-S128I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D	++
T022A-S024R-N043R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F	++
T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F	++
T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F	++
T022A-S103A-V104I-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F	+
T022A-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F	+

TABELA 12-10. Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca NHJ15.

PI = índice de desempenho

PI > ou = 1,3 é +++; PI entre 1,29 e 1,2 = ++; PI entre 1,19 e 1,0 = + no detergente 36a

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36a, 16°C
T022A-N043R-S103A-V104I-S128I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D	+
T022A-S101D-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F	+
T022A-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F	+
T022A-S024R-N043R-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D	+
T022A-N062E-S103A-V104I-G118R-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D	+
T022A-N043R-S101D-S103A-V104I-G118R-P129E-G159D-S188D-L217D-A232V	+
T022A-S024R-S103A-V104I-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D	+
T022A-S024R-N043R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-L217D-A232V-N248D-E271F	+
T022A-S103A-V104I-G118R-G159D-	+

TABELA 12-10. Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca NHJ15.

PI = índice de desempenho

PI > ou = 1,3 é +++; PI entre 1,29 e 1,2 = ++; PI entre 1,19 e 1,0 = + no detergente 36a

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36a, 16°C
S188D-L217D-A232V-Q245R-N248D-E271F	

TABELA 12-11. Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca NHJ16.

PI = índice de desempenho

PI > ou = 1,3 é +++; PI entre 1,29 e 1,2 = ++; PI entre 1,19 e 1,0 = + no detergente 36a

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; detergente 36a, 16°C
G020K-S024F-N062E-S188D-P239G	+++
S024F-N062E-N116L-P239G	+++
G020K-G023A-N062E-S188D	+++
G020K-G023A-S024F-N062E-G118R-S188D-T213A	+++
G020K-N043W-N062E-N116L-S188D-T213A-P239G	+++
G023A-N062E-N116L-G118R	+++
G023A-S024F-N062E-N116L-G118R	+++
S024F-N116L	+++
S024F-N062E-S188D-T213A	+++

TABELA 12-11. Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca NHJ16.**PI = índice de desempenho****PI > ou = 1,3 é +++; PI entre 1,29 e 1,2 = ++; PI entre 1,19 e 1,0 = + no detergente 36a**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; detergente 36a, 16°C
G023A-N062E-N116L-G118R-S188D-P239G	+++
G020K-S024F-N062E	++
G020K-N043W-N062E-N116L-P239G	++
S024F-N062E-N116L-T213A-P239G	++
G020K-S024F-N043W-N062E-N116L-T213A	++
G020K-G023A-S024F-N062E-N116L-S188D-T213A	++
S024F-N062E-S188D-P239G	++
G023A-N043W-N062E-N116L-G118R-T213A	++
N062E-S188D-P239G	++
G020K-S024F-N062E-P239G	+
S024F-N116L-G118R-S188D-P239G	+
G020K-G023A-N062E-N116L-G118R-T213A	+
G020K-G023A-S024F-N062E-S188D-T213A-P239G	+
S024F-N043W-G118R-S188D	+
G023A-S024F-N116L-G118R-S188D-T213A	+
G020K-G023A-N043W-N116L-S188D-T213A-P239G	+
G023A-S024F-N116L-S188D-P239G	+
G023A-N043W-N116L-G118R-S188D	+
G023A-S024F-G118R-S188D-P239G	+

TABELA 12-11. Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca NHJ16.

PI = índice de desempenho

PI > ou = 1,3 é +++; PI entre 1,29 e 1,2 = ++; PI entre 1,19 e 1,0 = + no detergente 36a

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; detergente 36a, 16°C
G023A-S024F-N043W-N062E-N116L-G118R	+
G020K-N043W-S188D-T213A	+
S024F-N062E-G118R-P239G	+
G023A-N043W-S188D-T213A	+
G020K-S024F-N043W-N062E-N116L-G118R-S188D-P239G	+
G020K-N116L-S188D-P239G	+
G020K-N043W-N062E-G118R	+
G020K-N043W-N116L-S188D-T213A	+
G020K-S024F	+
G023A-N043W-N116L-P239G	+
G023A-S024F-N043W-N116L-G118R-S188D-P239G	+
G020K-G023A-N043W-T213A	+
G023A-S024F-N062E-G118R-T213A-P239G	+

TABELA 12-12. Desempenho da limpeza de SLT das variantes das bibliotecas NHJ15 e NHJ16.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,3 é +++; PI entre 1,29 e 1,2 = ++; PI entre 1,19 e 1,0 = +
no detergente 36a, 36d ou 36f**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; SLT, detergente 36a, 36d ou 36f; 16°C
G020K-G023A-N043W-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D	+++
S024F-G118R-S128I-P129E-G159D	+++
G020K-S024F-N062E-N116L-G118R-S188D	+++
G020K-N062E-N116L-S188D	+++
N062E-N116L-G118R-T213A	+++
G020K-G023A-N062E-N116L-S188D	+++
N062E-N116L-G118R-S188D	+++
G020K-N062E-N116L-T213A	+++
G020K-G023A-N062E-N116L	+++
G020K-N062E-S188D-T213A	+++
G020K-N062E	+++
G020K-S024F-N062E-N116L-S188D	+++
G020K-N043W-N062E-N116L-S188D	+++
G020K-S024F-N062E-S188D-T213A	+++
N062E-N116L-S188D-T213A	+++
G020K-N062E-N116L	+++
G020K-G023A-N062E-N116L-S188D-T213A	+++
G023A-S024F-N062E-N116L-T213A	+++
T022A-N043R-S103A-V104I-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D	+++

TABELA 12-12. Desempenho da limpeza de SLT das variantes das bibliotecas NHJ15 e NHJ16.**PI = índice de desempenho****PI > ou = 1,3 é +++; PI entre 1,29 e 1,2 = ++; PI entre 1,19 e 1,0 = + no detergente 36a, 36d ou 36f**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; SLT, detergente 36a, 36d ou 36f; 16°C
T022A-N043R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F	+++
S024F-N062E-N116L-S188D	+++
T022A-S024R-S103A-V104I-G118R-S128I-P129E-G159D-S188D-A232V-N248D	+++
G023A-N062E-N116L-S188D	+++
N043W-N062E-N116L	+++
G020K-G023A-N116L-S188D	++
N043W-N062E-N116L-S188D	++
S024F-N062E-N116L	++
N062E-N116L-S188D	++
T022A-S024R-S103A-V104I-S128I-G159D-S188D-A232V-N248D	+

Exemplo 13**Construção de bibliotecas e variantes adicionais de GG36**

[000690] Este exemplo descreve a limpeza em água fria das variantes e bibliotecas GG36 adicionais construídas em *B. subtilis*. A maioria das bibliotecas de DNA foram sintetizadas na empresa DNA2.0, Inc., com o uso do plasmídio de expressão pHPLT-GG36 de *B. subtilis*. As reações de ligação das bibliotecas construídas foram transformadas na cepa de *B. subtilis* (genótipo: $\Delta aprE$, $\Delta nprE$, $amyE::xylRPxylAcomK$ -

phleo após amplificação do DNA com o uso de amplificação por círculo rolante, conforme descrito no Exemplo 4. As variantes e as bibliotecas WCE9 e NHJ10 foram criadas por PCR de extensão ou mutagênese QuickChange (veja o Exemplo 4 para descrição dos métodos). A biblioteca e as variantes WCE9 e NHJ10 também foram criadas com o uso do plasmídio de expressão pHPLT-GG36 de *B. subtilis*. As variantes foram expressas em células de *B. subtilis* (genótipo: $\Delta aprE$, $\Delta nprE$, $amyE::xylRPxylAcomK-phleo$) conforme descrito no Exemplo 1, e foram caracterizadas adicionalmente usando o teste de limpeza de amostra de tecido com SLT, conforme descrito no Exemplo 1. Nas tabelas a seguir, as composições detergentes ("Det.") correspondem às aquelas mostradas na Tabela 1-2, acima. Além disso, conforme indicado, a posição do aminoácido é mencionada de acordo com a numeração de BPN'.

TABELA 13-1: Desempenho da limpeza de SLT das variantes WCE5.

PI = índice de desempenho

PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = + no detergente 36k ou 36l

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
S087R-S101G-S103A-V104I-Q109R-S212P-A232V-Q245R-E271V	+++
S101G-S103A-V104I-Q109R-A232V-Q245R	+++
S101G-S103A-V104I-Q109R-S212P-A232V-Q245R-E271V	+++
S101G-S103A-V104I-Q109R-S212P-A232V-Q245R	+++

TABELA 13-1: Desempenho da limpeza de SLT das variantes WCE5.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36k ou 36l**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36k ou 36l, 16°C
N076D-S87R-S103A-V104I-S212P-E271V	+++
N076D-S103A-V104I-Q109R	+++
N076D-S103A-V104I-S212P-E271V	+++
N076D-S103A-V104I-Q109R-Q245R	+++
N076D-S103A-V104I-S212P-Q245L-E271V	+++

TABELA 13-2: Desempenho de limpeza de SLT das variantes WCE9.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36j, 36d, ou 36e**

sequência em relação à GG36 (numeração de BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36j, 36d, ou 36e, 16°C
S024R-P086W-G118R	+++
S024R-S078R-P086W-N243F	+++
S024R-T033S-P086S-S087N-Y209A	+++
T033S-G118R	+++
S024R-S078R-P086W-G118R-A270T	+++
S024R-T033S-P086W-G118R	+++

TABELA 13-2: Desempenho de limpeza de SLT das variantes WCE9.**PI = índice de desempenho****PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36j, 36d, ou 36e**

sequência em relação à GG36 (numeração de BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36j, 36d, ou 36e, 16°C
S078R-P086W-N243F	+++
T033S-S078R-P086W-G118R-Y209A	+++
T033S-S078R-Y209A	+++
P086W-G118R-N243F	+++
S024R-P086W	+++
S078R-P086W-K235F	+++
S024R-G118R	+++
S024R-P086R	+++
S101G-S103A-V104I-A232V	+++
S024R-T033S-S078R-P086W-G118R	+++
S024R-G118R-Y209A	+++
Y209A-W241R	+++
T033S-P086W-N243F	+++
T033S-A172V-Y209A	+++
G118R-Y209A-N243F	+++
S024R-P086S-S141G	+++
S024R-G118R-Y209A-N243F	+++
S024R-T033S-P086S-S085N-K235F	+++
S024R-T033S-A133V	+++
S024R-T033S-S078R-P086W	+++
S024R-P086W-Y209A	+++

TABELA 13-2: Desempenho de limpeza de SLT das variantes WCE9.**PI = índice de desempenho****PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36j, 36d, ou 36e**

sequência em relação à GG36 (numeração de BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36j, 36d, ou 36e, 16°C
S024R-W241R	+++
T033S-G118R-N243F	+++
S024R-K235F	+++
S024R-S078R-P086W	+++
S024R-G118R-Y209A-K235F	+++
S024R-Y209A-W241R	+++
T033S-G118R-W241R	+++
P086W-G118R-Y209A	+++
T033S-G118R-G159D-Y209A	+++
T033S-S078R-P086W	+++
S024R-P086W-N243F	+++
G118R-Y209A	+++
S024R-P086W-G118R-V203I	+++
S078R-Y209A-K235F	+++
S024R-T033S-W241R	+++
S078R-G118R	+++
T033S-G118R-Y209A-N243F	+++
L021M-S024R-T033S	+++
S024R-T033S-P086W	+++
T033S-K235F	+++
S078R-P086W-Y209A	+++

TABELA 13-2: Desempenho de limpeza de SLT das variantes WCE9.**PI = índice de desempenho****PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36j, 36d, ou 36e**

sequência em relação à GG36 (numeração de BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36j, 36d, ou 36e, 16°C
S024R-T033S-Y209A-K235F	+++
T033S-P086W-G118R	+++
S024R-T033S-S078R-Y209A	+++
T033S-P086W-G118R-Y209A-N243F	+++
P086W-Y209A-N243F	+++
P005S-S078R-G118R-W241R	+++
S024R-A174T	+++
T033S-Y209A-N243F	+++
P086W-G118R-A133V	+++
S024R-T033S-G118R	+++
S024R-P086W-Y209A-K235F	++
P086W-Y209A	++
I008T-S024R	++
P086W-G118R	++
T033S-W241R	++
P005S-S024R-T033S-N243F	++
S024R-Y209A-S242P	++
S024R-T033S-S078R-G118R	++
S024R-T033S-A194T	++
S024R-N243F	++
S024R-Y209A	++

TABELA 13-2: Desempenho de limpeza de SLT das variantes WCE9.**PI = índice de desempenho****PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36j, 36d, ou 36e**

sequência em relação à GG36 (numeração de BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36j, 36d, ou 36e, 16°C
S024R-T033S-G118R-Y209A	++
T033S-P086W	++
S024R-T033S	++
S024R-T033S-S078R-N243F	++
P086W-N243F	++
T033S-G118D-A138V-Y209A	++
T033S-Y209A-K235F	++
S024R-P086R-G118R	++
T033S-P201S	++
S024R-P239Q	++
T033S-G118R-Y209A-	++
S078R-P086W	++
K235F-N243F	++
S024R-Y209A-K235F	++
G118R-A172V	++
H017Y-S024R-T033S-P086W	++
T033S-L148F	++
S024R-G118R-K235F	++
T033S-S078R	++
T033S-N243F	++
S024C-T033S	++

TABELA 13-2: Desempenho de limpeza de SLT das variantes WCE9.**PI = índice de desempenho****PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36j, 36d, ou 36e**

sequência em relação à GG36 (numeração de BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36j, 36d, ou 36e, 16°C
G118R-A194T	++
T033S-Y209A	++
G118R-Y209A-K235F	++
S024R-T033S-Y209A-N243F	++
S024R-T033S-K235F	++
S024R-T033S-G118R-K235F	++
S024R-S141G	++
S024R-T274I	++
S024R-T033S-Y209A	++
P086W-K235F	+
S024R-Y209A-N243F	+
V004E-T033S-S078R	+
P086W-Y209A-K235F	+
A015T-T033S	+
T033S-P086W-S156L-Y209A	+
S024R-G118R-N243F-R269H	+
Y209A-K235F	+
S024R-R247H	+
S024R-T033S-A228T	+
S078R-K235F	+
S024R-T033S-A174V-K235F	+

TABELA 13-2: Desempenho de limpeza de SLT das variantes WCE9.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36j, 36d, ou 36e**

sequência em relação à GG36 (numeração de BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36j, 36d, ou 36e, 16°C
S024R-K235F-N243F	+
S024R-T033S-K235F-W241R	+
S024R-T033S-A151V	+
S024R-V104A	+
T033S-A048T	+
Q012H-V104A-G118R	+
G118R-K235F	+
T033S-T253A	+
T143A-Y209A	+
S024R-T033S-N243F	+
T033S-P239T	+
Y209A-N243F	+
S024R-T033S-P129H-N184D-T253M	+
S024R-A085V-P086W-G118R-K235F	+
S024R-A272P	+
S024R-R269C	+

TABELA 13-3: Desempenho da limpeza de SLT das variantes WCE15.**PI = índice de desempenho****PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36m**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36m, 16°C
G020R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
G020R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R	+++
N018R-G020R-S024R-N076D-S087D-H249R	+++
N018R-G020R-S024R-N076D-V150L-H249R	+++
N018R-S024R-N043R-N076D-S087D-H249R	+++
N018R-S024R-N043R-N076D-V150L-H249R	+++
N018R-S024R-N076D-S078R-S087D-H249R	+++
N018R-S024R-N076D-S078R-V150L-H249R	+++
N018R-S024R-N076D-S087D-H249R-N269R	+++
N018R-S024R-N076D-S087D-S242R-H249R	+++
N018R-S024R-N076D-S087D-V150L-H249R	+++
N018R-S024R-N076D-V150L-H249R	+++
N018R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
N018R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R	+++

TABELA 13-3: Desempenho da limpeza de SLT das variantes WCE15.**PI = índice de desempenho****PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36m**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36m, 16°C
N018R-T022R-S024R-N076D-S087D-H249R	+++
N018R-T022R-S024R-N076D-V150L-H249R	+++
N043R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
N043R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R	+++
S024R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R	+++
S078R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++
S078R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R	+++
S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R	+++
S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R-H249R	+++
S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R-N269R	+++
T022R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+++

TABELA 13-3: Desempenho da limpeza de SLT das variantes WCE15.**PI = índice de desempenho****PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente 36m**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36m, 16°C
N018R-S024R-N043D-N076D-V150L-H249R	++
N043R-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	++
T022R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R	++
N018R-S024R-N043D-N076D-S087D-H249R	+
N018R-S024R-N076D-S087D-H249R	+
N018R-S024R-N076D-V150L-S242R-H249R	+
N043R-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R-N269R	+
N076D-S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R	+
S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-S242R-Q245R	+
S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-Q245R	+
N076D-S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
S087D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R	+
S101G-S103A-V104I-V150L-A232V-S242R-Q245R	+

TABELA 13-4: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca NHJ14.**PI = índice de desempenho****PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente do Exemplo 36c**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36c, 16°C
S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-S130A-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-	++

TABELA 13-4: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca NHJ14.

PI = índice de desempenho

**PI > ou = 1,5 é +++; PI entre 1,49 e 1,3 = ++; PI entre 1,29 e 1,0 = +
no detergente do Exemplo 36c**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36c, 16°C
H249R	
S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S101G-S103A-V104I-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S024R-K027R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++

TABELA 13-5: Desempenho da limpeza de SLT das variantes de NHJ10.**PI = índice de desempenho****PI > ou = 1,3 é +++; PI entre 1,29 e 1,2 = ++; PI entre 1,19 e 1,0 = + no detergente 36a**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36a, 16°C
S101G-S103A-V104I-A232V-M222Q-Q245R	+++
S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-M222S-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-M222Q-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-M222Q-Q245R	+++
S101G-S103A-V104I-A232V-M222S-Q245R	++
N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-M222S-Q245R	++
N076D-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-M222S-A232V-Q245R-N248D-H249R	+

TABELA 13-6: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca NHJ14.**PI = índice de desempenho****PI > ou = 1,3 é +++; PI entre 1,29 e 1,2 = ++; PI entre 1,19 e 1,0 = + no detergente 36f**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36f, 16°C
S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+++
S024R-S101G-S103A-V104I-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S101G-S103A-V104I-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-N183D-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S024R-S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S101G-S103A-V104I-S128L-S130A-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R	++
S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+

TABELA 13-6: Desempenho da limpeza de SLT das variantes da biblioteca NHJ14.**PI = índice de desempenho****PI > ou = 1,3 é +++; PI entre 1,29 e 1,2 = ++; PI entre 1,19 e 1,0 = + no detergente 36f**

sequência das variantes de GG36 (numeração de acordo com BPN')	PI em relação à GG36; teste de SLT, detergente 36f, 16°C
S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-S130A-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-P129Q-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R-E271G	+
S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
S024R-S101G-S103A-V104I-S130A-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-A158E-N183D-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
S101G-S103A-V104I-P129Q-A158E-S188D-L217E-A232V-Q245R-N248D-H249R	+
S024R-S101G-S103A-V104I-S128L-S130A-A158E-S188D-A232V-Q245R-N248D-H249R	+

Exemplo 14**Composições de lavanderia granulares e/ou em tablete**

[000691] Este Exemplo fornece várias formulações para detergentes de lavanderia granulares e/ou em tablete. As composições de lavanderia da presente invenção, que podem estar sob a forma de grânulos ou tablete, são fornecidas abaixo. Em cada uma destas formulações, pelo

menos uma variante de protease aqui fornecida está incluída a uma concentração de cerca de 0,0001 até cerca de 10 por cento, em peso. Em algumas modalidades alternativas, outras concentrações poderão ser usadas, conforme determinado pelo formulador, com base em suas necessidades.

Tabela 14-1: Composições de lavanderia granulares e/ou em tablete					
Composto	Formulações				
	I	II	III	IV	V
Produto-base					
C ₁₄ -C ₁₅ AS ou TAS	8,0	5,0	3,0	3,0	3,0
LAS	8,0	-	8,0	-	7,0
C ₁₂ -C ₁₅ AE ₃ S	0,5	2,0	1,0	-	-
C ₁₂ -C ₁₅ E ₅ ou E ₃	2,0	-	5,0	2,0	2,0
QAS	-	-	-	1,0	1,0
Zeólito A	20,0	18,0	11,0	-	10,0
SKS-6 (adicionar a seco)	-	-	9,0	-	-
MA/AA	2,0	2,0	2,0	-	-
AA	-	-	-	-	4,0
Citrato de 3Na 2H ₂ O	-	2,0	-	-	-
Ácido cítrico (anidro)	2,0	-	1,5	2,0	-
DTPA	0,2	0,2	-	-	-
EDDS	-	-	0,5	0,1	-
HEDP	-	-	0,2	0,1	-
PB1	3,0	4,8	-	-	4,0
Percarbonato	-	-	3,8	5,2	-
NOBS	1,9	-	-	-	-
NACA OBS	-	-	2,0	-	-
TAED	0,5	2,0	2,0	5,0	1,00

Tabela 14-1: Composições de lavanderia granulares e/ou em tablete					
Composto	Formulações				
	I	II	III	IV	V
BB1	0,06	-	0,34	-	0,14
BB2	-	0,14	-	0,20	-
Carbonato de Na anidro	15,0	18,0	-	15,0	15,0
Sulfato	5,0	12,0	5,0	17,0	3,0
Silicato	-	1,0	-	-	8,0
NprE (opcional)	0,03	-	0,1	0,06	-
PMN	-	0,05	-	-	0,1
Protease B (opcional)	-	0,01	-	-	-
Protease C (opcional)	-	-	-	0,01	-
Lipase	-	0,008	-	-	-
Amilase	0,001	-	-	-	0,001
Celulase	-	0,0014	-	-	-
Pectina liase	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Aldose oxidase	0,03	-	0,05	-	-
PAAC	-	0,01	-	-	0,05
qsp 100% umidade e/ou substâncias secundárias*					

* Perfume, corante, alvejante / SRP1 / carbóxi metilcelulose de Na / fotobranqueador / MgSO_4 / PVPVI/ supressor de espuma /PEG de alto peso molecular /argila.

Exemplo 15

Composições detergentes em tabletes

[000692] Este exemplo fornece várias formulações detergentes em tabletes. As seguintes composições detergentes em tabletes da presente invenção são preparadas pela compactação de uma composição detergente para lavar louças granular a uma pressão de 13 KN/cm²

usando uma prensa giratória de 12 cabeças padrão. Em cada uma destas formulações, pelo menos uma variante de protease aqui fornecida está incluída a uma concentração de cerca de 0,0001 até cerca de 10 por cento, em peso. Em algumas modalidades alternativas, outras concentrações poderão ser usadas, conforme determinado pelo formulador, com base em suas necessidades.

Tabela 15-1: Composições detergentes em tabletes								
Composto	Formulações							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
STPP	-	48,8	44,7	38,2	-	42,4	46,1	46,0
Citrato de 3Na 2H ₂ O	20,0	-	-	-	35,9	-	-	-
Carbonato de Na	20,0	5,0	14,0	15,4	8,0	23,0	20,0	-
Silicato	15,0	14,8	15,0	12,6	23,4	2,9	4,3	4,2
Lipase	0,00 1	-	0,01	-	0,02	-	-	-
Protease B (op- cional)	0,01	-	-	-	-	-	-	-
Protease C (op- cional)	-	-	-	-	-	0,01	-	-
NprE (opcional)	0,01	0,08	-	0,04	-	0,02 3	-	0,05
PMN	-	-	0,05	-	0,05 2	-	0,02 3	-
Amilase	0,01 2	0,01 2	0,01 2	-	0,01 5	-	0,01 7	0,00 2
Pectina liase	0,00 5	-	-	0,00 2	-	-	-	-
Aldose oxidase	-	0,03	-	0,02	0,02	-	0,03	-

Tabela 15-1: Composições detergentes em tabletes								
Composto	Formulações							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
PB1	-	-	3,8	-	7,8	-	-	4,5
Percarbonato	6,0	-	-	6,0	-	5,0	-	-
BB1	0,2	-	0,5	-	0,3	0,2	-	-
BB2	-	0,2	-	0,5	-	-	0,1	0,2
Não iônico	1,5	2,0	2,0	2,2	1,0	4,2	4,0	6,5
PAAC	0,01	0,01	0,02	-	-	-	-	-
DETBCHD	-	-	-	0,02	0,02	-	-	-
TAED	-	-	-	-	-	2,1	-	1,6
HEDP	1,0	-	-	0,9	-	0,4	0,2	-
DETPMP	0,7	-	-	-	-	-	-	-
Parafina	0,4	0,5	0,5	0,5	-	-	0,5	-
BTA	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	-
Policarboxilato	4,0	-	-	-	4,9	0,6	0,8	-
PEG 400 a 30.000	-	-	-	-	-	2,0	-	2,0
Glicerol	-	-	-	-	-	0,4	-	0,5
Perfume	-	-	-	0,05	0,2	0,2	0,2	0,2
qsp 100% umidade e/ou substâncias secundárias*								

* Alvejante / SRP1 / carbóxi metilcelulose de Na / fotobranqueador / MgSO₄ / PVPVI/ supressor de espuma /PEG de alto peso molecular /argila.

[000693] O pH dos Exemplos 15(I) a 15(VII) é de cerca de 10 a cerca de 11,5; o pH de 15(VIII) é de 8 a 10. O peso do tablete dos Exemplos 15(I) a 15(VIII) é de cerca de 20 gramas a cerca de 30 gramas.

Exemplo 16

Composições detergentes líquidas para lavagem de roupas

[000694] Neste exemplo, são fornecidas várias formulações para

composições detergentes líquidas para lavagem de roupas. As seguintes composições detergentes líquidas para lavagem de roupas da presente invenção são preparadas conforme mostrado abaixo. Em cada uma destas formulações, pelo menos uma variante de protease aqui fornecida está incluída a uma concentração de cerca de 0,0001 até cerca de 10 por cento, em peso. Em algumas modalidades alternativas, outras concentrações poderão ser usadas, conforme determinado pelo formulador, com base em suas necessidades.

Tabela 16-1: Composições detergentes líquidas para lavagem de roupas					
<u>Composto</u>	<u>Formulações</u>				
	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>
LAS	24,0	32,0	6,0	3,0	6,0
NaC ₁₆ -C ₁₇ HSAS	-	-	-	5,0	-
C ₁₂ -C ₁₅ AE _{1,8} S	-	-	8,0	7,0	5,0
C ₈ -C ₁₀ propil dimetilamina	2,0	2,0	2,0	2,0	1,0
Óxido de C ₁₂ -C ₁₄ alquil dimetilamina	-	-	-	-	2,0
C ₁₂ -C ₁₅ AS	-	-	17,0	-	8,0
CFAA	-	5,0	4,0	4,0	3,0
Etoxilato de álcool graxo C ₁₂ -C ₁₄	12,0	6,0	1,0	1,0	1,0
Ácido graxo C ₁₂ -C ₁₈	3,0	-	4,0	2,0	3,0
Ácido cítrico (anidro)	4,5	5,0	3,0	2,0	1,0
DETPMP	-	-	1,0	1,0	0,5
Monoetanolamina	5,0	5,0	5,0	5,0	2,0
Hidróxido de sódio	-	-	2,5	1,0	1,5
Solução aquosa de HCl 1N	#1	#1	-	-	-
Propanodiol	12,7	14,5	13,1	10.	8,0
Etanol	1,8	2,4	4,7	5,4	1,0
DTPA	0,5	0,4	0,3	0,4	0,5
Pectina liase	-	-	-	0,005	-

Tabela 16-1: Composições detergentes líquidas para lavagem de roupas

<u>Composto</u>	<u>Formulações</u>				
	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>
Amilase	0,001	0,002	-	-	-
Celulase	-	-	0,000 2	-	0,000 1
Lipase	0,1	-	0,1	-	0,1
NprE (opcional)	0,05	0,3	-	0,5	0,2
PMN	-	-	0,08	-	-
Protease A (opcional)	-	-	-	-	0,1
Aldose oxidase	-	-	0,3	-	0,003
ZnCl ₂	0,1	0,05	0,05	0,05	0,02
Formiato de Ca	0,05	0,07	0,05	0,06	0,07
DETBCHD	-	-	0,02	0,01	-
SRP1	0,5	0,5	-	0,3	0,3
Ácido bórico	-	-	-	-	2,4
Xileno sulfonato de sódio	-	-	3,0	-	-
Cumeno sulfonato de sódio	-	-	-	0,3	0,5
DC 3225C	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
2-Butil-octanol	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03
Alvejante 1	0,12	0,10	0,18	0,08	0,10
qsp 100% perfume / corante e/ou água					

n° 1: Adicionar uma solução aquosa de HCl 1N para ajustar o pH puro da fórmula na faixa de cerca de 3 a cerca de 5.

[000695] O pH dos Exemplos 16(I)-(II) acima é de cerca de 5 a cerca de 7 e de 16(III)-(V) é de cerca de 7,5 a cerca de 8,5.

Tabela 16-2: Detergentes líquidos para lavagem de roupas						
Composto	Formulações					
	I	II	III	IV	V	VI
LAS	11,5	11,5	9,0	-	4,0	-

Tabela 16-2: Detergentes líquidos para lavagem de roupas						
Composto	Formulações					
	I	II	III	IV	V	VI
C ₁₂ -C ₁₅ AE _{2,85} S	-	-	3,0	18,0	-	16,0
C ₁₄ -C ₁₅ E _{2,5} S	11,5	11,5	3,0	-	16,0	-
C ₁₂ -C ₁₃ E ₉	-	-	3,0	2,0	2,0	1,0
C ₁₂ -C ₁₃ E ₇	3,2	3,2	-	-	-	-
CFAA	-	-	-	5,0	-	3,0
TPKFA	2,0	2,0	-	2,0	0,5	2,0
Ácido cítrico (anidro)	3,2	3,2	0,5	1,2	2,0	1,2
Formiato de Ca	0,1	0,1	0,06	0,1	-	-
Formiato de Na	0,5	0,5	0,06	0,1	0,05	0,05
ZnCl ₂	0,1	0,05	0,06	0,03	0,05	0,05
Cumeno sulfonato de Na	4,0	4,0	1,0	3,0	1,2	-
Borato	0,6	0,6	1,5	-	-	-
Hidróxido de Na	6,0	6,0	2,0	3,5	4,0	3,0
Etanol	2,0	2,0	1,0	4,0	4,0	3,0
1,2 propanodiol	3,0	3,0	2,0	8,0	8,0	5,0
Monoetanolamina	3,0	3,0	1,5	1,0	2,5	1,0
TEPAE	2,0	2,0	-	1,0	1,0	1,0
NprE (opcional)	0,03	0,05	-	0,03	-	0,02
PMN	-	-	0,01	-	0,08	-
Protease A (opcional)	-	-	0,01	-	-	-
Lipase	-	-	-	0,002	-	-
Amilase	-	-	-	-	0,002	-
Celulase	-	-	-	-	-	0,000 1

Tabela 16-2: Detergentes líquidos para lavagem de roupas						
Composto	Formulações					
	I	II	III	IV	V	VI
Pectina liase	0,005	0,005	-		-	-
Aldose oxidase	0,05	-	-	0,05	-	0,02
Galactose oxidase	-	0,04				
PAAC	0,03	0,03	0,02	-	-	-
DETBCHD	-	-	-	0,02	0,01	-
SRP 1	0,2	0,2	-	0,1	-	-
DTPA	-	-	-	0,3	-	-
PVNO	-	-	-	0,3	-	0,2
Alvejante 1	0,2	0,2	0,07	0,1	-	-
Antiespumante de silicone	0,04	0,04	0,02	0,1	0,1	0,1
qsp 100% perfume/corante e/ou água						

Exemplo 17

Composições detergentes líquidas para lavagem de louças à mão

[000696] Neste exemplo, são fornecidas várias formulações detergentes líquidas para lavagem de louças à mão. As composições detergentes líquidas para lavagem de louças à mão da presente invenção são fornecidas abaixo. Em cada uma destas formulações, pelo menos uma variante de protease aqui fornecida está incluída a uma concentração de cerca de 0,0001 até cerca de 10 por cento, em peso. Em algumas modalidades alternativas, outras concentrações poderão ser usadas, conforme determinado pelo formulador, com base em suas necessidades.

Tabela 17-1: Composições detergentes líquidas para lavagem de louças à mão						
Composto	Formulações					
	I	II	III	IV	V	VI
C ₁₂ -C ₁₅ AE _{1,8} S	30,0	28,0	25,0	-	15,0	10,0
LAS	-	-	-	5,0	15,0	12,0
Sulfonato de parafina	-	-	-	20,0	-	-
Óxido de C ₁₀ -C ₁₈ alquil dimetilamina	5,0	3,0	7,0	-	-	-
Betaina	3,0	-	1,0	3,0	1,0	-
Amida de ácido graxo C ₁₂ poli-OH	-	-	-	3,0	-	1,0
Amida de ácido graxo C ₁₄ poli-OH	-	1,5	-	-	-	-
C ₁₁ E ₉	2,0	-	4,0	-	-	20,0
DTPA	-	-	-	-	0,2	-
Citrato trissódico desidratado	0,25	-	-	0,7	-	-
Diamina	1,0	5,0	7,0	1,0	5,0	7,0
MgCl ₂	0,25	-	-	1,0	-	-
NprE (opcional)	0,02	0,01	-	0,01	-	0,05
PMN	-	-	0,03	-	0,02	-
Protease A (opcional)	-	0,01	-	-	-	-
Amilase	0,00 1	-	-	0,00 2	-	0,00 1
Aldose oxidase	0,03	-	0,02	-	0,05	-
Cumenossulfonato de sódio	-	-	-	2,0	1,5	3,0
PAAC	0,01	0,01	0,02	-	-	-
DETBCHD	-	-	-	0,01	0,02	0,01
qsp 100% perfume / corante e/ou água						

[000697] O pH dos Exemplos 17(I)-(VI) é de cerca de 8 a cerca de 11.

Exemplo 18

Composições detergentes líquidas para lavagem de louças automática
[000698] Neste exemplo, são fornecidas várias formulações detergentes líquidas para lavagem de louças automática. As composições detergentes líquidas para lavagem de louças à mão da presente invenção são fornecidas abaixo. Em cada uma destas formulações, pelo menos uma variante de protease aqui fornecida está incluída a uma concentração de cerca de 0,0001 até cerca de 10 por cento, em peso. Em algumas modalidades alternativas, outras concentrações poderão ser usadas, conforme determinado pelo formulador, com base em suas necessidades.

Tabela 18-1: Composições detergentes líquidas para lavagem de louças automática					
Composto	Formulações				
	I	II	III	IV	V
STPP	16	16	18	16	16
Sulfato de potássio	-	10	8	-	10
1,2 Propanodiol	6,0	0,5	2,0	6,0	0,5
Ácido bórico	-	-	-	4,0	3,0
Diidrato de CaCl ₂	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Não iônico	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
NprE (opcional)	0,1	0,03	-	0,03	-
PMN	-	-	0,05	-	0,06
Protease B (opcional)	-	-	-	0,01	-
Amilase	0,02	-	0,02	0,02	-
Aldose oxidase	-	0,15	0,02	-	0,01
Galactose oxidase	-	-	0,01	-	0,01
PAAC	0,01	-	-	0,01	-
DETBCHD	-	0,01	-	-	0,01
qsp 100% perfume / corante e/ou água					

Exemplo 19

Detergentes de alta densidade para lavagem de pratos

[000699] Este exemplo fornece várias formulações para detergentes de alta densidade para lavagem de pratos. Os seguintes detergentes de alta densidade e compactos para lavagem de pratos da presente invenção são fornecidos abaixo. Em cada uma destas formulações, pelo menos uma variante de protease aqui fornecida está incluída a uma concentração de cerca de 0,0001 até cerca de 10 por cento, em peso. Em algumas modalidades alternativas, outras concentrações poderão ser usadas, conforme determinado pelo formulador, com base em suas necessidades.

Tabela 19-1: Detergentes de alta densidade para lavagem de pratos						
Composto	Formulações					
	I	II	III	IV	V	VI
STPP	-	45,0	45,0	-	-	40,0
Citrato de 3Na 2H ₂ O	17,0	-	-	50,0	40,2	-
Carbonato de Na	17,5	14,0	20,0	-	8,0	33,6
Bicarbonato	-	-	-	26,0	-	-
Silicato	15,0	15,0	8,0	-	25,0	3,6
Metassilicato	2,5	4,5	4,5	-	-	-
PB1	-	-	4,5	-	-	-
PB4	-	-	-	5,0	-	-
Percarbonato	-	-	-	-	-	4,8
BB1	-	0,1	0,1	-	0,5	-
BB2	0,2	0,05	-	0,1	-	0,6
Não iônico	2,0	1,5	1,5	3,0	1,9	5,9
HEDP	1,0	-	-	-	-	-
DETPMP	0,6	-	-	-	-	-
PAAC	0,03	0,05	0,02	-	-	-

Tabela 19-1: Detergentes de alta densidade para lavagem de pratos						
Composto	Formulações					
	I	II	III	IV	V	VI
Parafina	0,5	0,4	0,4	0,6	-	-
NprE (opcional)	0,072	0,053	-	0,026	-	0,01
PMN	-	-	0,053	-	0,059	-
Protease B (opcional)	-	-	-	-	-	0,01
Amilase	0,012	-	0,012	-	0,021	0,006
Lipase	-	0,001	-	0,005	-	-
Pectina liase	0,001	0,001	0,001	-	-	-
Aldose oxidase	0,05	0,05	0,03	0,01	0,02	0,01
BTA	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3
Policarboxilato	6,0	-	-	-	4,0	0,9
Perfume	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
qsp 100% umidade e/ou substâncias secundárias*						

* Alvejante / corante / SRP1 / carbóxi metilcelulose de Na / fotobranqueador / $MgSO_4$ / PVPVI/ supressor de espuma /PEG de alto peso molecular /argila.

[000700] O pH dos Exemplos 19(I) a (VI) é de cerca de 9,6 a cerca de 11,3.

Exemplo 20

Detergentes líquidos para limpeza de superfícies duras

[000701] Este exemplo fornece várias formulações para detergentes líquidos para limpeza de superfícies duras. As composições detergentes líquidas para limpeza de superfícies duras da presente invenção são fornecidas abaixo. Em cada uma destas formulações, pelo menos uma variante de protease aqui fornecida está incluída a uma concentração de cerca de 0,0001 até cerca de 10 por cento, em peso. Em al-

gumas modalidades alternativas, outras concentrações poderão ser usadas, conforme determinado pelo formulador, com base em suas necessidades.

Tabela 20-1: Detergentes líquidos para limpeza de superfícies duras							
Composto	Formulações						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
C ₉ -C ₁₁ E ₅	2,4	1,9	2,5	2,5	2,5	2,4	2,5
C ₁₂ -C ₁₄ E ₅	3,6	2,9	2,5	2,5	2,5	3,6	2,5
C ₇ -C ₉ E ₆	-	-	-	-	8,0	-	-
C ₁₂ -C ₁₄ E ₂₁	1,0	0,8	4,0	2,0	2,0	1,0	2,0
LAS	-	-	-	0,8	0,8	-	0,8
Cumeno sulfonato de sódio	1,5	2,6	-	1,5	1,5	1,5	1,5
Isachem® AS	0,6	0,6	-	-	-	0,6	-
Na ₂ CO ₃	0,6	0,13	0,6	0,1	0,2	0,6	0,2
Citrato de 3Na 2H ₂ O	0,5	0,56	0,5	0,6	0,75	0,5	0,75
NaOH	0,3	0,33	0,3	0,3	0,5	0,3	0,5
Ácido graxo	0,6	0,13	0,6	0,1	0,4	0,6	0,4
2-Butil-octanol	0,3	0,3	-	0,3	0,3	0,3	0,3
PEG DME-2000®	0,4	-	0,3	0,35	0,5	-	-
PVP	0,3	0,4	0,6	0,3	0,5	-	-
MME PEG (2000)®	-	-	-	-	-	0,5	0,5
Jeffamine® ED-2001	-	0,4	-	-	0,5	-	-
PAAC	-	-	-	0,03	0,03	0,03	-
DETBCHD	0,03	0,05	0,05	-	-	-	-
NprE (opcional)	0,07	-	0,08	0,03	-	0,01	0,04
PMN	-	0,05	-	-	0,06	-	-
Protease B (opcional)	-	-	-	-	-	0,01	-

Tabela 20-1: Detergentes líquidos para limpeza de superfícies duras							
Composto	Formulações						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
Amilase	0,12	0,01	0,01	-	0,02	-	0,01
Lipase	-	0,00 1	-	0,00 5	-	0,00 5	-
Pectina liase	0,00 1	-	0,00 1	-	-	-	0,00 2
ZnCl ₂	0,02	0,01	0,03	0,05	0,1	0,05	0,02
Formiato de cálcio	0,03	0,03	0,01	-	-	-	-
PB1	-	4,6	-	3,8	-	-	-
Aldose oxidase	0,05	-	0,03	-	0,02	0,02	0,05
qsp 100% perfume / corante e/ou água							

[000702] O pH dos Exemplos 20(I) a (VII) é de cerca de 7,4 a cerca de 9,5.

Exemplo 21

Testes de desempenho em lavagem de louças automática

[000703] Neste exemplo, são descritos os métodos usados para determinar o desempenho de lavagem das some variantes de protease usando alguns detergentes para louça comercialmente disponíveis. Estas variantes de protease são testadas sob várias condições. Estes detergentes são disponíveis comercialmente junto à WFK e são chamados pelas designações fornecidas abaixo. Os protocolos para cada um dos tipos de mancha (carne moída, gema de ovo, e gema de ovo com leite) são fornecidos abaixo. Antes de os tipos de sujeira individuais poderem ser aplicados aos pratos em teste, os pratos devem ser cuidadosamente lavados. Isto é particularmente necessário, uma vez que resíduos de determinadas manchas persistentes podem ainda estar presentes nos pratos de testes anteriores. Pratos novos também

foram submetidos a três lavagens meticulosas antes de serem usados pela primeira vez em um teste.

[000704] Os testes de lavagem são feitos tipicamente em uma lavadora automática (*por exemplo*, Miele: G690SC), equipada com pratos sujos e folhas de aço inoxidável, conforme descrito acima. Uma quantidade definida do detergente é usada, conforme indicado nas tabelas de resultados abaixo. Em alguns experimentos, as temperaturas testadas são 45°C, 55°C e 65°C. Em alguns experimentos, a dureza da água é 9° ou 21° GH (dureza alemã) (374 ppm de Ca).

[000705] Conforme indicado acima, após a lavagem, os pratos sujos com carne moída ou macarrão/molho/carne/queijo são avaliados visualmente usando uma escala de classificação visual de 0 a 10, em que "0" designou um prato completamente sujo e "10" designou um prato limpo. Estes valores correspondem à capacidade de remoção da mancha ou sujeira (SR) do detergente contendo a enzima.

[000706] Os pratos de aço inoxidável lavados sujos com gema de ovo e/ou gema de ovo e leite são analisados gravimetricamente para determinar a quantidade de mancha residual após a lavagem.

[000707] Alguns detergentes exemplificadores são fornecidos abaixo.

Tabela 21-1: Detergente sem fosfato IEC-60436 WFK tipo B (pH=10,4 em 3 g/l)	
Componente	% em peso
Citrato de sódio desidratado	30,0
Sal de sódio de copolímero de ácido maleico/ácido acrílico (SOKALAN® CP5; BASF)	12,0
Perborato de sódio mono-hidratado	5,0
TAED	2,0
Dissilicato de sódio: Protil A (Cognis)	25,0
Etoxilato de álcool graxo linear	2,0
Carbonato de sódio anidro	adicionar para 100

Tabela 21-2: Detergente contendo fosfato:IEC-60436 WFK tipo C (pH=10,5 em 3 g/l))	
Componente	% em peso
Tripolifosfato de sódio	23,0
Citrato de sódio desidratado	22,3
Sal de sódio de copolímero de ácido maleico/ ácido acrílico	4,0
Perborato de sódio mono-hidratado	6,0
TAED	2,0
Dissilicato de sódio: Protil A (Cognis)	5,0
Etoxilato de álcool graxo linear	2,0
Carbonato de sódio anidro	adicionar para 100

REIVINDICAÇÕES

1. Variante de subtilisina isolada, caracterizada pelo fato de que é uma forma madura com atividade proteolítica e que compreende uma sequência de aminoácidos compreendendo uma combinação de substituições de aminoácidos selecionada de: G020R-N043R-A230E, G020R-N043R-A230E-S242R, G020R-N043R-E271L, G020R-N043R-H249R, G020R-N043R-H249R-E271L, G020R-N043R-N076D, G020R-N043R-N076D-A230E-H249R, G020R-N043R-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N269R, , G020R-N043R-N269R, G020R-N043R-R045T-A230E, G020R-N043R-R045T-S101A-N269R, G020R-N043R-R045T-S242R, G020R-N043R-S101A-N116A-T213A-A215F, G020R-N043R-S101A-N269R, G020R-N043R-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, G020R-N043R-S212F, G020R-N043R-S212F-W241R, G020R-N043R-S242R, G020R-N043R-S242R-E271L, G020R-N043R-V244R, G020R-N043R-W241R, G020R-S024R-N043R-N076D, G020R-S024R-N043R-R045T, G020R-S024R-N043R-R045T-A215F, G020R-S024R-N043R-R045T-H249R, G020R-S024R-N043R-R045T-N076D-S242R-H249R, G020R-S024R-N043R-R045T-N116A, G020R-S024R-N043R-R045T-N116A-T213A, G020R-S024R-N043R-R045T-N116A-T213A-A215F, G020R-S024R-N043R-R045T-S101A-N269R, G020R-S024R-N043R-R045T-S101A-T213A, G020R-S024R-N043R-S242R, G020R-S024R-T38I-N043R-R045T-N076D-S242R-H249R, G020R-T022R-N043R, G020R-T022R-N043R-S212F, G020R-T022R-N043R-W241R, G020R-T038A-N043R-S101A, N018R-G020R-N043R, N018R-G020R-N043R-N076D, N018R-G020R-N043R-N076D-A230E-S242R, N018R-G020R-N043R-N076D-H249R, N018R-G020R-N043R-N076D-S242R-H249R, N018R-G020R-N043R-R045T-N076D-H249R, N018R-G020R-N043R-R045T-N076D-S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, N018R-G020R-N043R-R045T-S242R, N018R-G020R-S024R-N043R-N076D-H249R, N018R-G020R-S024R-N043R-R045T-N076D-

A230E, N018R-G020R-S024R-N043R-R045T-N076D-H249R, P014L-G020R-S024R-N043R-R045T-S101A-A215F, S009A-G020R-N043R-S212F, S009A-G020R-N043R-W241R, S009A-G020R-S024R-N043R, V004R-G020R-N043R, V004R-G020R-S024R-N043R, V004R-G020R-S024R-N043R-S242R, V004R-S009A-G020R-N043R, e V004R-S009A-G020R-N043R-S242R,

em que a carga líquida total da variante é 0, +1, +2, +3, +4, +5, -1, -2, -3, -4 ou -5 em relação à carga líquida total da subtilisina GG36 protease de *Bacillus lentus*, e em que a carga líquida total é obtida por uma ou mais substituições selecionadas de: R45T, N62E, N76D, S101D, P129E, A158E, G159D, G159E, S166D, S188D, A230E, N18R, T22R, S24R, G118R, Q245R, H249R, N269R, E271F e E271L, em que a variante é uma variante de uma protease parental da subtilisina GG36 protease de *Bacillus lentus* compreendendo a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 2, e em que as posições de aminoácidos da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácidos correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID NO: 1.

2. Ácido nucleico isolado, caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência de polinucleotídeos que codifica a variante de subtilisina, como definida na reivindicação 1.

3. Ácido nucleico isolado, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que está compreendido em um vetor, opcionalmente ligado operacionalmente a um promotor.

4. Ácido nucleico isolado, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que está inserido no genoma de uma célula hospedeira.

5. Método para produzir pelo menos uma variante de subtilisina de uma subtilisina de *Bacillus*, caracterizado pelo fato de que

compreende:

(a) transformar uma célula hospedeira com um vetor de expressão que compreende pelo menos um ácido nucleico que codifica pelo menos uma variante de subtilisina, como definida na reivindicação 1, para produzir uma célula hospedeira transformada, em que a referida célula hospedeira é opcionalmente uma espécie de *Bacillus*; e

(b) cultivar a célula hospedeira transformada sob condições adequadas para a produção de pelo menos uma variante de subtilisina, para produzir pelo menos uma variante de subtilisina, e opcionalmente compreendendo ainda a colheita da variante de subtilisina produzida.

6. Método de limpeza, caracterizado pelo fato de que compreende colocar uma superfície ou um item em contato com uma composição de limpeza que compreende pelo menos uma variante de subtilisina, como definida na reivindicação 1, ou uma composição de limpeza compreendendo pelo menos uma variante de subtilisina, como definida na reivindicação 1, em que a referida composição é diferente de um produto para tecidos e de cuidados da casa, em que a composição é uma composição de limpeza com uma composição granular, em pó, sólida, em barra, líquida, comprimido, gel ou pasta, e em que a composição opcionalmente compreende ainda pelo menos um agente de branqueamento ou uma enzima adicional selecionada dentre hemi-celulases, celulases, peroxidases, proteases, metaloproteases, xilanas-es, lipases, fosfolipases, esterases, peridrolases, cutinases, pectinases, pectato-liases, mananases, queratinases, redutases, oxidases, fenoloxidas-es, lipoxigenases, ligninas-es, pululanases, ianas-es, anases, tannases, malucinas-es, lipases, enzimas, enzimas, peroxidases, proteases, metaloproteases, xilanas-es, lipases, fosfolipases, esterases, peridrolases, cutinases, pectinases, liases pectadas, mananases, queratinases, redutases, oxidases, fenoloxidas-es, lipoxigenases, lignina-

ses, pululanases, tannases, pentosanases, malanases, β -glucanases, arabinosidases, hialuronidases, condroitinases, lacases e amilases, ou qualquer combinação das mesmas.

FIG. 1

```

BPN'   1      A QSVPYGVSQ IKAPALHSQG YTGSNVKVAV IDSGIDSSH PDLKVAGGASM VPSETNPFQD
GG36   1      A QSVPWGISR VQAPAAHNRG LTGSGVKVAV LDTGIS-THP DLNIRGGASF VPGEPT-QD

BPN'  61 NNSHGTHVAG TVAALNNSIG VLGVAPSASL YAVKVLGADG SGQYSWIING IEWAIANNMD
GG36  59 GNGHGTHVAG TIAALNNSIG VLGVAPSDEL YAVKVLGASG SGSVSSIAQG LEWAGNNGMH

BPN'  121 VINMSLGGPS GSAALKAADV KAVASGVVVV AAAGNEGTSG SSSTVGYPGK YPSVIAVGAV
GG36  119 VANLSLGSFS PSATLEQAVN SATSRGVLVV AASGNSGAGS ----ISYPAR YANAMAVGAT

BPN'  181 DSSNQASFS SVGPELDVMA PGVSIQSTLP GNKYGAYNGT SMASPHVAGA AALILSKHPN
GG36  175 DQNNNRASFS QYGAGLDIVA PGVNVQSTYP GSTYASLNGT SMATPHVAGA AALVKQKNPS

BPN'  241 WTNTQVRSSL ENTTTKLGDS FYYGKGLINV QAAAQ
GG36  235 WSNVQIRNHL KNTATSLGST NLYGSGLVNA EAATR

```

FIG. 2

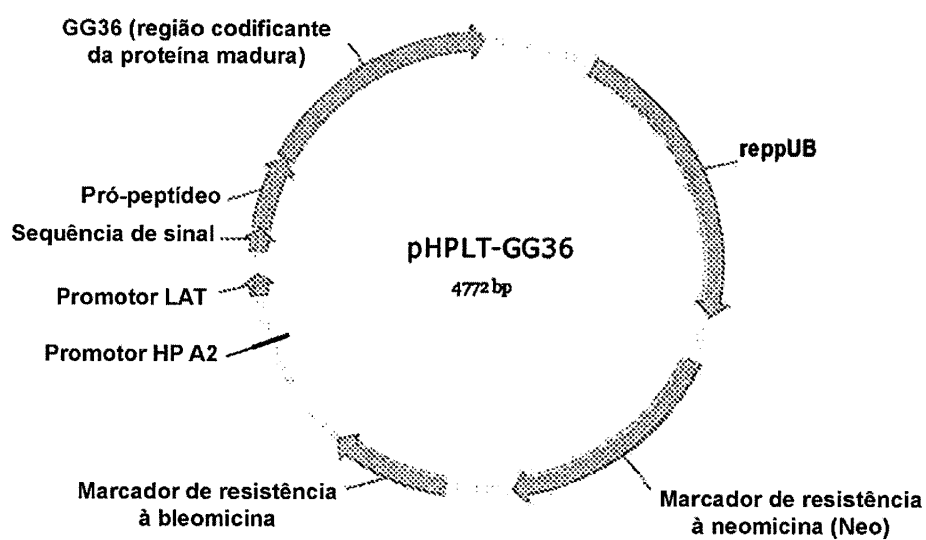


FIG 3.

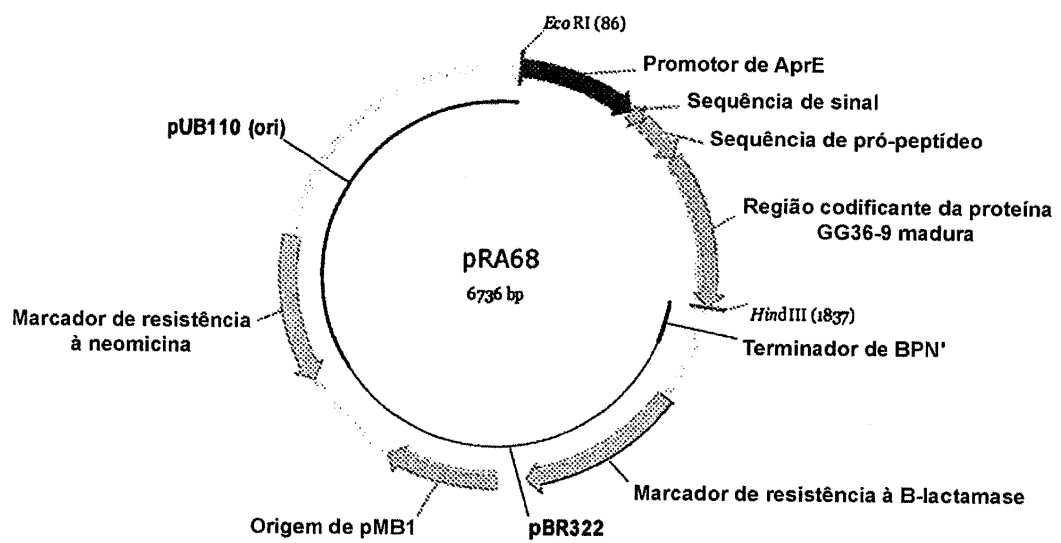


FIG. 4