



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

(21) BR 112019012980-4 A2



(22) Data do Depósito: 22/12/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 26/05/2020

(54) Título: VARIANTES ESTÁVEIS DE PROTEASE

(51) Int. Cl.: C12N 9/52; C11D 3/386; A23K 20/189.

(30) Prioridade Unionista: 22/12/2016 EP 16206367.1.

(71) Depositante(es): EW NUTRITION GMBH.

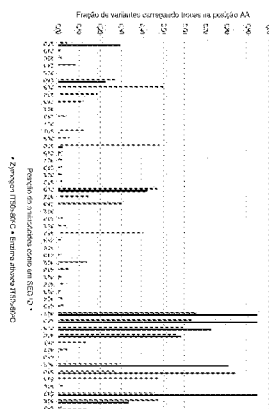
(72) Inventor(es): MICHELS, ANDREAS; SCHEIDIG, ANDREAS; ELEND, CHRISTIAN; KRAPP, CLAUDIA; HORN, THOMAS.

(86) Pedido PCT: PCT EP2017084452 de 22/12/2017

(87) Publicação PCT: WO 2018/115473 de 28/06/2018

(85) Data da Fase Nacional: 21/06/2019

(57) Resumo: "VARIANTES ESTÁVEIS DE PROTEASE". A presente invenção diz respeito a uma variante da protease que seja pelo menos 90% idêntica à sequência de aminoácidos de comprimento total de uma estrutura de Kumamolisinase AS da SEQ ID N.os 1 a 3, mantendo a atividade proteolítica, ou um fragmento, fração ou variante embaralhada da mesma mantendo a atividade proteolítica, cuja variante da protease demonstre estabilidade alterada ou melhorada em comparação com o tipo selvagem de Kumamolisinase AS da SEQ ID N.o 4, ou a estrutura de Kumamolisinase AS conforme estabelecido em qualquer das colunas verticais de SEQ ID N.os 1 a 3.



## **"VARIANTES ESTÁVEIS DE PROTEASE"**

### **CAMPO DA INVENÇÃO**

[1] A presente invenção diz respeito ao domínio das proteases.

### **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

[2] Atualmente, as proteases são usadas em uma grande variedade de aplicações industriais, incluindo alimentação animal, detergentes, processamento de frutas e bebidas, processamento de couro, produção de hidrolisados de proteínas, limpeza de superfícies duras ou limpeza de biofilme, tratamento de tecido necrótico ou queimado para promover a cicatrização de feridas e/ou preparação de alimentos, incluindo preparação de massa para panificação.

[3] Em muitas destas aplicações, a melhoria da estabilidade da enzima é uma vantagem significativa. A melhoria da termoestabilidade ajuda a aumentar a processabilidade da respectiva protease, pois esta última passa muitas vezes por tratamento térmico durante o processo de fabricação.

[4] Isto aplica-se, nomeadamente, à utilização de proteases nos alimentos para animais sempre que contribuam para melhorar a digestibilidade e a exploração dos nutrientes dos alimentos.

[5] Durante o processamento da ração, a ração é frequentemente submetida ao calor, por exemplo, pela aplicação de vapor, para reduzir ou eliminar patógenos, aumentar o tempo de armazenamento da ração e otimizar a utilização dos ingredientes, levando a uma melhor conversão alimentar. O tempo

de condicionamento pode variar de alguns segundos a vários minutos, dependendo tipo e formulação da ração. A temperatura durante o condicionamento tipicamente varia de 70°C a 100°C. Após o condicionamento, a alimentação é por vezes extrudada através de uma matriz de granulação, que por um curto período de tempo aumenta a temperatura da alimentação de forma incremental devido à dissipação de calor causada pelo atrito.

**[6]** No entanto, em outras aplicações, as enzimas protease também são expostas ao calor. Isto inclui a utilização em detergentes (por exemplo, exposição à água quente durante a lavagem da roupa), processamento de frutas e bebidas (exposição ao calor durante o processo de espremedura ou devido à pasteurização ou esterilização), processamento de couro, produção de hidrolisados de proteínas, limpeza de superfícies duras ou limpeza de biofilme, tratamento de tecidos necróticos ou queimados para promover a cicatrização de feridas, ajuda no processamento de engenharia de tecidos (esterilização e desnaturação de proteínas priônicas) e/ou preparação de alimentos, incluindo preparação de massa para panificação.

**[7]** Como as proteases são proteínas, elas são suscetíveis à desnaturação por calor e pressão. A desnaturação altera essencialmente a cadeia principal da enzima, resultando em diminuição dos níveis de atividade e diminuição da eficácia da enzima.

**[8]** Existem diferentes formas de melhorar a estabilidade da protease ou proteger as proteases do impacto térmico. Em

aplicações de ração animal, uma opção é a aplicação de líquido pós-peletização, que é relativamente complexa e cara porque requer a compra e instalação de equipamentos especializados, espaço para armazenar a enzima líquida e cálculo cuidadoso da quantidade de enzima a ser aplicada.

**[9]** Outra opção é a aplicação de um revestimento protetor antes da granulação da protease com outros ingredientes (por exemplo, em ração ou detergentes). Esta abordagem pode reduzir a eficácia da enzima porque o revestimento pode não se dissolver completamente, por exemplo, no meio de lavagem ou no aparelho digestivo do animal. Além disso, é difícil conseguir um projeto de revestimento que possa suportar o alto teor de calor e umidade do processo de granulação, mas que, posteriormente, se dissolva na temperatura mais baixa e em condições de umidade mais altas, por exemplo, no intestino do animal ou na máquina de lavar roupa.

**[10]** Outra opção é usar proteases intrinsecamente termoestáveis. Estas proteases são derivadas de organismos termofílicos e hipertermofílicos e têm propriedades estruturais e funcionais únicas de alta termoestabilidade. No entanto, essas proteases podem sofrer outras limitações, como atividade sub-ótima, especificidade, biodisponibilidade, faixa de pH ou processabilidade.

**[11]** É, portanto, um dos objetivos da presente invenção fornecer variantes estáveis de protease que não sofram com as limitações discutidas acima.

**SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

**[12]** Estes e outros objetos são atendidos com métodos e meios de acordo com as reivindicações independentes da presente invenção. As reivindicações dependentes estão relacionadas com realizações específicas.

**FORMAS DE REALIZAÇÃO DA INVENÇÃO**

**[13]** Antes de a invenção ser descrita em pormenor, deve entender-se que esta invenção não se limita aos componentes ou características estruturais específicas dos dispositivos ou composições descritas ou às etapas do processo dos métodos descritos, uma vez que tais dispositivos e métodos podem variar. Também deve ser entendido que a terminologia aqui utilizada serve apenas para descrever realizações particulares, e não pretende ser limitativa. O simples fato de certas medidas serem recitadas em pedidos mutuamente diferentes não indica que uma combinação destas medidas não possa ser utilizada em benefício mútuo. Quaisquer sinais de referência nas reivindicações não devem ser interpretados como limitando o escopo. Deve-se notar que, conforme usado na especificação e nas alegações anexas, as formas singulares "um/uma", "uns/umas", "o/a" ou "os/as" incluem referências singulares e/ou plurais, a menos que o contexto dite claramente o contrário. Além disso, nas alegações, a palavra "compreende" não exclui outros elementos ou etapas.

**[14]** Além disso, deve entender-se que, no caso de ser dada uma gama de parâmetros delimitadas por valores numéricos, considera-se que a gama inclui esses valores de limitação.

**[15]** Além disso, deve entender-se que as realizações aqui divulgadas não se destinam a ser entendidas como realizações individuais que não se relacionem entre si. As características discutidas com uma forma de realização destinam-se a ser divulgadas também em relação a outras realizações aqui apresentadas. Se, num caso, uma característica específica não for divulgada com uma forma de realização, mas com outra, a pessoa competente entenderia que não significa necessariamente que essa característica não se destina a ser divulgada com a referida outra forma de realização. A pessoa hábil entenderia que é a essência desta aplicação para divulgar dito recurso também para a outra forma de realização, mas que apenas para fins de clareza e para manter a especificação em um volume gerenciável isso não foi feito.

**[16]** De acordo com uma das formas de realização da invenção, é fornecida uma variante da protease que é pelo menos 90% idêntica à sequência de aminoácidos de comprimento total de uma cadeia principal de Kumamolisina AS, tal como estabelecido em qualquer dos SEQ ID N.ºs 1 a 3, ou um fragmento, fração ou variante baralhada da mesma, mantendo a atividade proteolítica. A variante protease demonstra estabilidade alterada ou melhorada em comparação com:

**[17]** (i) do tipo selvagem Kumamolisina AS, tal como estabelecido na SEQ ID N.º 4, ou;

**[18]** (ii) a cadeia principal do Kumamolisina AS, conforme estabelecido em qualquer uma das SEQ ID N.ºs 1 a 3.

**[19]** O termo "variante aleatória" refere-se a uma combinação destes fragmentos ou frações com um ou mais fragmentos de outras enzimas homólogas, desde que essa combinação mantenha a atividade proteolítica.

**[20]** O termo "enzima homóloga" descreve enzimas pertencentes à mesma dobra estrutural que a Kumamolisina e pelo menos 40% de identidade sequencial. Esta categoria engloba Sedolisina conforme discutido abaixo.

**[21]** Alguns mutantes de Kumamolisina AS foram descritos. A descoberta da cepa mutante N291D de Kumamolisina AS foi discutida para fornecer um tratamento útil contra a doença celíaca. Há muitas propostas que sugerem a criação de um organismo geneticamente modificado que poderia produzir a proteína N291D Kumamolisina AS no trato gastrointestinal humano. Ver aplicação US 20140178355 A1.

**[22]** De preferência, a variante Kumamolisina AS segundo a invenção tem 93 % de identidade, mais de preferência 95 % de identidade, mais de preferência 98 % de identidade, mais de preferência 99 % de identidade.

**[23]** O termo "Kumamolisina" refere-se às proteases ácidas da família Sedolisina de peptídeos, também chamada S53 (MEROPS Accession MER000995, veja também Wlodawer et al., 2003), compreendendo endopeptidases de ação ácida e uma tripeptidase. As sedolisinas são endopeptidases com pH ácido ótimo que diferem da maioria das endopeptidases por serem resistentes à inibição por pepstatina (Terashita et al., 1981; Oda et al., 1998).

**[24]** A ativação das sedolisinas envolve clivagem autocatalítica em pH abaixo do pH 6,5, melhor abaixo do pH 3,5 (ver também pedido de patente EP1617176044 e Okubo et al., 2016), que libera um ou mais peptídeos para entregar a forma maturada e ativa. Esta clivagem autocatalítica é inibida em condições alcalinas, neutras e ligeiramente ácidas.

**[25]** Sedolisinas compreendem uma tríade catalítica com Glu, Asp e Ser, que em Kumamolisina AS segundo a SEQ ID NO 1 residem nas posições Glu267, Asp271 e Ser278. O resíduo de Ser é o nucleófilo equivalente a Ser na tríade catalítica Asp, His, Ser tríade de proteases de subtilisina (família S8 de MEROPS), e a Glu da tríade é uma substituição funcional para a base geral His em subtilisina embora não em posições equivalentes estruturais.

**[26]** As dobras proteicas das sedolisinas estão claramente relacionadas com as da subtilisina, e ambos os grupos são por vezes chamados de proteases serinas. No entanto, as sedolisinas têm loops adicionais. As sequências de aminoácidos não são muito semelhantes às das subtilisinas, o que, juntamente com os resíduos de sítios ativos bastante diferentes e o consequente pH mais baixo para a atividade máxima, justifica as famílias separadas.

**[27]** Num dos componentes, é fornecida uma variante da protease, que inclui uma sequência de aminoácidos derivada de uma Kumamolisina AS, conforme estabelecido na SEQ ID N.º 1, ou um fragmento, fração ou variante baralhada da mesma, mantendo a atividade proteolítica, cuja variante da protease tem uma ou



mais substituições de aminoácidos numa ou mais posições de resíduos na SEQ ID N.º 1 selecionado do grupo constituído por D447, A449, A517, N510, V502, E453, E360, A514, A460, A392, A386, T301, D199, Q518, G266, P553, E269, R412, S435, G320, T326, T461, Q244, D293, A487, V274, A372, K283, T308, A418, 1391, A423, A331, S327, 1219, M333, A329, N515, A378, S434, E421, A433, S230, Q393, D399, Y490, G281, Y287, R516, A475, S354, S315P, W325, L442, A470, S324, Q361, A190, T196, Q202, E228, A229, A242, D251, S262, N291, L297, H305, D306, V314, A328, 1330, L338, A342, A351, D358, G388, D402, V455, E459, A478, K483, Q497, T507, L540, Q542, A548, P551, R166 e/ou D265.

**[28]** Note-se que, embora a numeração acima apresentada se refira a SEQ ID N.º 1 ou 4 (que são quase idênticas, sendo 4 o do tipo selvagem e 1 a verdadeira cadeia principal utilizada para a mutagênese, sendo a diferença entre os dois o resíduo N terminal AA), a protease reivindicada pode ser um fragmento, uma fração ou uma variante baralhada da mesma, mantendo a atividade proteolítica. Nesse caso, a sequência de aminoácidos resultante é mais curta do que a da SEQ ID N.º 1 ou 4, enquanto a numeração dos resíduos mutantes refere-se ainda ao comprimento total da SEQ ID N.º 1 ou 4, e tem de ser traduzido respectivamente para a numeração da forma mais curta.

**[29]** Em uma forma de realização, a variante de protease demonstra estabilidade alterada ou melhorada em comparação com:

**[30]** (i) Kumamolisin AS do tipo selvagem, tal como estabelecido na SEQ ID N.º 4, ou;

**[31]** (ii) a cadeia principal do Kumamolisinase A, conforme estabelecido em qualquer uma das SEQ ID N.º 1 a 3.

**[32]** Em uma forma de realização, a variante protease tem pelo menos uma substituição de aminoácidos selecionada do grupo constituído por D447S, A449Y, A517T, N510H, E360L, E360V, E360C, V502C, E453W, A514T, A514Y, A514D, A514S, A460W, A386I, A392V, A392L, A392I, A392M, T301S, D199E, Q518G, P553K, E269M, E269T, E269C, E269H, E269Q, G266A, D293Y, G320A, R412Q, E421R, A487Q, T461V, T461C, A331F, A331Y, A329Q, A329H, A329T, S435I, S435R, S435T, S435V, V274I, A372S, K283L, Q244C, Q244G, T308C, A418W, I391W, A423V, T326R, T326W, T326L, T326K, I219L, S327F, S327L, S327W, M333I, N515G, A378G, S434G, A433G, S230D, Q393S, D399S, Y490W, A190D, T196S, Q202D, E228Q, A229W, A242S, D251S, S262C, G281R, Y287K, N291T, N291S, D293F, L297T, T301C, T301M, H305F, H305W, D306S, V314M, V314L, S315P, G320Q, G320S, S324L, S324R, W325K, A328W, A328D, A328R, A328Y, I330L, M333Y, M333L, L338R, A342R, A351S, S354E, S354Q, D358G, Q361C, Q361L, A386L, A386V, A386M, G388C, D402E, R412M, R412E, R412D, L442W, L442W, D447C, D447A, A449L, A449M, A449E, A449N, E453Y, E453F, V455I, V455L, E459W, A460R, A470V, A475V, A478L, K483A, Q497Y, Q497M, Q497D, Q497R, V502T, T507L, R516L, R516E, R516I, A517S, L540V, Q542H, Q542D, Q542S, A548S, P551N, P551R, P553L, R166I, D265T, em comparação com a Kumamolisinase A, conforme estabelecido na SEQ ID N.º 1 ou 4.

**[33]** Estas substituições individuais de aminoácidos são apresentadas no quadro 1. Note-se que, enquanto a numeração

acima se refere a SEQ ID N.º 1 ou 4, a protease reivindicada pode ser um fragmento, fração ou variante baralhada dela, mantendo a atividade proteolítica. Nesse caso, a sequência de aminoácidos resultante é mais curta ou mais longa do que a da SEQ ID N.º 1 ou 4, enquanto a numeração dos resíduos mutantes ainda se refere ao comprimento total da SEQ ID N.º 1 ou 4.

**[34]** Em uma forma de realização da invenção, a variante protease tem pelo menos uma substituição de aminoácidos comparada com a Kumamolisin A5, conforme estabelecido na SEQ ID N.º 1 ou 4, cuja substituição é selecionada do grupo constituído:

**[35]** A517T ou A517S

**[36]** A514S, A514T ou A514D

**[37]** N510H

**[38]** V502C

**[39]** A449Y, A449N ou menos preferencial A449E

**[40]** D447S ou D447C

**[41]** A392I, A392L, A392V ou A392M

**[42]** E360L, E360V ou E360C

**[43]** E269H, E269T, E269M, E269C ou E269Q

**[44]** Q518G

**[45]** G320Q, G320A ou menos preferido G320S

**[46]** A386I, A386L, A386V ou A386M

**[47]** G266A

**[48]** A372S

**[49]** E453Y, E453W ou menos preferido E453F

**[50]** A460W

- [51]** A329Q, A329H ou A329T
- [52]** D293Y
- [53]** R412E, R412D, R412D, R412Q ou R412M
- [54]** T301S
- [55]** D199E
- [56]** A331F ou A331Y
- [57]** S435T, S435R ou S435I
- [58]** V274I
- [59]** D399S
- [60]** S230D
- [61]** S434G
- [62]** M333I ou M333L
- [63]** N515G
- [64]** A418W
- [65]** I391W
- [66]** E421R
- [67]** A487Q
- [68]** A378G
- [69]** A423V
- [70]** T326K, T326L, T326L, T326 R ou T326W
- [71]** A433G
- [72]** D399S
- [73]** Y490W
- [74]** R516E ou R516I
- [75]** P553K
- [76]** V314L

**[77]** S327W, S327L ou S327FA475V

**[78]** A342R

**[79]** S354E ou S354Q

**[80]** S315P

**[81]** Algumas dessas substituições causam uma alta  $\Delta IT50$  quando introduzidas individualmente no Kumamolisinase AS conforme estabelecido na SEQ ID N.º 1 ou 4, e são, portanto, preferidas, enquanto outras têm uma alta ocorrência nos clones combinatórios e distintos das Tabelas 2a, 2b e 4 e algumas combinações, que têm uma combinação de substituições individuais com um alto total  $\Delta IT50$ .

**[82]** Algumas podem ser usadas para estabilizar a enzima e algumas combinações resultam em outras características que são relevantes para a produção ou desempenho na ração, como títulos de fermentação, a hidrólise de fatores anti-nutritivos como inibidores da protease (soja tipo Bowman-Birk e Kunitz e/ou inibidores da tripsina e/ou quimotripsina), perfil de pH, pH e estabilidade da pepsina, ou estabilidade contra e desempenho sob maior força iônica.

**[83]** Note-se que, enquanto a numeração acima se refere à SEQ ID N.º 1 ou 4, a protease reivindicada pode ser um fragmento, fração ou variante baralhada dela, mantendo a atividade proteolítica. Nesse caso, a sequência de aminoácidos resultante é mais curta do que a da SEQ ID N.º 1 ou 4, enquanto a numeração dos resíduos mutantes ainda se refere ao comprimento total da SEQ ID N.º 1 ou 4.

**[84]** Em uma forma de realização da invenção, a variante protease tem pelo menos duas substituições de aminoácidos em comparação com a cadeia principal da Kumamolisinase AS, conforme estabelecido na SEQ ID N.º 1 ou 4. De preferência, a variante protease tem pelo menos três, mais preferencialmente ao menos quatro, mais preferencialmente ao menos cinco, mais preferencialmente ao menos seis substituições de aminoácidos selecionados a partir desse grupo. De preferência, estas substituições de aminoácidos são combinações das substituições individuais acima referidas.

**[85]** Num dos casos da invenção, a variante de protease tem pelo menos duas substituições de aminoácidos em comparação com a cadeia principal da Kumamolisinase AS, tal como estabelecido na SEQ ID N.º 1 ou 4, estando pelo menos duas substituições de aminoácidos em duas ou mais posições de resíduos na SEQ ID N.º 1 ou 4 selecionadas do grupo constituído por 447 e 449, 453, 502, 510, 517, 360, 460, 199, 266, 301, 386 e 514. De preferência, a variante protease tem pelo menos três, mais preferencialmente ao menos quatro, mais preferencialmente ao menos cinco, mais preferencialmente ao menos seis substituições de aminoácidos selecionados a partir desse grupo.

**[86]** As tabelas 2a, 2b e 4 mostram conjuntos dos chamados "clones distintos" ou "clones combinatórios" que têm combinações das mutações individuais estabelecidas acima.

**[87]** Como usado aqui, o termo "clone ou variante combinatória" significa um clone ou variante selecionado de uma biblioteca de

recombinação. Tal biblioteca de recombinação contém uma população com diferentes quantidades e mutações selecionadas do grupo da tabela 1.

**[88]** Como usado aqui, o termo "clone ou variante distinta" significa um clone construído contendo um conjunto definido de mutações selecionadas do grupo da tabela 1 em uma abordagem racional.

**[89]** Preferencialmente, dita a estabilidade melhorada que a variante protease de acordo com a invenção tem é a melhoria da termoestabilidade (IT50). A termoestabilidade de uma enzima é geralmente determinada por medição da temperatura de inativação (IT 50). A "temperatura de inativação" é definida como a temperatura à qual a atividade residual da enzima após incubação durante um determinado período e subsequente arrefecimento até à temperatura ambiente é 50% da atividade residual da mesma enzima incubada durante o mesmo período e nas mesmas condições à temperatura ambiente.

**[90]** De acordo com uma realização, a variante de protease tem um conjunto de substituições em resíduos selecionados na cadeia principal da Kumamolisina AS, conforme estabelecido na SEQ ID N.º 1 ou 4, que é pelo menos um dos seguintes:

**[91]** a) 360, 447, 449 e 510;

**[92]** b) 447, 449 e 514, e/ou;

**[93]** c) 447, 449, 453 e 517.

**[94]** Estes três conjuntos de resíduos substituídos simultaneamente ocorrem em três conjuntos de clones específicos,

distintos ou combinatórios, que são particularmente preferidos (mutações de consenso). Ver quadro 2a/figura 3, quadro 2b/figura 4 e quadro 4/figura 5. Por estas razões, estes conjuntos de resíduos substituídos simultaneamente parecem ser particularmente sinérgicos quando se trata de melhorar a estabilidade.

**[95]** De acordo com uma forma de realização, é dito que a estabilidade melhorada é a termoestabilidade melhorada (IT50) da enzima ativada ou do Zimógeno. Em uma forma de realização, a variante protease tem um IT50 entre  $\geq 75$  e  $\leq 105$  °C.

**[96]** Em algumas realizações, para a enzima ativada é fornecido um IT50 entre  $\geq 70$  e  $\leq 90$ °C, enquanto a para o Zimógeno é fornecido um IT50 entre  $\geq 80$  e  $\leq 105$ °C.

**[97]** A enzima Kumamolisinase AS do tipo selvagem tem uma IT50 de  $79,6$  °C  $\pm 0,4$  °C ( $n = 46$ ) como Zimógeno, ou seja, o Zimógeno inativo, e uma IT50 de  $59$ °C  $\pm 1$ °C ( $n = 10$ ) como enzima ativada. No curso desta especificação, as diferentes variantes são caracterizadas pelo seu IT50, ou por  $\Delta$ IT50 (ou seja, a diferença em relação ao IT50 do tipo selvagem).

**[98]** De acordo com outra forma de realização da invenção, é fornecida uma molécula de ácido nucleico que codifica uma variante da protease de acordo com a descrição supra. Além disso, é fornecido um plasmídeo ou sistema vetorial que inclui essa molécula de ácido nucleico, bem como uma célula hospedeira a ser transformada com esse plasmídeo ou vetor e/ou que inclui essa molécula de ácido nucleico.



**[99]** Além disso, é fornecido um método para a produção de uma variante protease ou protease, método esse que abrange:

**[100]** a) cultivando essa célula hospedeira, e;

**[101]** b) isolar a variante protease ou protease dessa célula hospedeira, ou colher a variante protease ou protease do meio.

**[102]** De acordo com outra forma de realização da invenção, é fornecida uma composição que inclui uma variante de protease de acordo com a descrição acima, cuja composição tem um pH de  $\geq 5$ .

**[103]** Tal composição é geralmente discutida - mas não com as variantes específicas de protease aqui divulgadas - no pedido EP n.º 16176044.2-1375 e nos pedidos posteriores reivindicando a sua prioridade, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência.

**[104]** De acordo com outra realização da invenção, é fornecido um aditivo para a alimentação animal, um ingrediente para a alimentação animal, um suplemento alimentar e/ou um alimento para animais que inclua uma variante da protease ou uma composição em conformidade com a descrição supra.

**[105]** Além disso, é fornecida a utilização de uma variante de protease de acordo com a descrição supra para o fabrico de um alimento para animais.

**[106]** Este aditivo de ração, ingrediente de ração, suplemento de ração e/ou ração animal é preferencialmente para aves, suínos, peixes e aquicultura monogástrica, onde auxiliar para aumentar a digestão e absorção de ração animal, além de degradar os compostos proteínogênicos que são prejudiciais para a saúde animal ou para a digestão.

[107] Além disso, a utilização de uma protease de acordo com a descrição supra é fornecida para, pelo menos, um objetivo ou agente selecionado a partir do grupo constituído:

[108] detergente;

[109] processamento de frutas e bebidas;

[110] processamento de couro;

[111] produção de hidrolisados de proteínas;

[112] limpeza de superfícies duras ou limpeza de biofilme;

[113] tratamento de tecido necrótico ou queimado para promover a cicatrização de feridas;

[114] auxiliares de processamento em engenharia de tecidos e/ou;

[115] preparação de alimentos, incluindo a preparação da massa para cozedura.

[116] Da mesma forma, um aditivo, ingrediente ou agente para uma finalidade ou agente selecionado grupo que consiste em:

[117] detergente;

[118] processamento de frutas e bebidas;

[119] processamento de couro;

[120] produção de hidrolisados de proteínas;

[121] limpeza de superfícies duras ou limpeza de biofilme;

[122] tratamento de tecido necrótico ou queimado para promover a cicatrização de feridas;

[123] auxiliares de processamento em engenharia de tecidos e/ou;

[124] preparação de alimentos, incluindo a preparação da massa

para cozedura.

**[125]** É fornecido qual o aditivo, ingrediente ou agente que inclui uma composição de acordo com a descrição supra.

**[126]** Além disso, é fornecido um processo de geração de uma variante de protease de acordo com a descrição acima, que compreende o processo:

**[127]** (i) mutagênese de um ADN, cDNA ou mRNA que codifique uma sequência de aminoácidos de Kumamolisin AS, tal como estabelecido em qualquer uma das SEQ ID N.º 1 a 4;

**[128]** (ii) expressando um ou mais mutantes de Kumamolisin AS assim obtidos, e;

**[129]** (iii) testar um ou mais mutantes de Kumamolisin AS para pelo menos verificar a estabilidade, de preferência a termoestabilidade.

**[130]** De preferência, nesse método, determina-se a sequência de codificação do ácido nucleico e/ou a sequência de aminoácidos de uma ou mais variantes de Kumamolisin AS. Para este efeito, podem ser utilizados métodos de rotina do estado da técnica anterior.

#### **EXPERIMENTOS E FIGURAS**

**[131]** Embora a invenção tenha sido ilustrada e descrita em detalhes nos desenhos e na descrição anterior, tal ilustração e descrição devem ser consideradas ilustrativas ou exemplares e não restritivas; a invenção não se limita às realizações divulgadas. Outras variações das realizações reveladas podem ser compreendidas e efetuadas por pessoas habilitadas na arte de

praticar a invenção reivindicada, a partir dos estudos dos desenhos, da divulgação e das reivindicações anexas. Quaisquer sinais de referência não devem ser interpretados como limitando o escopo.

**[132]** Todas as sequências de aminoácidos aqui divulgadas são mostradas de N-terminal a C-terminal; todas as sequências de ácidos nucleicos aqui divulgadas são mostradas 5'->3'.

**[133]** 1) Sequências de aminoácidos da cadeia principal da Kumamolisinina AS

**[134]** SEQ ID N.º 1 mostra a sequência de proenzima (propeptídeo mais enzima, também chamada aqui de Zimógeno) da cadeia principal Kumamolisinina AS usado aqui. É importante compreender que, enquanto a sequência de Kumamolisinina AS do tipo selvagem tem um resíduo N-terminal M, a cadeia principal de Kumamolisinina AS aqui utilizado carece do dito M, pois este último foi substituído por uma sequência de sinal que foi posteriormente clivada. Tal sequência de sinais é, por exemplo. O peptídeo de sinal sacB MNIKKKFAKQATVLTFTTA LLAGGATQAF A.

**[135]** Na SEQ ID N.º 1, o propeptídeo compreende, portanto, AAs 2 - 189 (o antigo N-terminal M que falta ainda é considerado como AA N.º 1 na numeração da SEQ ID N.º), e a enzima compreende AAs 190 - 553:

```
SDMEKWPKE GEEARAVLQG HARAQAPQAV DKGPVAGDER MAVTVVLRRO RAGELAAHVE 60
RQAAIAPHAR EHLKREAF A SHGASLDDFA ELRRFADAHG LALDRANVAA GTAVLSGPVD 120
AINRAFGVEL RHFDHPDGSY RSYLGEVTVP ASIAPMIEAV LGLDTRPVAR PHFRMQPRAE 180
GGFEARSQAA APTAYTPLDV AQAYQFPEGL DGQGQCIAII ELGGGYDEAS LAQYFASLGV 240
PAPQVVSVSV DGASNQPTGD PSGPDGEVEL DIEVAGALAP GAKFAVYFAP NTDAGFLDAI 300
```

TTAIHDPTLK PSVVSISWGG PEDSWTSAAI AAMNRAFLDA AALGVTVLAA AGDSGSTDGE 360  
QDGLYHVDFP AASPYVLACG GTRLVASGGR IAQETVWNDG PDGGATGGGV SRIFPLPAWQ 420  
EHANVPPSAN PGASSGRGVP DLAGNADPAT GYESVVIDGEA TVIGGTSAVA PLFAALVARI 480  
NQKLKAVGY LNPTLYQLPA DVFHDITEGN NDIANRAQIY QAGPGWDPCT GLGSPIGVRL 540  
LQALLPSASQ PQP 553

**[136]** O propeptídeo é sombreado de cinza. A tríade catalítica SED (=Ser/Glu/Asp) consiste de E267, D271 e S467, mostrados em itálico. As posições em que os inventores encontraram mutações que resultam em propriedades alteradas/melhoradas são sublinhadas.

**[137]** 2) Sequências de aminoácidos da cadeia principal da Kumamolisinina AS mais a sequência líder e a etiqueta de polihistidina ("His-tag")

**[138]** Na SEQ ID N.º 2, a sequência líder sacB compreende AAs 1 a 29 (sublinhado ondulado) e substitui o N-terminal M original do propeptídeo. O propeptídeo (sombreado a cinzento) é composto por AA 30 - 217, a enzima ativada compreende AA 218 - 581 e a "His-tag" compreende AAs 582 - 587 (sublinhado duplo):

MNIKKFAKQA TVLTFTTALL AGGATQAFAS DMEKPWKEGE EARAVLQGH ARAQAPQAVDK 60  
 GPVAGDERMA VTVVLRQRQA GELAAHVERQ AAIAPHAREH LKREAFASH GASLDDFAEL 120  
 RRFADAHGLA LDRANVAAGT AVLSGPVDAI NRAFGVELRH FDHPDGSYRS YLGEVTVPAS 180  
 IAPMIEAVLG LDTRPVARPH FRMQRRAEQG FEARSQAAP TAYTPLDVAQ AYQFPEGLDG 240  
 QGQCIATIEL GGGYDEASLA QYFASLGVPA PQVVSVSVDG ASNQPTGDPS GPDGEVELDI 300  
 EVAGALAPGA KFAVYFAPNT DAGFLDAITT AIHDPTLKPS VVSISWGGPE DSWTSAAIAA 360  
 MNRAFLDAAA LGVTVLAAAAG DSGSTDGEQD GLYHVDFPAA SPYVLACGGT RLVASGGRIA 420  
 QETVWNDGPD GGATGGGVSR IFPLPAWQEH ANVPPSANPG ASSGRGVPDL AGNADPATGY 480

EVVIDGEATV IGGTSAVAPL FAALVARINQ KLGKAVGYLN PTLYQLPADV FHDITEGNND 540  
 IANRAQIYQA GPGWDPCTGL GSPIGVRLLO ALLPSASQPQ PHHHHHH 587

**[139]** 3) Aminoácido Sequências da cadeia principal ativada de Kumamolisina AS desprovida de propeptídeo

**[140]** Na SEQ ID N.º 3, a enzima da cadeia principal da Kumamolisina AS ativada é mostrada com AAs 1 a 364:

AAPTAYTPLD VAQAYQFPEG LDGQGQCIAI IELGGGYDEA SLAQYFASLG VPAPQVVSVS 60  
 VDGASNQPTG DPSGPDGEVE LDIEVAGALA PGAKFAVYFA PNTDAGFLDA ITTAIHDPDL 120  
 KPSVVSISWG GPEDSWTSAA IAAMNRAFLD AAALGVTVLA AAGDSGSTDG EQDGLYHVDF 180  
 PAASPYVLAC GGTRLVASGG RIAQETVWND GPDGGATGGG VSRIFPLPAW QEHANVPPSA 240  
 NPGASSGRGV PDLAGNADPA TGYEVVIDGE ATVIGGTSAP APLFAALVAR INQKLGKAVG 300  
 YLNPTLYQLP ADVFHDITEG NNDIANRAQI YQAGPGWDPC TGLGSPIGVRL LQALLPSAS 360  
 QPQP 364

**[141]** 4) Aminoácido Sequência de Kumamolisina AS do tipo selvagem

**[142]** SEQ ID N.º 4 mostra a sequência de proenzima (propeptídeo mais enzima) do tipo selvagem Kumamolisina AS, obtida de *Alicyclobacillus sendaiensis* (GenBank: AB085855.1). A SEQ ID NO 4 difere da SEQ ID N.º 1, que mostra a sequência da cadeia principal de Kumamolisina AS aqui utilizada, pois esta última carece do N-terminal M ainda presente na SEQ do tipo selvagem ID N.º 4. Isto porque o N-terminal M foi substituído, na SEQ ID N.º 1, pela sequência de sinal sacB, que foi posteriormente clivada. Na SEQ ID N.º 4, o propeptídeo compreende AAs 1 a 189, e a enzima compreende AAs 190 - 553:

MSDMEKPWKE GEEARAVLQG HARAQAPQAV DKGPVAGDER MAVTVVLRRO RAGELAAHVE 60

RQAAIAPHAR EHLKREAF~~AA~~ SHGASLDDFA ELRRFADAHG LALDRANVAA GTAVLSGPVD 120  
 AINRAFGVEL RHFDHPDGSY RSYLGEVTVP ASIAPMIEAV LGLDTRPVAR PHFRMQORRAE 180  
 GGFEARSQAA APTAYTPLDV AQAYQFPEGL DGQGQCIAII ELGGGYDEAS LAQYFASLGV 240  
 PAPQVVSVSV DGASNQPTGD PSGPDGEVEL DIEVAGALAP GAKFAVYFAP NTDAGFLDAI 300  
 TTAIHDP~~TLK~~ PSVVSISWGG PEDSWTSAAI AAMNRAFLDA AALGVTVLAA AGDSGSTDGE 360  
 QDGLYHVD~~FP~~ AASPYVLACG GTRLVASGGR IAQETVWNDG PDGGATGGGV SRIFPLPAWQ 420  
 EHANVPPSAN PGASSGRGVP DLAGNADPAT GYEVVIDGEA TVIGGTSAVA PLFAALVARI 480  
 NQKL~~GK~~AVGY LNPTLYQLPA DVFHDITEGN NDIANRAQIY QAGPGWDPCT GLGSPIGVRL 540  
 LQALLPSASQ POP 553

**[143]** Novamente, o propeptídeo está sombreado de cinzento. A tríade catalítica SED (=Ser/Glu/Asp) consiste de E267, D271 e S467, mostrados em *itálico*.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

**[144]** A Fig. 1 mostra a distribuição das mutações em variantes otimizadas para a estabilidade térmica do Zimógeno e da enzima ativada.

**[145]** A Fig. 2 mostra os efeitos da força iônica sobre a estabilidade e o desempenho do TP e das variantes superiores #1 a #7 da tabela 4.

**[146]** Fig. 3 - 5 mostram a ocorrência de substituições na posição AA em diferentes conjuntos de clones distintos e clones combinatórios.

**[147]** Exemplo 1: Ensaio de atividade de protease

**[148]** Os ensaios de atividade protease foram realizados em placas de microtitulação.

**[149]** (a) Ensaio AAPF 96 de bom formato

**[150]** Composição tampão: 200 mM Acetato de sódio, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,01% Triton X-100 a pH 3 (dependendo experimento);

**[151]** Solução estoque de substrato: 100 mM em água livre de DMSO;

**[152]** Solução de substrato de trabalho: solução estoque de substrato diluída a 1:50 em solução tampão.

**[153]** Execução: Carregue 50  $\mu\text{L}$  da amostra diluída nos poços da placa de fundo plana transparente Nunc 96. A diluição é feita em água contendo 0,01% de Triton-X100 correspondente à atividade volumétrica da amostra. Iniciar a reação adicionando 50  $\mu\text{L}$  de solução de trabalho de substrato. Medir a cinética a 37°C através da monitorização do aumento da adsorção a 410 nm como medida da atividade enzimática. A atividade foi calculada através da construção de uma curva de calibração com uma preparação enzimática de referência da cadeia principal com atividade proteolítica conhecida, medida por um método de referência.

**[154]** Para o ensaio da atividade da protease em diferentes valores de pH foram utilizadas as seguintes soluções tampão, cada um com 200 mM: glicina/HCL entre pH 2,0 - 3,0, citrato trissódico/ácido cítrico entre 3,0 e 6,0 e Tris/ácido maleico entre 6,0 e 7,5.

**[155]** (b)  $\text{IT}_{50}$

**[156]** O  $\text{IT}_{50}$  define a temperatura onde 50% da atividade é inativada nas condições descritas acima. Embora não seja equivalente, é uma medida para a estabilidade térmica na



aplicação, por exemplo, condições de granulação ou condições numa aplicação de detergente, lavagem da louça ou limpeza de um tecido ou superfície dura e outras aplicações técnicas.

**[157]** O rastreio de variantes enzimáticas em condições preditivas é essencial. Para proteases como as aqui descritas, o rastreamento de variantes termicamente mais estáveis pelos métodos aqui descritos pode ser afetado pela auto-hidrólise da protease. Como já descrito em pedido de patente EP1617606044 Exemplo 9, o rastreio de variantes com maior estabilidade térmica em condições em que a protease é ativa resulta num grande número de falsos positivos, como resultado de um efeito misto de inativação térmica e auto-hidrólise. As mesmas aplicações ensinam a contornar esse problema na ausência de pequenas moléculas reversíveis inibidoras enzimáticas, como é o caso da classe de protease ácida aqui descrita, executando o teste de estabilidade térmica das variantes enzimáticas e enzimáticas na forma de Zimógeno da enzima inativa da forma descrita abaixo.

**[158]** Composição das soluções tampão: 50 mM de fosfato de sódio, 0,25 mM  $\text{CaCl}_2$  pH6,5 e 800 mM de glicina/HCl pH2,8.

**[159]** Execução de inativação térmica: as amostras foram diluídas correspondendo à atividade volumétrica em tampão fosfato de potássio. Verificou-se que o pH da solução final era superior a 6,3. As amostras foram transferidas em réplicas, 20  $\mu\text{L}$  por poço, para uma placa PCR de 384 poços, de acordo com a direção do gradiente de temperatura da máquina de PCR. As placas

foram seladas com uma folha de cobertura adesiva ou cola quente e incubadas num ciclador de gradiente térmico com um gradiente de temperatura de  $\pm 12^{\circ}\text{C}$  em torno do valor IT50 esperado durante 10 minutos. As amostras foram resfriadas a  $8^{\circ}\text{C}$  antes de se medir a atividade residual das amostras com AAPF-PNA como se segue. Amostras, 15  $\mu\text{L}$  cada uma da placa de incubação de temperatura foram transferidas para uma microplaca PS de fundo plano transparente 384 bem lubrificante e 9  $\mu\text{L}$  de tampão de glicina foi adicionado para ativar a protease durante uma incubação de 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após a ativação da protease, o ensaio foi iniciado com a adição de 24  $\mu\text{L}$  de uma solução de AAPF-PNA (2 mM de AAPF-PNA em água com 0,01% de Triton-X100) e a atividade foi medida seguindo a cinética a  $37^{\circ}\text{C}$ . Os dados experimentais normalizados para atividade residual nas temperaturas de inativação foram ajustados a uma função logística de quatro parâmetros para avaliar o IT50.

**[160]** (c) IT50 sem propeptídeo - proteína enzimática ativada:

**[161]** Ativação da enzima antes da execução da inativação térmica. As amostras foram diluídas correspondendo à atividade volumétrica em tampão de glicina pH 2,8 como descrito em 2b) e o pH foi verificado para ser igual ou inferior a pH 4,0. As amostras foram ativadas por uma incubação durante 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após a incubação, o pH foi ajustado para acima de 7,0 diluindo as amostras 1:3 em tampão de fosfato de sódio 50 mM pH 8,0. Inativação térmica da execução da proteína enzimática ativada. As alíquotas da proteína da enzima ativada foram transferidas em

réplicas, 20 µL por poço, em um poço 384 da placa de PCR de acordo com a direção do gradiente de temperatura da máquina de PCR. As placas foram seladas com uma folha de cobertura adesiva ou cola quente e incubadas num ciclador de gradiente térmico com um gradiente de temperatura de  $\pm 12$  °C em torno do valor IT50 esperado durante 10 minutos. As amostras foram resfriadas a 8°C antes de se medir a atividade residual das amostras com AAPF-PNA como se segue. Amostras, 15 µL cada uma da placa de incubação da temperatura foram transferidas para uma microplaca PS de fundo plano transparente 384 bem mais verde e 9 µL de tampão de glicina/HCl foi adicionado para ajustar o pH para 3,0. O ensaio foi iniciado com a adição de 24 µL de uma solução de AAPF-pNA (2 mM AAPF-pNA em água com 0,01% Triton-X100) e a atividade foi medida seguindo a cinética a 37°C. Os dados experimentais normalizados para atividade residual nas temperaturas de inativação foram ajustados a uma função logística de quatro parâmetros para avaliar o IT50.

**[162]** (d) Perfil de pH - proteína enzimática ativada

**[163]** O sobrenadante bacteriano não diluído contendo proteína enzimática foi titulado com HCl 1 M a pH 4 e a enzima foi ativada a 37°C por 60 min. 20 µL de amostra foram adicionados a 200 µL de tampão Britton Robinson com pH 1,8 a 7,0 (ajustado para condutividade de 15 mS/cm com NaCl). 20 µL foram então transferidos para uma microplaca de fundo plano PS de 384 poços Greiner mais 20 µL de solução de substrato (2 mM AAPF-pNA em água com 0,01% Triton-X100) e a atividade foi medida através da

monitorização da cinética a 410 nm e 37°C como descrito no exemplo 1a). Cada experiência cinética foi feita em quadruplicata.

**[164]** (e) pH/Pepsina resistente

**[165]** Sobrenadante bacteriano não diluído contendo proteína enzimática foi titulado com HCl 1 M a pH 2.5. 90 µl foram então transferidos para uma placa de microtitulação de fundo plano transparente de 96 poços da Nunc. 10 µl de uma solução-mãe de 250 µg/mL de pepsina em tampão de pH 2,5 (concentração final no ensaio 25 µg/mL) ou tampão de pH 2,5 foram adicionados a cada poço e depois incubados a 37°C durante 30 min. Finalmente, 5 µl de uma solução de 100 µM Pepstatina A (concentração final 5 µM) foi adicionado a cada poço para parar a reação de pepsina. 25 µl da amostra foram transferidos em 175 µl de glicina/HCl tampão pH 3,0 em uma nova placa de microtitulação de fundo plano Nunc de 96 poços claros. 20 µl foram então transferidos para uma microplaca de fundo plano PS de 384 poços Greiner mais 20 µl de solução de substrato (2 mM AAPF-pNA em água com 0,01% Triton-X100) e a atividade foi medida através da monitorização da cinética a 410 nm e 37°C como descrito no exemplo 1 a). Cada experiência cinética foi feita em quadruplicata.

**[166]** (f) Dependência de condutividade

**[167]** 20 µl de sobrenadante bacteriano não diluído foi diluído em 180 µL de glicina/HCl tampão pH 3,0 ajustado com NaCl para condutividade de 2, 4, 6, 10, 20, 30, 40, 50 mS/cm em uma placa de microtitulação de fundo plano Nunc 96 bem limpa. As amostras

foram incubadas a 37°C durante 20 minutos e, em seguida, 20 µL de amostra foram transferidos para uma microplaca de fundo plano PS de 384 poços Greiner mais 20 µl de solução de substrato (2 mM AAPF-pNA em água com 0,01% de Triton-X100) e a atividade foi medida através da monitorização da cinética a 410 nm e 37°C, conforme descrito no exemplo 1 a). Cada experiência cinética foi feita em quadruplicata.

**[168]** (g) BBI/KTI Hidrólise - Ensaio Funcional de Tripsina

**[169]** Os inibidores do tipo Bowman-Birk e Kunitz (BBI/KTI) são fortes inibidores das proteases serinas que são amplamente disseminadas nas sementes de leguminosas e grãos de cereais. O princípio do ensaio é que a degradação proteolítica do BBI/KTI pela atividade da protease recupera a atividade natural da tripsina no substrato de Benzil-Arginina-pNA (Bz-R-PNA) sem inibidores. 90 µL de sobrenadante bacteriano contendo proteína enzimática foi diluído em tampão de glicina/HCl até pH 3,0 e depois incubado a 37°C durante 30 min. 20 µl da amostra foi então misturado com 20 µl de solução inibidora (KTI: 8 µg/mL; BBI: 16 µg/mL; KTI/BBI: 4/8 µg/mL diluído em tampão de glicina pH 3.0) e depois incubados a 37°C durante 60 min. 15 µl da amostra foram transferidos para uma microplaca de fundo plano PS de 384 poços Greiner e depois 15 µl de solução de tripsina em pH 8,0 (concentração final de tripsina 1 µg/mL; pH final 7,0 ou pH 7,5) foi adicionado a cada poço e a placa foi incubada a 37°C durante 10 min. Finalmente, uma solução de substrato de 30 µL (2 mM Bz-R-PNA em água com 0,01% Triton-X100) foi adicionada a cada

poço e a atividade foi medida através da monitorização da cinética a 410 nm e 37°C como descrito no exemplo 1 a). Cada experiência cinética foi feita em quadruplicata.

**[170]** Exemplo 2: Geração de diversidade genética

**[171]** A diversidade genética inicial foi introduzida através da randomização de cada posição da sequência de núcleo da enzima ativa da SEQ ID NO 1. Bibliotecas de saturação de enzimas mutantes em um único local foram introduzidas no gene carregado em um vetor de expressão *E.coli* / *Bacillus subtilis* usando métodos de mutagênese como descrito em Green & Sambrook (eds), Molecular Cloning, 4<sup>th</sup> edition, CSHL e métodos adequados de PCR mutagênicos como divulgados em Cadwell e Joyce (PCR Methods Appl. 3 [194], 136-140).

**[172]** As variantes enzimáticas protease foram caracterizadas após expressão heteróloga em *Bacillus subtilis* e variantes fenotípicas otimizadas selecionadas pelo procedimento de triagem descrito no Exemplo 3.

**[173]** Em geral, métodos para mutagenizar uma proteína, como uma enzima, para obter uma biblioteca de proteínas mutantes cujos membros podem ter características alteradas, estão bem estabelecidos. Os métodos para mutagenizar uma proteína englobam a mutagênese local direcionada e outros, conforme descrito, por exemplo, em Hsieh & Vaisvila (2013), cujo conteúdo aqui incorporado por referência para fins de habilitação.

**[174]** Tais métodos são às vezes chamados de "evolução direcionada", ou seja, quando a biblioteca estabelecida é então

rastreada em busca de características particulares. Packer & Liu (2015) fornecem uma visão geral da respectiva metodologia, cujo conteúdo aqui incorporado por referência para fins de capacitação.

**[175]** Exemplo 3: Rastreio fenotípico de variantes enzimáticas com estabilidade térmica aumentada

**[176]** A diversidade genética gerada no estágio inicial na forma de bibliotecas de saturação de um único site ou no estágio subsequente na forma de bibliotecas de recombinação ou clones distintos foi selecionada para variantes com um fenótipo otimizado, ou seja, maior estabilidade térmica usando o método como descrito no exemplo 1b) com adaptações necessárias para executá-las em uma estação de trabalho robótica totalmente automatizada com alto rendimento. Estes foram principalmente adaptação em tempos de incubação, volumes, substrato e a principal adaptação foi selecionar variantes otimizadas não pelo perfil de inativação térmica em um gradiente de temperatura, mas pela atividade residual após a incubação em uma única temperatura, a temperatura que foi definida para discriminar variantes otimizadas da média da diversidade genética. Foram derivadas variantes de protease que diferiram em uma ou mais posições de aminoácidos da SEQ ID NO 2, incluindo duas posições, três posições, n posições. Rodadas iterativas adequadas dos procedimentos aqui descritos foram realizadas para satisfazer as exigências da aplicação.

**[177]** Exemplo 4:

**[178]** Foram identificadas as seguintes mutações individuais que aumentam o IT50 em comparação com a cadeia principal utilizada. O IT50 foi analisado conforme descrito acima e comparado ao IT50 da cadeia principal utilizada (do tipo selvagem com ausência de metionina N-terminal) caracterizando a variante por o correspondente  $\Delta IT50$ . A cadeia principal tem um IT50 de 79,6 °C +/- 0,4 °C (n = 46) como Zimógeno e um IT50 de 59°C +/- 1°C (n = 10) como enzima ativada.

**[179]** Tabela 1: Substituições de aminoácidos simples de Kumamolisinase AS em relação a SEQ ID N.º 1, e seus  $\Delta IT50$  comparados à cadeia principal para o Zimógeno e a enzima ativada.

<b>Posição</b>	<b>Mutação</b>	<b>Zimógeno <math>\Delta IT50</math></b>	<b>Enzima ativada <math>\Delta IT50</math></b>
A190	D	1,5	0,8
T196	S	0,7	0,3
D199	E	0,5	1
Q202	D	0,4	-0,3
I219	L	1,1	0,8
E228	Q	0,7	0,1
A229	W	0,2	n.d.
S230	D	2,8	-0,8
A242	S	0,3	-0,4
Q244	C	0,5	-3,6
Q244	G	0,7	1,5
D251	S	0,8	-0,3
S262	C	0,9	-0,3
G266	A	1,7	0
E269	M	2,4	-0,1
E269	T	2,6	-0,1

continua...



...continuação

E269	C	2,1	-1,1
E269	H	4	-0,5
E269	Q	2	-1,4
V274	I	1,8	1,3
G281	R	2	5,4
K283	L	0,6	-0,2
Y287	K	0,2	5,2
N291	T	0,7	0,5
N291	S	0	2 1,0
D293	Y	0,8	1
D293	F	1,1	1,3
L297	T	1,2	0,2
T301	S	0,6	7,6
T301	C	0,8	1
T301	M	0,7	0,5
H305	F	0,4	-0,4
H305	W	0,1	-2,7
D306	S	0,3	-0,5
T308	C	0,5	-0,8
V314	M	0,6	0,3
V314	L	2,5	0,7
S315	P	P 0,	8 3,0
G320	A	3	-0,2
G320	Q	3,6	1,5
G320	S	1	0,6
S324	L	0,1	1,3
S324	R	0,7	2
W325	K	0	3 2,7
T326	R	1,7	1,2
T326	W	0,9	0,2
T326	L	1,7	1,6
T326	K	1,9	1,2
S327	F	1,2	0,6

continua...

...continuação

S327	L	1,5	1,1
S327	W	2	1
A328	W	0,6	0,5
A328	D	1,3	1,1
A328	R	1,1	0,1
A328	Y	1,5	0,8
A329	Q	2,8	0,2
A329	H	2,1	0,3
A329	T	1	0,9
I330	L	1,1	0,8
A331	F	2	0,6
A331	Y	1,3	0,6
M333	I	2,5	-0,7
M333	Y	0,3	1
M333	L	2,4	-1
L338	R	0	5 1,5
A342	R	0	6 3,9
A351	S	1,3	-0,9
S354	E	1,6	3,3
S354	Q	2	0,3
D358	G	-2	0 0,7
E360	L	1,4	3,1
E360	V	2,4	2,9
E360	C	2,3	2,3
Q361	C	0,9	1,5
Q361	L	0,2	0,1
A372	S	2,4	-0,7
A378	G	1,5	1,5
A386	I	3,6	0,5
A386	L	2,7	1,3
A386	V	2,1	1,2
A386	M	1,7	0
G388	C	0,6	-3,5

continua...

...continuação

I391	W	1,7	0,6
A392	V	2,8	0,7
A392	L	3	0,9
A392	I	3,7	2,4
A392	M	2,3	2
Q393	S	0,9	0,2
D399	S	2,3	2,1
D402	E	0,6	1,7
R412	Q	0,5	2,4
R412	M	1,5	2,9
R412	E	1,8	4,4
R412	D	0,4	3,5
A418	W	2,8	0,2
E421	R	1	0,5
A423	V	1,1	0,8
A433	G	1,4	1,9
S434	G	1,9	0,7
S435	I	1,7	1,6
S435	R	1,8	0,5
S435	T	2,5	4,7
S435	V	1,6	2,1
L442	W	1,4	0,3
L442	W	0	7 2,4
D447	S	4	3,2
D447	C	3	1,4
D447	A	1,6	1,3
A449	Y	1,7	0,7
A449	L	0,8	0,3
A449	M	1,9	-0,9
A449	E	1,6	0,4
A449	N	1,6	3,3
E453	W	2,4	0
E453	Y	2,6	0,7

continua...

...continuação

E453	F	1,1	-0,5
V455	I	1,2	0,3
V455	L	1,8	0,7
E459	W	0,9	-0,3
A460	W	2,6	0,5
A460	R	2	-0,6
T461	V	1,2	0
T461	C	1,2	0,6
A470	V	0,6	2,3
A475	V	0	3 3,7
A478	L	1,2	0,2
K483	A	1,5	0,7
A487	Q	0	1,6
Y490	W	1,5	0,3
Q497	Y	1,8	1,2
Q497	M	0,8	0,8
Q497	D	0,3	1
Q497	R	0,6	0,2
V502	C	2,3	1,9
V502	T	1,5	1,6
T507	L	0,2	1
N510	H	2,4	7,9
A514	T	2,2	1,3
A514	Y	1,3	-1,2
A514	D	1,5	1,2
A514	S	2,4	0,5
N515	G	2	-0,2
R516	L	0,5	1,2
R516	E	1,1	3,5
R516	I	1,2	4,3
A517	T	1,3	3,9
A517	S	0,3	7,7
Q518	G	1,6	4,1

continua...

...continuação

L540	V	0,7	0,5
Q542	H	0,9	-0,2
Q542	D	1,1	0,4
Q542	S	0,4	0,5
A548	S	0,2	n.d.
P551	N	0,9	-0,4
P551	R	0,6	0,3
P553	K	0,5	0,3
P553	L	0,8	0,2
R166	I	1	0,7
D265	T	1,7	n.d.

**[180]** Vários clones distintos e clones combinatórios, como mostrado na Tabela 3, têm substituições nestas posições, levando a efeitos sinérgicos na estabilização térmica, quando dois ou mais resíduos dos mesmos são mutados simultaneamente.

**[181]** Exemplo 5

**[182]** Variantes distintas foram geradas pela introdução de mutações distintas selecionadas na sequência do tipo selvagem de Kumamolisinase AS via mutagenese direcionada ao local. Foram utilizados métodos PCR mutagênicos adequados conhecidos na arte e técnicas de clonagem padrão, conforme descrito em Green & Sambrook (eds), Molecular Cloning, 4<sup>th</sup> edition, CSHL. As variantes da enzima protease foram caracterizadas após expressão heteróloga em *Bacillus subtilis* e análise fenotípica pelos métodos descritos acima.

**[183]** Bibliotecas combinatórias, combinando mutações identificadas nos exemplos fornecidos acima e descritas na Tabela 1 foram geradas por métodos PCR bem conhecidos, como

descrito em YOLOV e SHABAROVA (1990) e técnicas de clonagem padrão, como descrito em GREEN & SAMBROOK (eds), *Molecular Cloning*, 4th edition, CSHL foram utilizados. As bibliotecas combinatórias foram selecionadas para variantes otimizadas, conforme descrito no exemplo 3.

**[184]** Exemplo 6

**[185]** Clones distintos e clones combinatórios compreendendo duas ou mais mutações da Tabela 1 foram identificados, o IT50 analisado como descrito acima e comparado ao IT50 da cadeia principal utilizada (do tipo selvagem com ausência de metionina N-terminal) caracterizando a variante pelo  $\Delta$ IT50 correspondente. Como o IT50 da cadeia principal foi determinado no mesmo experimento que a variante, o IT50 medido da cadeia principal pode ser ligeiramente diferente do valor médio. Os resultados são mostrados na seguinte Tabela 2a (Fig. 3 mostra os resultados em forma gráfica):

**[186]** Quadro 2a: Clones distintos compreendendo combinações selecionadas de mutações da tabela 1, e seus  $\Delta$ IT50 comparados ao do tipo selvagem (Primeiro bloco).

#	Mutações em clones distintos e clones combinatórios selecionados							
1						E360L		A392V
2				T301S		E360V	A386I	
3						E360L	A386I	A392V
4						E360L		A392I
5						E360V	A386I	A392I
6				T301S	G320A	E360L		
7				T301S		E360L	A386I	A392I
8				T301S		E360V		A392I
9						E360V		A392V
10						E360L	A386I	

continua...

...continuação

11				T301S		E360L		A392I
12				T301S		E360L	A386I	
13						E360L	A386I	A392I
14						E360V		A392V
15						E360L	A386I	
16				T301S		E360L		
17				T301S		E360L		A392V
18				T301S		E360V	A386I	
19						E360V	A386I	
20				T301S		E360V		A392I
21	D199E					E360V		
22						E360L	A386I	
23						E360L	A386I	A392I
24						E360V		A392V
25			E269T			E360V	A386I	
26				T301S		E360L		A392V
27						E360L		A392V
28						E360V		A392I
29				T301S		E360L		
30						E360L	A386I	A392I
31				T301S		E360L	A386I	A392V
32						E360V		A392I
33				T301S		E360L		A392I
34						E360V		
35						E360L	A386I	A392V
36				T301S		E360V	A386I	
37						E360L	A386I	
38				T301S		E360L	A386I	A392V
39				T301S		E360V		A392V
40				T301S		E360L	A386I	A392V

**[187]** Quadro 2a: Clones distintos compreendendo combinações selecionadas de mutações da tabela 1, e seus  $\Delta IT50$  comparados ao do tipo selvagem (Segundo bloco).

#	Mutações em clones distintos e clones combinatórios selecionados						
1		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
2		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
3		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
4		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
5		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
6		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
7		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H

continua...

...continuação

8		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
9		D447S	A449Y	E453W	A460W		N510H
10		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
11		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
12		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
13		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
14		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
15		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
16		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
17		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
18		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
19		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
20		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
21		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
22		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
23		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
24		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
25		D447S	A449Y			V502C	N510H
26		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
27		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
28		D447S	A449Y	A460W		V502C	N510H
29		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
30		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
31		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
32		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
33		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
34		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
35		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
36		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
37		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
38		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
39		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
40		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H

**[188]** Quadro 2a: Clones distintos compreendendo combinações selecionadas de mutações da tabela 1, e seus  $\Delta IT50$  comparados ao do tipo selvagem (Terceiro bloco).

#	Mutações em clones distintos e clones combinatórios selecionados				Zimógeno $\Delta IT50$	Zimógeno $\Delta IT50$	Enzima ativada $\Delta IT50$	Enzima ativada $\Delta IT50$
1		A517T			95,5	17	90,1	30,6

continua...



...continuação

2		A517T			>95	>17	90,1	30,6
3		A517T			99,5	21	89,2	29,7
4		A517T			97,3	18,8	89,1	29,6
5		A517T			99,4	20,9	88,8	29,3
6		A517T			96,4	17,9	88,6	29,1
7		A517T			96,4	17,9	88,5	29
8		A517T			99,1	20,6	88,5	29
9		A517T	Q518G		97,8	19,3	88,5	29
10		A517T			98,4	19,9	88,4	28,9
11		A517T			97,7	19,2	88,4	28,9
12		A517T			98,6	20,1	88,3	28,8
13		A517T			99,5	21	88,2	28,7
14		A517T			>95	>17	88,2	28,7
15		A517T			98,3	19,8	88,1	28,6
16		A517T			95,8	17,3	88	28,5
17		A517T			97,2	18,7	88	28,5
18		A517T			97,6	19,1	87,8	28,3
19		A517T			98,5	20	87,8	28,3
20		A517T	Q518G		97	18,5	87,8	28,3
21		A517T			>95	>17	87,8	28,3
22		A517T			>95	>17	87,8	28,3
23		A517T			97,1	18,6	87,8	28,3
24		A517T			99	20,5	87,8	28,3
25		A517T			94	16	87,7	27
26		A517T			97,4	18,9	87,7	28,2
27		A517T	Q518G		98	19,5	87,7	28,2
28		A517T			>95	>17	87,6	28,1
29		A517T			96,5	18	87,6	28,1
30		A517T			99	20,2	87,5	28
31		A517T			98,1	19,6	87,5	28
32		A517T	Q518G		97,9	19,4	87,4	27,9
33		A517T	Q518G		97,1	18,6	87,4	27,9
34		A517T			95,6	17,1	87,4	27,9
35		A517T			98,2	19,7	87,4	27,9
36		A517T			98,5	20	87,4	27,9
37		A517T	Q518G		97,9	19,4	87,4	27,9
38		A517T			>95	>17	87,3	27,8
39		A517T			96,2	17,7	87,2	27,7
40		A517T	Q518G		>95	>17	87,1	27,6

**[189]** Quadro 2a ctd": Clones distintos compreendendo combinações selecionadas de mutações da tabela 1, e seus  $\Delta$ IT50 comparados ao do tipo selvagem (Primeiro bloco).

#	Mutation in distinct clones and selected combinatorial clones							
41				T301S		E360L	A386I	
42						E360V		A392I
43						E360V	A386I	A392I
44						E360L		A392V
45	D199E					E360V		
46				T301S		E360L	A386I	A392I
47	D199E	G266A				E360V		A392V
48		G266A				E360V		A392V
49						E360L		A392I
50				T301S		E360V	A386I	
51						E360L	A386I	
52						E360L	A386I	
53	D199E	G266A				E360V		A392V
54						E360V	A386I	A392I
55	D199E	G266A	E269H			E360V		A392L
56						E360V	A386I	
57						E360V		A392V
58				T301S		E360L	A386I	A392I
59	D199E					E360V	A386I	
60						E360V	A386I	A392I
61	D199E					E360V	A386I	
62						E360V	A386I	
63	D199E	G266A		T301S		E360L		
64	D199E	G266A	E269T		G320A	E360V		A392L
65						E360L	A386I	
66		G266A				E360V		A392V
67						E360L	A386I	
68	D199E					E360V		
69	D199E					E360V	A386I	
70	D199E					E360L		
71	D199E	G266A	E269H	T301S		E360L		
72	D199E					E360L		
73	D199E	G266A				E360V		
74	D199E	G266A	E269H			E360V		A392L
75	D199E					E360V		
76				T301S		E360L		A392I
77	D199E					E360V		
78	D199E					E360L		
79						E360V	A386I	

**[190]** Quadro 2a ctd": Clones distintos compreendendo combinações selecionadas de mutações da tabela 1, e seus  $\Delta$ IT50 comparados ao do tipo selvagem (Segundo bloco).

#	Mutation in distinct clones and selected combinatorial clones						
41		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
42		D447S	A449Y		A460W		N510H
43		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
44		D447S	A449Y	E453W	A460W		N510H
45		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
46		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
47		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
48	R412E	D447S	A449Y	E453W	A460W		
49		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
50		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
51		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
52		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
53		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
54		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
55		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
56		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
57		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
58		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
59		D447S	A449Y			V502C	N510H
60		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
61		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
62		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
63		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
64		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
65		D447S	A449Y			V502C	N510H
66		D447S	A449Y	E453W	A460W		
67		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
68		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
69		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
70		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
71		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
72		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
73		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
74		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
75		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
76		D447S	A449Y	E453W	A460W		N510H
77		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
78		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
79		D447S	A449Y			V502C	N510H

**[191]** Quadro 2a ctd": Clones distintos compreendendo combinações selecionadas de mutações da tabela 1, e seus  $\Delta IT50$

comparados ao do tipo selvagem (Terceiro bloco).

#	Mutation in distinct clones and selected combinatorial clones				IT50 Zimógeno	IT50 Zimógeno	IT50 Active enzyme	IT50 Active enzyme
41		A517T	Q518G		98,4	19,9	87	27,5
42		A517T			92,7	14,2	86,9	27,4
43		A517T			>95	>17	86,9	27,4
44		A517T			96,9	18,4	86,8	27,3
45		A517T			93,5	15,1	86,7	26
46		A517T	Q518G		97,4	18,9	86,7	27,2
47		A517T	Q518G		101,5	23	86,6	27,1
48		A517T	Q518G		100,3	21,8	86,6	27,1
49		A517T	Q518G		>95	>17	86,6	27,1
50		A517T	Q518G		94,7	16,2	86,5	27
51		A517T			>95	>17	86,5	27
52		A517T			>95	>17	86,4	26,9
53		A517T	Q518G	P553K	102,2	23,7	86,4	26,9
54		A517T	Q518G		>95	>17	86,4	26,9
55		A517T	Q518G	P553K	101,7	23,2	86,3	26,8
56		A517T			93,1	14,6	86,2	27
57		A517T	Q518G		>95	>17	86,2	26,7
58		A517T	Q518G		>95	>17	86,2	26,7
59		A517T			92,2	14,1	86,1	25,4
60		A517T	Q518G		97,2	18,7	86	26,5
61		A517T			93,2	14,9	85,9	26,2
62		A517T			92,4	13,9	85,9	26,6
63		A517T			95,7	17,2	85,8	26,3
64		A517T	Q518G	P553K	100,1	21,6	85,8	26,8
65		A517T			94	15,9	85,8	25,1
66	R516I	A517T	Q518G		100,1	21,6	85,7	26,2
67		A517T			>95	>17	85,7	26,2
68		A517T	Q518G		>95	>17	85,7	26,2
69		A517T			94,9	16,6	85,4	25,7
70		A517T			-10	-10	85,4	25,9
71		A517T			95,8	17,3	85,4	25,9
72		A517T	Q518G		>95	>17	85,4	25,9
73		A517T	Q518G		>95	>17	85,4	25,9
74		A517T	Q518G		100,4	21,9	85,3	25,8
75		A517T			>95	>17	85,3	25,8
76		A517T	Q518G		95,1	16,6	85,2	25,7
77		A517T			94,9	16,4	85,1	25,5
78		A517T			>95	>17	85,1	25,6
79		A517T			93	15	85	25,7

**[192]** É importante entender que o resultado  $\Delta IT50$  dos clones distintos das Tabelas 2a, 2b e 4 não representa necessariamente a soma aritmética do  $\Delta IT50$  das mutações individuais compreendidas nos clones distintos, como, por exemplo, mostrado na Tabela 6.

**[193]** É também importante compreender que algumas mutações têm efeitos diferentes no zimógeno em comparação com a enzima ativada, como pode ser visto nos clones combinatórios que têm o maior efeito estabilizador para o zimógeno, como mostrado nas Tabelas 2a e 2b.

**[194]** A Tabela 2b mostra clones e mutações baseadas no IT50 do zimógeno que não são mostrados na Tabela 2a. (A Fig. 4 mostra os resultados em forma gráfica):

**[195]** Tabela 2b: Clones distintos compreendendo combinações selecionadas de mutações da Tabela 1, classificados pelo IT50 do zimógeno e seu IT50 em comparação com o do tipo selvagem (Primeiro Bloco).

#	Mutações em clones distintos e clones combinatórios selecionados							
1	D199E						E360V	
2	D199E						E360L	
3		T301S					E360L	A386I
4	D199E		G266A					
5			G266A	E269T				
6			G266A		G320A		E360L	
7			G266A	E269T				A386I
8			G266A	E269T	G320A			
9				E269H				A386I
10				E269H	G320A			
11			G266A	E269Q	G320A			
12				E269H	G320A			

Continua....

Continuação...

13				E269T	G320A			
14				E269H	G320A			
15				E269H	G320A			A386I
16			G266A	E269Q	G320A			
17				E269H	G320A			
18				E269H	G320A			
19			G266A	E269T	G320A			
20				E269H	G320A			
21			G266A	E269H	G320A	A329Q		A386I

**[196]** Tabela 2b: Clones distintos compreendendo combinações selecionadas de mutações da Tabela 1, classificados pelo IT50 do zimógeno e seu IT50 em comparação com o do tipo selvagem (Segundo Bloco).

#	Mutações em clones distintos e clones combinatórios selecionados						
1	A392V	D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
2	A392V	D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
3		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
4	A392V	D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
5	A392L	D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
6	A392V	D447S	A449Y	E453W	A460W		
7	A392L	D447S	A449Y		A460W		
8	A392L	D447S	A449Y	E453W	A460W		
9	A392V	D447S	A449Y		A460W		
10	A392L	D447C	A449Y	E453W	A460W		
11	A392L	D447S	A449M		A460W		
12	A392L	D447S	A449M	E453W	A460W		
13	A392V	D447S	A449Y	E453W	A460W		
14	A392V	D447S	A449Y		A460W		
15	A392L	D447S	A449M		A460W		
16	A392L	D447S	A449M	E453W	A460W		
17		D447S	A449Y	E453W	A460W		
18	A392V	D447S	A449Y		A460W		
19	A392L	D447S	A449Y	E453W	A460W		
20	A392L	D447S	A449Y	E453W	A460W		
21	A392V	D447C	A449M	E453W	A460W		

**[197]** Tabela 2b: Clones distintos compreendendo combinações selecionadas de mutações da Tabela 1, classificados pelo IT50 do

zimógeno e seu IT50 em comparação com o do tipo selvagem (Terceiro Bloco).

#	Mutações em clones distintos e clones combinatórios selecionados				Total de substituição	[°C] IT50 Zimógeno	[°C] IT50 Enzima ativada
1	A514Y	A517T	Q518G	P553K	12	100,3	84,42
2	A514Y	A517T	Q518G	P553K	12	96,36	84,31
3	A514T	A517T			11	96,61	83,73
4	A514Y	A517T	Q518G		12	97,99	82,38
5	A514Y	A517T	Q518G		12	97,41	81,03
6	A514Y	A517T	Q518G		11	96,27	80,3
7	A514Y	A517T	Q518G		10	95,99	74,55
8	A514Y	A517T	Q518G		11	99,78	74,16
9	A514Y	A517T	Q518G		9	95,86	73,37
10	A514Y	A517T	Q518G		10	96,55	72,94
11	A514Y	A517T	Q518G		10	96,01	72,85
12	A514Y	A517T	Q518G		10	98,41	72,8
13	A514Y	A517T			9	96,45	72,74
14	A514Y	A517T	Q518G		10	97,95	72,32
15	A514Y	A517T	Q518G		10	98,3	72,22
16	A514Y	A517T	Q518G		10	96,1	72,2
17	A514Y	A517T	Q518G		9	96,57	71,84
18	A514Y	A517T	Q518G		9	96,01	71,51
19	A514Y	A517T			10	96,02	71,22
20	A514Y	A517T			9	95,88	69,68
21	A514Y		Q518G		12	96	69,08

**[198]** A constatação de que, em algumas mutações, o efeito estabilizador é reduzido na enzima ativada em comparação com o zimógeno, pode ser explicada, sem ligação à teoria, pela proximidade ao propeptídeo e interações potencialmente otimizadas entre propeptídeo e núcleo da enzima.

**[199]** Portanto, depende da aplicação ou das condições de armazenamento decidir se as mutações combinadas têm o maior efeito na estabilização do Zimógeno ou da enzima ativa.

**[200]** Aplicações com pH mais baixo antes dos tratamentos térmicos, ou seja, pré-misturas com pH extremamente baixo, podem ditar o uso de uma enzima variante com uma combinação de mutações únicas estabilizando mais a enzima ativada, enquanto condições com pH mais alto antes do tratamento térmico permitem combinar mutações estabilizando mais o Zimógeno do que a enzima ativada e, portanto, também fazendo uso do efeito estabilizador térmico do propeptídeo que, neste caso, é aditivo para o efeito das mutações.

**[201]** Além disso, pode fazer sentido combinar mutações que estabilizam ambas as formas enzimáticas igualmente bem, ou seja, o zimógeno e a enzima ativada, embora não tenham o maior efeito estabilizador absoluto.

**[202]** Na seguinte Tabela 3 e Fig. 1, algumas substituições preferidas são mostradas. Uma variante de protease preferida tem pelo menos uma dessas substituições de aminoácidos comparada com a Kumamolisinase AS, conforme estabelecido na SEQ ID NO 1 ou 4. A razão para que estas substituições sejam preferidas é que a) como substituições solitárias, eles conferem um particular  $\Delta IT50$  (Zimógeno ou enzima ativada), ou b) eles ocorrem frequentemente em combinações preferidas e variantes distintas.

**[203]** Tabela 3: Algumas substituições preferenciais e suas principais características.



Posição	Mutação	Zimógeno $\Delta IT50$	Enzima ativada $\Delta IT50$	Frequência de ocorrência em variantes combinatórias e distintas superiores	
				Enzima ativada ( $IT50 > 80^{\circ}C$ ) (variantes totais medidas: 146)	Zimógeno ( $IT50 > 85^{\circ}C$ ) (variantes totais medidas: 554)
D447	S	4	3,2	138	331
	C	3	1,4		33
	A	1,6	1,3		
A449	Y	1,7	0,7	138	303
	N	1,6	3,3		
	E	1,6	0,4		7
	L	0,8	0,3		
A449	M	1,9	-0,9		42
A517	T	1,3	3,9	138	176
	S	0,3	7,7		79
N510	H	2,4	7,9	125	175
V502	C	2,3	1,9	118	164
E453	W	2,4	0	106	295
	Y	2,6	0,7		33
	F	1,1	-0,5		
E360	L	1,4	3,1	62	118
	V	2,4	2,9	74	93
	C	2,3	2,3	49	
A514	T	2,2	1,3	11	52
	Y	1,3	-1,2	87	217
	D	1,5	1,2		
	S	2,4	0,5		
A460	W	2,6	0,5	85	300
	R	2	-0,6		15
A392	V	2,8	0,7	38	133
	L	3	0,9	4	75
	I	3,7	2,4	22	18
	M	2,3	2		
A386	I	3,6	0,5	55	164
	L	2,7	1,3		1
	V	2,1	1,2		4
	M	1,7	0		

Continua....

Continuação...

T301	S	0,6	7,6	43	70
	C	0,8	1	1	5
	M	0,7	0,5		
D199	E	0,5	1	43	30
Q518	G	1,6	4,1	36	250
G266	A	1,7	0	33	152
P553	K	0,5	0,3	20	6
E269	M	2,4	-0,1		
	T	2,6	-0,1	5	84
	C	2,1	-1,2		2
	H	4	-0,5	6	180
	Q	2	-1,4		10
R412	Q	0,5	2,4	1	75
	M	1,5	2,9	1	1
	E	1,8	4,4	1	1
	D	0,4	3,5	1	1
S435	I	1,7	1,6	1	3
	R	1,8	0,5		9
	T	2,5	4,7	1	1
	V	1,6	2,1	1	1
G320	A	3	-0,2	2	186
	Q	3,6	1,5		46
	S	1	0,6		35
T326	R	1,7	1,2		11
	W	0,9	0,2		
T326	L	1,7	1,6	1	6
	K	1,9	1,2	1	1
T461	V	1,2	0	1	26
	C	1,2	0,6		48
Q244	C	0,5	-3,6		46
	G	0,7	1,5	1	1
D293	Y	0,8	1	1	24
	F	1,1	1,3		
A487	Q	0	1,6	1	24
V274	I	1,8	1,3		104
A372	S	2,4	-0,7		82
K283	L	0,6	-0,2		68
T308	C	0,5	-0,8		30
A418	W	2,8	0,2		12
	H	1,1	1,3		16
I391	W	1,7	0,6		21
A423	V	1,1	0,8		18
A331	F	2	0,6		7

continua...

...continuação

	Y	1, 3	0, 6		9
S327	F	1, 2	0, 6		
	L	1, 5	1, 1		16
	W	2	1		
I219	L	1, 1	0, 8		16
M333	I	2, 5	-0, 7		16
A329	Q	2, 8	0, 2		5
	H	2, 1	0, 3		3
	T	1	0, 9		7
N515	G	2	-0, 2		13
A378	G	1, 5	1, 5		12
S434	G	1, 9	0, 7		12
E421	R	1	0, 5	1	11
A433	G	1, 4	1, 9		11
S230	D	2, 8	-0, 8		9
Q393	S	0, 9	0, 2		3
D399	S	2, 3	2, 1		4
Y490	W	1, 5	0, 3		2
G281	R	2	5, 4		
Y287	K	0, 2	5, 2		
R516	I	1, 2	4, 3		
	E	1, 1	3, 5		
	L	0, 5	1, 2		
A475	V	-0, 3	3, 7		
S354	E	1, 6	3, 3		
S315P	P	0, 8	3		
W325	K	-0, 3	2, 7		
L442	W	-0, 7	2, 4		
	W	1, 4	0, 3		
A470	V	0, 6	2, 3		
S324	R	0, 7	2		
S324	L	0, 1	1, 3		
Q361	C	0, 9	1, 5		
Q361	L	0, 2	0, 1		
A190	D	1, 5	0, 8		
T196	S	0, 7	0, 3		
Q202	D	0, 4	-0, 3		
E228	Q	0, 7	0, 1		
A229	W	0, 2	n.d.		
A242	S	0, 3	-0, 4		
D251	S	0, 8	-0, 4		
S262	C	0, 9	-0, 3		
N291	T	0, 7	0, 5		

Continua...

Continuação...

N291	S	-0,2	1		
L297	T	1,2	0,2		
H305	F	0,4	-0,4		
H305	W	0,1	-2,7		
D306	S	0,3	-0,5		
V314	M	0,6	0,3		
V314	L	2,5	0,7		
A328	W	0,6	0,5		
A328	D	1,3	1,1		
A328	R	1,1	0,1		
A328	Y	1,5	0,8		
I330	L	1,1	0,8		
M333	Y	0,3	1,0		
M333	L	2,4	-1,0		
L338	R	-0,5	1,5		
A342	R	-0,6	3,9		
A351	S	1,3	-0,9		
S354	Q	2	0,3		
D358	G	-2	0,7		
G388	C	0,6	-3,5		
D402	E	0,6	1,7		
V455	I	1,2	0,3		
V455	L	1,8	0,7		
E459	W	0,9	-0,3		
A478	L	1,2	0,2		
K483	A	1,5	0,7		
Q497	Y	1,8	1,2		
Q497	M	0,8	0,8		
Q497	D	0,3	1		
Q497	R	0,6	0,2		
V502	T	1,5	1,6		
T507	L	0,2	1		
L540	V	0,7	0,5		
Q542	H	0,9	-0,2		
Q542	D	1,1	0,4		
Q542	S	0,4	0,5		
A548	S	0,2	n.d.		
P551	N	0,9	-0,4		
P551	R	0,6	0,3		
P553	L	0,8	0,2		
R166	I	1	0,7		
D265	T	1,7	n.d.		

**[204]** Além disso, deve entender-se que as mutações podem ter

efeitos positivos ou negativos noutros parâmetros enzimáticos, como a produtibilidade em sistemas de produção microbiana fermentativa ou a estabilidade contra condições de pH ou proteases endógenas do animal, como a pepsina. Testar a estabilidade das enzimas alimentares a pH baixo e na presença de pepsina é um padrão para enzimas alimentares e foi realizado neste estudo como descrito no exemplo 1e. A estabilidade contra uma maior resistência iônica não é um teste padrão para as enzimas alimentares, embora concentrações elevadas de íons possam interferir com a estabilidade da enzima e com o desempenho da enzima em tais condições e possam ser encontradas, por exemplo, no intestino. A secreção de ácido no intestino e os ingredientes da ração traduzem-se numa maior força iônica.

**[205]** A Fig. 2 mostra que o do tipo selvagem sofre efeitos combinados de estabilidade e redução do desempenho na presença de maior força iônica. A Fig. 2 também mostra o efeito da força iônica nas variantes superiores também mostradas na tabela 4, variantes #1 a #7.

**[206]** O desempenho e a estabilidade em alta resistência iônica foram testados conforme descrito no exemplo 1d. O perfil de pH foi um parâmetro de controlo e testado conforme descrito no exemplo 1f. A digestão de fatores anti-nutricionais proteicos como os inibidores da tripsina/quimotripsina BBI e KTI (inibidores de Bowman-Birk e inibidores do tipo Kunitz) é uma característica de desempenho potencialmente benéfico de uma protease que foi testada como descrito no exemplo 1g.

**[207]** Das 651 variantes combinatórias individuais e distintas testadas em detalhe, a Tabela 4 descreve as variantes que consolidam uma infinidade de parâmetros de desempenho e estabilidade (Fig. 5 mostra os resultados em forma gráfica).

**[208]** Todas as variantes indicadas no quadro 4 são melhores ou igualmente bem produzidas num sistema de produção microbiana do que o do tipo selvagem e não apresentam alterações relevantes no seu perfil de atividade de pH testado, tal como descrito no exemplo 1d. A Tabela 4 classifica essas variantes com base na estabilidade térmica da enzima ativada, na estabilidade do pH/pepsina e na estabilidade e desempenho sob maior força iônica.

**[209]** Verificou-se ainda que as melhores variantes podem hidrolisar BBI e KTI (inibidores de Bowman-Birk e inibidores do tipo Kunitz) conforme testado em um ensaio funcional de inibição da tripsina, que diferencia essas variantes da enzima mãe, além da alta estabilidade térmica projetada para essas variantes.

**[210]** Tabela 4: Alguns clones distintos e combinatórios particularmente com desempenho bom (Primeiro bloco).

#	Mutante código	Mutações em clones distintos e clones combinatórios selecionados						
1	GIN 3B2 08.42a				T301S		E360V	
2	Gin 48a 5xa	D199E	G266A				E360V	
3	Gin 85b 5xa	D199E	G266A	E269H			E360V	
4	Gin 24b 5xa	D199E	G266A	E269T		G320A	E360V	
5	GIN 3B2 08.34a						E360V	A38

continua...

...continuação

6	GIN 3B2 08.58a						E360L	
7	Gin 48a4xa	0199E	G266A				E360V	
8	GIN 48a 1xbxe		G266A				E360V	
9	GIN 3B2 08.8Sc						E360V	
10	GIN 3B2 08.47a						E360L	A3861
11	GIN 3B3 05.84c				T3015		E360L	
12	GIN 3B2 10.87a				T3015		E360V	
13	GIN 3B3 03.04c						E360L	A3861
14	GIN 3B3 01.11a						E360V	
15	GIN 3B3 02.55a						E360V	
16	GIN 3B2 09.09c						E360L	A3861
17	GIN 3B3 05.09c						E360L	A3861
18	GIN 3B2 09.31a				T3015		E360L	A3861
19	GIN 3B3 01.52a						E360L	
20	GIN 48a 1xbxd		G266A				E360V	
21	GIN 3B3 01.21b				T3015		E360L	A3861
22	Gin 28a 5x2xf	0199E	G266A		T3015		E360L	
23	Gin 28a 5x3xa	0199E	G266A	E269H	T3015		E360L	
24	Gin 85b 4xa	0199E	G266A	E269H			E360V	
25	Gin 28a 5x1xf	0199E			T3015		E360L	
26	Gin 28a 4xa5x	0199E					E360V	
27	GIN 48a 1xbx2		G266A				E360V	

continua...

...continuação

28	Gin 28a 4xa6x	0199E					E360L	
29	Gin 28 a5x1x2	0199E			T3015		E360L	
30	GIN 3B3 05.20b						E360L	
31	GIN 3B2 08.81c				T3015		E360L	A3861
32	Gin 28a 5x2xd	0199E	G266A	E269T	T3015		E360L	
33	Gin 48a 3xa	0199E	G266A					

**[211]** Tabela 4: Alguns clones distintos e combinatórios particularmente com desempenho bom (Segundo bloco).

#	Mutações em clones distintos e clones combinatórios selecionados							
1	A3921		04475	A449Y	E453W	A460W	V502C	NS10H
2	A392V		04475	A449Y	E453W	A460W	V502C	NS10H
3	A392L		04475	A449Y	E453W	A4fiJW	V502C	NS10H
4	A392L		04475	A449Y	E453W	A460W	V502C	NS10H
5			04475	A449Y	E453W	A460W	V502C	NS10H
6	A392V		04475	A449Y	E453W	A460W	V502C	NS10H
7	A392V		04475	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
8	A392V		04475	A449Y	E453W	A460W		
9	A392V		04475	A449Y	E453W	A460W		N510H
10			04475	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
11	A392V		04475	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
12	A3921		04475	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
13	A3921		04475	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
14	A392V		04475	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
15	A3921		04475	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
16	A392V		04475	A449Y	E453W		V502C	N510H
17			04475	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
18			04475	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
19	A392V		04475	A449Y	E453W	A460W		N510H
20	A392V	R412E	04475	A449Y	E453W	A460W		
21	A3921		04475	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
22			04475	A449Y	E453W		V502C	N510H
23			04475	A449Y	E453W		V502C	N510H
24	A392L		04475	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H

continua...



...continuação

25			04475	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
26	A392V		04475	A449Y	E453W		V502C	N510H
27	A392V	R4120	04475	A449Y	E453W	A460W		
28	A392V		04475	A449Y	E453W		V502C	N510H
29			04475	A449Y	E453W		V502C	N510H
30	A392V		04475	A449Y	E453W	A460W		N510H
31			04475	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
32			04475	A449Y	E453W		V502C	N510H
33	A392V		04475	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H

**[212]** Tabela 4: Alguns clones distintos e combinatórios particularmente com desempenho bom (Terceiro bloco).

#	Mutações em clones distintos e clones combinatórios selecionados				
1	A514Y		A517T		
2	A514Y		A517T	QS18G	PSS3K
3	A514Y		A517T	QS18G	PSS3K
4	A514Y		A517T	QS18G	PSS3K
5	A514Y		A517T		
6	A514Y		A517T	QS18G	
7	A514Y		A517T	Q518G	
8	A514Y	R5161	A517T	Q518G	
9	A514T		A517T	Q518G	
10	A514Y		A517T		
11	A514T		A517T		
12	A514Y		A517T		
13	A514Y		A517T		
14	A514Y		A517T		
15	A514Y		A517T	Q518G	
16	A514Y		A517T		
17	A514Y		A517T	Q518G	
18	A514Y		A517T	Q518G	
19	A514Y		A517T		
20	A514Y		A517T	Q518G	
21	A514Y		A517T	Q518G	
22	A514Y		A517T		
23	A514Y		A517T		
24	A514Y		A517T	Q518G	
25			A517T		
26	A514Y		A517T	Q518G	P553K
27	A514Y		A517T	Q518G	

continua...

...continuação

28	A514Y		A517T	Q518G	P553K
29	A514Y		A517T		
30	A514Y		A517T		
31	A514T		A517T		
32			A517T		
33	A514Y		A517T	Q518G	

**[213]** Tabela 4: Alguns clones distintos e combinatórios particularmente com desempenho bom (Quarto bloco).

#	ITSO [°C] Zimógeno	IT50 [°C] ativada	pH/% atividade residual de estabilidade da pepsina	Estabilidade a 25mS.cm <sup>-1</sup>	Inibidor de hidrólise	
1	0,10	88,48	93	62	48%	41%
2	102,15	86,37	96	87	58%	46%
3	101,73	86,34	92	62	60%	47%
4	100,13	85,82	95	77	68%	65%
5	98,48	87,82	99	68	50%	48%
6	98,00	87,65	91	48	45%	40%
7	101,45	86,59	92	81	58%	52%
8	100,10	85,73	88	98	75%	56%
9	97,78	88,46	93	33	41%	40%
10	98,33	88,10	92	38	pos.	pos.
11	97,18	87,96	90	32	pos.	pos.
12	96,99	87,81	81	29	pos.	pos.
13	97,06	87,79	68	24	pos.	pos.
14	99,01	87,75	102	49	pos.	40%
15	97,88	87,42	92	32	pos.	pos.
16	98,23	87,38	80	18	pos.	pos.
17	97,85	87,35	68	32	pos.	pos.
18	0,41	86,97	79	29	pos.	pos.
19	9),85	86,75	61	39	pos.	pos.
20	100,30	86,59	90	89	58%	41%
21	98,50	86,59	94	34	pos.	pos.
22	95,73	85,83	74	51	pos.	pos.
23	95,81	85,38	75	34	pos.	pos.
24	100,40	85,34	89	57	pos.	pos.
25	94,77	84,81	95	35	55%	40%
26	98,90	84,73	95	52	55%	pos.
27	9),46	84,30	94	70	50%	pos.

continua...

...continuação

28	0,08	84,08	112	33	43%	pos.
29	>97	83,84	n.d.	32	pos.	pos.
30	>97	83,75	80	30	54%	48%
31	9),61	83,73	73	28	46%	46%
32	94,68	83,66	81	44	pos.	pos.
33	97,99	82,38	101	42	50%	pos.

**[214]** A Tabela 5, a seguir, mostra a frequência de ocorrência de determinadas mutações preferidas variantes combinatórias e distintas. A frequência de ocorrência é uma medida para o papel e importância de uma dada mutação.

**[215]** Tabela 5: Frequência de ocorrência de determinadas mutações em variantes combinatórias e distintas preferidas. Frequência de ocorrência é uma medida para o papel e importância de uma dada mutação.

Mutação	Frequência de ocorrência em variantes combinatórias e distintas preferidas (enzima ativada IT50>80°C)	Mutação	Frequência de ocorrência em variantes combinatórias e distintas preferidas (Zimógeno IT50>85°C)	Mutação	Frequência de ocorrência em variantes combinatórias e distintas preferidas (Zimógeno (IT50>85°C))
D447S	127	D447S	365	A331F	7
A449Y	127	A449Y	353	A331Y	9
A517T	127	A517T	256	A329Q/H/T	15
N510H	125	N510H	175	S435R/I	11

continua...

...continuação

E360L/V	125	E360V/L	262	V274I	
V502C	120	V502C	185	A372S	82
E453W	92	E453W	320	K283L	66
A514Y/T	84	A514Y/T	265	Q244C	46
A460W	72	A460W	308	T380C	30
A386I	56	A386I	178	A418W	28
A392V/I	50	A392V/I	392	I391W	
T301S	44	T301S	79	A423V	18
D199E	43	D199E	30	T326L	16
Q518G	36	Q518G	250	I219L	16
P553K	20	P553K	6	S327L	16
E269T/H		E269T/H	133	M333I	16
G266A	19	G266A	133	N515G	13
D293Y		D293Y	24	A378G	
G320A		G320A	265	S434G	
R412Q		R412Q	74	A433G	10
E421R		E421R		S230D	9
A487Q		A487Q	24	Q393S	3
T461V		T461V	26	D399S	3
		T461C	48	Y490W	3

**[216]** A Tabela 6, a seguir, mostra o impacto de mutações únicas em  $\Delta IT50$  do Zimógeno ou formulário ativado. Mais uma vez, a quantidade de impacto de uma única mutação no  $\Delta IT50$  é uma medida para o papel e importância de uma tal mutação.

**[217]** Tabela 6: Impacto das mutações simples em  $\Delta IT50$  do Zimógeno (esquerda) ou da forma ativada (direita). A quantidade de impacto de uma única mutação em  $\Delta IT50$  é uma medida do papel e da importância de uma tal mutação.

Mutação	Zimógeno $\Delta IT50$	Mutação	Zimógeno $\Delta IT50$		Mutação	Enzima ativada $\Delta IT50$	Mutação	Enzima ativada $\Delta IT50$
D447S	4, 8	L297T	1, 2		A517S	7, 7	D358G	0, 7
E269H	4	S327F	1, 2		N510H	7, 6	A331Y	0, 6
A392I	3, 7	V455I	1, 2		T301S	7, 6	S327F	0, 6
G320Q	3, 6	T461V	1, 2		G281R	5, 4	T461C	0, 6
A386I	3, 6	T461C	1, 2		Y287K	5, 2	G320S	0, 6

continua...

...continuação

G320A	3	A478L	1,2		S435T	4,7	A386I	0,5
A392L	3	R516I	1,2		R412E	4,4	A460W	0,5
D447C	3	I219L	1,1		R516I	4,3	A514S	0,5
S230D	2,8	D293F	1,1		Q518G	4,1	S435R	0,5
A329Q	2,8	A328R	1,1		A517T	3,9	A190D	0,5
A392V	2,8	I330L	1,1		A475V	3,7	E421R	0,5
A418W	2,8	A423V	1,1		R516E	3,5	N291T	0,5
A386L	2,7	E453F	1,1		R412D	3,5	T301M	0,5
E269T		R516E	1,1		A342R	3,4	L540V	0,5
E453Y		Q542D	1,1		D447S	3,3	A328W	0,5
A460W		G320S	1		S354E	3,3	Q542S	0,5
V314L	2,5	A329T	1		A449N	3,3	A449E	0,4
M333I	2,5	E421R	1		E360L	3,1	Q542D	0,4
S435T	2,5	R166I	1		S315PP	3	A329H	0,3
E269M	2,4	V410I	1		E360V	2,9	S354Q	0,3
M333L	2,4	S262C	0,9		R412M	2,9	Y490W	0,3
E360V	2,4	T326W	0,9		W325K	2,7	L442W	0,3
A372S	2,4	Q361C	0,9		A392I	2,4	V455I	0,3
E453W	2,4	Q393S	0,9		R412Q	2,4	A449L	0,3
N510H	2,4	E459W	0,9		L442W	2,4	T196S	0,3
A514S	2,4	Q542H	0,9		E360C	2,3	V314M	0,3
E360C	2,3	P551N	0,9		A470V	2,3	P551R	0,3
A392M	2,3	D251S	0,8		D399S	2,1	P553K	0,3
D399S	2,3	D293Y	0,8		S435V	2,1	A329Q	0,2

**[218]** Tabela 6 ctd': Impacto de mutações simples em  $\Delta IT50$  do Zimógeno (esquerda) ou da forma ativada (direita). A quantidade de impacto de uma única mutação em  $\Delta IT50$  é uma medida do papel e da importância de uma tal mutação.

Mutação	Zimógeno $\Delta IT50$	Mutação	Zimógeno $\Delta IT50$		Mutação	Enzima ativada $\Delta IT50$	Mutação	Enzima ativada $\Delta IT50$
A514T		S315P	0,8		V502C	1,9	L297T	0,2
E269C	2,1	A449L	0,8		A433G	1,9	A478L	0,2
A329H	2,1	Q497M	0,8		S324R	1,9	T326W	0,2
A331F	2,1	P553L	0,8		D402E	1,7	Q393S	0,2
A386V	2,1	T196S	0,7		T326L	1,6	P553L	0,2
E269Q	2	E228Q	0,7		S435I	1,6	Q497R	0,2

continua...

...continuação

G281R	2	Q244G	0,7		V502T	1,6	A331F	0,1
S327W	2	N291T	0,7		A487Q	1,6	A328R	0,1
S354Q	2	T301M	0,7		G320Q	1,5	E228Q	0,1
A460R	2	L540V	0,7		A378G	1,5	Q361L	0,1
N515G	2	K283L	0,6		Q361C	1,5	E453W	0
T326K	1,9	T301S	0,6		Q244G	1,5	G266A	0
S434G	1,9	V314M	0,6		L338R	1,5	A386M	0
A449M	1,9	S324R	0,6		D447C	1,4	I391W	0
V274I	1,8	A328W	0,6		A386L	1,3	T461V	0
R412E	1,8	G388C	0,6		A514T	1,3	E269T	-0,1
S435R	1,8	D402E	0,6		V274I	1,3	E269M	-0,1
V455L	1,8	A470V	0,6		D447A	1,3	Q542H	-0,1
Q497Y	1,8	Q497R	0,6		D293F	1,3	G320A	-0,2
G266A	1,7	P551R	0,6		S324L	1,3	N515G	-0,2
T326R	1,7	D199E	0,5		A386V	1,2	K283L	-0,2
T326L	1,7	Q244C	0,5		T326K	1,2	S262C	-0,3
A386M	1,7	T308C	0,5		Q497Y	1,2	E459W	-0,3
I391W	1,7	R412Q	0,5		T326R	1,2	D251S	-0,3
S435I	1,7	R516L	0,5		A514D	1,2	Q202D	-0,3
A449Y	1,7	P553K	0,5		R516L	1,2	P551N	-0,4
D265T	1,7	Q202D	0,4		S327L	1,1	H305F	-0,4
S354E	1,6	H305F	0,4		A328D	1,1	A242S	-0,4
S435V	1,6	R412D	0,4		S327W	1	E269H	-0,5
D447A	1,6	Q542S	0,4		D293Y	1	E453F	-0,5
A449E	1,6	A242S	0,3		T301C	1	D306S	-0,5
A449N	1,6	D306S	0,3		D199E	1	A460R	-0,6
Q518G	1,6	M333Y	0,3		M333Y	1	M333I	-0,7
A190D	1,5	Q497D	0,3		Q497D	1	A372S	-0,7
S327L	1,5	A517S	0,3		T507L	1	S230D	-0,8
A328Y	1,5	A229W	0,2		N291S	1	T308C	-0,8
A378G	1,5	Y287K	0,2		A392L	0,9	A449M	-0,9

**[219]** Tabela 6 ctd': Impacto de mutações simples em  $\Delta IT50$  do Zimógeno (esquerda) ou da forma ativada (direita). A quantidade de impacto de uma única mutação em  $\Delta IT50$  é uma medida do papel e da importância de uma tal mutação.

Mutação	$\Delta IT50$ Zimógeno	Mutação	$\Delta IT50$ Zimógeno		Mutação	$\Delta IT50$ Enzima Ativada	Mutação	$\Delta IT50$ Enzima Ativada
R412M	1,5	Q361L	0,2		A329T	0,9	A351S	-0,9
K483A	1,5	T507L	0,2		V455L	0,8	M333L	-1

continua...

...continuação

Y490W	1,5	A548S	0,2		A328Y	0,8	E269C	1,1
A514D	1,5	S324L	0,1		I330L	0,8	E269Q	-1,4
E360L	1,4	A487Q	0		A423V	0,8	H305W	-2,7
A433G	1,4	N291S	-0,2		Q497M	0,8	G388C	-3,5
L442W	1,4	W325K	-0,3		A392V	0,7	Q244C	-3,6
A328D	1,3	A475V	-0,3		E453Y	0,7	D265T	n.d.
A331Y	1,3	L338R	-0,5		V314L	0,7	R166I	n.d.
A351S	1,3	A342R	-0,6		S434G	0,7	V410I	n.d.
A514Y	1,3	L442W	-0,7		A449Y	0,7	A229W	n.d.
A517T	1,3	D358G			K483A	0,7	A548S	n.d.

**[220]** Além disso, deve-se entender que algumas mutações da Tabela 1 e da Tabela 6 podem ser usadas alternadamente para projetar a termoestabilidade em Kumamolisin As. A Tabela 7 mostra um conjunto de variantes baseadas na variante 1 da Tabela 7. No decurso da engenharia, as mutações na posição 502 e 510 pareceram alterar a atividade em pH ácido extremo, abaixo do pH 2.

**[221]** Excluindo as mutações a 502 e 510, reduziu-se significativamente a termoestabilidade abaixo da estabilidade da temperatura alvo para a enzima ativada, como por exemplo na Tabela 7, clone #2 que tem uma redução de 7,8°C na estabilidade térmica em comparação com o clone #1. Um conjunto de variantes distintas foi construído através de uma abordagem racional, aproveitando as mutações identificadas e apresentadas nas Tabelas 1 e 6 para compensar o efeito de 502 e 510. Com exceção do D399S, as substituições podem compensar gradualmente ou completamente o efeito das mutações em 502 e 510.

**[222]** Tabela 7: Um conjunto de variantes baseado na variante #1 (Primeiro bloco).

#	Mutações em clones distintos e clones combinatórios selecionados							
1	G266A				E360V	A392V		
2	G266A				E360V	A392V		
3	G266A				E360V	A392V		R412E
4	G266A				E360V	A392V		R412D
5	G266A				E360V	A392V		R412Q
6	G266A				E360V	A392V		
7	G266A				E360V	A392V		
8	G266A			T326L	E360V	A392V		
9	G266A				E360V	A392V		R412M
10	G266A				E360V	A392V		
11	G266A				E360V	A392V		
12	G266A			T326K	E360V	A392V		
13	G266A				E360V	A392V		
14	Q244G	G266A			E360V	A392V		
15	G266A				E360V	A392V		
16	G266A				E360V	A392V	D399S	

**[223]** Tabela 7: Um conjunto de variantes baseado na variante #1 (Segundo bloco).

#	Mutações em clones distintos e clones combinatórios selecionados							
1			D447S	A449Y	E453W	A460W		V502C
2			D447S	A449Y	E453W	A460W		
3			D447S,	A449Y	E453W,	A460W		
4			D447S	A449Y	E453W	A460W		
5			D447S	A449Y	E453W	A460W		
6		S435I	D447S	A449Y	E453W	A460W		
7	A433G		D447S	A449Y	E453W	A460W		
8			D447S	A449Y	E453W	A460W		
9			D447S	A449Y	E453W	A460W		
10		S435T	D447S	A449Y	E453W	A460W		
11			D447S	A449Y	E453W	A460W	A487Q	
12			D447S	A449Y	E453W	A460W		
13			D447S	A449Y	E453W	A460W		
14			D447S	A449Y	E453W	A460W		
15		S435V	D447S	A449Y	E453W	A460W		
16			D447S	A449Y	E453W	A460W		

**[224]** Tabela 7: Um conjunto de variantes baseado na variante #1 (Terceiro bloco).



#	Mutações em clones distintos e clones combinatórios selecionados				Zimógeno $\Delta$ IT50	Enzima ativada $\Delta$ IT50
1	N510H	A514Y	A517T	Q518G	101,5	86,6
2		A514Y	A517T	Q518G	>95	78,8
3		A514Y	A517T	Q518G	100,3	86,6
4		A514Y	A517T	Q518G	96,5	84,3
5		A514Y	A517T	Q518G	97,7	81,8
6		A514Y	A517T	Q518G	97,4	81,+
7		A514Y	A517T	Q518G	98,1	81,3
8		A514Y	A517T	Q518G	98,7	81,.
9		A514Y	A517T	Q518G	98,3	81,0
10		A514Y	A517T	Q518G	99,2	81,0
11		A514Y	A517T	Q518G	96,3	81,0
12		A514Y	A517T	Q518G	97,2	80,5
13		A514Y	A517T	Q518G	96,2	80,+
14		A514Y	A517T	Q518G	96,3	80,2
15		A514Y	A517T	Q518G	98,6	80,.
16		A514Y	A517T	Q518G	87,90	71,92

### **REFERÊNCIAS**

- [225] Wlodawer Al, Li M, Gustchina A, Oyama H, Dunn BM, Oda K., Acta Biochim Pol. 2003;50(1):81-102.
- [226] TerashitaJ., Oda,K., Kono,M. & Murao,S., Agric Biol Chem (1981) 45, 1937-1943.
- [227] Oda,K., Takahashi,S., Ito,M. & Dunn,B.M., Adv Exp Med Biol (1998) 436, 349-353 Packer & Liu, Methods for the directed evolution of proteins. Nature Reviews Genetics 16, 379-394 (2015).
- [228] Hsieh & Vaisvila, Protein engineering: single or multiple site-directed mutagenesis. Methods Mol Biol. 2013;978: 173-86.
- [229] Cadwell and Joyce, Mutagenic PCR. PCR Methods Appl. 3, 1994, 136-140.
- [230] Okubo et al, 2006 Jun;273(1 1):2563-76.

## REIVINDICAÇÕES

**[1]. "VARIANTES ESTÁVEIS DE PROTEASE",** caracterizado por ser pelo menos 90% idêntica à sequência de aminoácidos de comprimento total da cadeia principal de uma Kumamolisinina AS como estabelecido em qualquer uma das SEQ ID N.ºs 1 - 3, mantendo a atividade proteolítica, ou um fragmento, fração ou variante embaralhada dos mesmos mantendo a atividade proteolítica, cuja variante da protease demonstra estabilidade alterada ou melhorada em comparação com; (i) Kumamolisinina AS do tipo selvagem, tal como estabelecido na SEQ ID N.º 4, ou; (ii) a cadeia principal da Kumamolisinina AS, tal como estabelecido em qualquer uma das SEQ ID N.ºs 1 a 3.

**[2]. "VARIANTES ESTÁVEIS DE PROTEASE",** caracterizado por ser constituída de uma sequência de aminoácidos derivada de uma Kumamolisinina AS tal como estabelecido na SEQ ID N.º 1, ou um fragmento, fração ou variante embaralhada da mesma mantendo a atividade proteolítica, cuja variante da protease tem uma ou mais substituições de aminoácidos numa ou mais posições de resíduos na SEQ ID N.º 1 selecionado do grupo constituído por D447, A449, A517, N510, V502, E453, E360, A514, A460, A392, A386, T301, D199, Q518, G266, P553, E269, R412, S435, G320, T326, T461, Q244, D293, A487, V274, A372, K283, T308, A418, I391, A423, A331, S327, I219, M333, A329, N515, A378, S434, E421, A433, S230, Q393, D399, Y490, G281, Y287, R516, A475, S354, S315P, W325, L442, A470, S324, Q361, A190, T196, Q202, E228, A229, A242, D251, S262, N291, L297, H305, D306, V314, A328, I330, L338, A342, A351, D358, G388, D402, V455, E459, A478, K483, Q497, T507, L540, Q542, A548, P551, R166 e/ou D265.

[3]. **"VARIANTES ESTÁVEIS DE PROTEASE"**, de acordo com a reivindicação 2, cuja variante de protease é caracterizada por demonstrar pelo menos uma estabilidade alterada ou melhorada em relação à: (i) Kumamolisinase AS do tipo selvagem, tal como estabelecido na SEQ ID N.º 4, ou; (ii) a cadeia principal da Kumamolisinase AS, conforme estabelecido em qualquer uma das SEQ ID N.ºs 1 a 3.

[4]. **"VARIANTES ESTÁVEIS DE PROTEASE"**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 e 3, cuja variante de protease é caracterizada por ter pelo menos uma substituição de aminoácidos selecionada do grupo constituído por D447S, A449Y, A517T, N510H, E360L, E360V, E360C, V502C, E453W, A514T, A514Y, A514D, A514S, A460W, A386I, A392V, A392L, A392I, A392M, T301S, D199E, Q518G, P553K, E269M, E269T, E269C, E269H, E269Q, G266A, D293Y, G320A, R412Q, E421R, A487Q, T461V, T461C, A331F, A331Y, A329Q, A329H, A329T, S435I, S435R, S435T, S435V, V274I, A372S, K283L, Q244C, Q244G, T308C, A418W, I391W, A423V, T326R, T326W, T326L, T326K, I219L, S327F, S327L, S327W, M333I, N515G, A378G, S434G, A433G, S230D, Q393S, D399S, Y490W, A190D, T196S, Q202D, E228Q, A229W, A242S, D251S, S262C, G281R, Y287K, N291T, N291S, D293F, L297T, T301C, T301M, H305F, H305W, D306S, V314M, V314L, S315P, G320Q, G320S, S324L, S324R, W325K, A328W, A328D, A328R, A328Y, I330L, M333Y, M333L, L338R, A342R, A351S, S354E, S354Q, D358G, Q361C, Q361L, A386L, A386V, A386M, G388C, D402E, R412M, R412E, R412D, L442W, L442W, D447C, D447A, A449L, A449M, A449E, A449N, E453Y, E453F, V455I, V455L, E459W, A460R, A470V, A475V, A478L, K483A, Q497Y, Q497M, Q497D, Q497R, V502T, T507L, R516L, R516E, R516I,

A517S, L540V, Q542H, Q542D, Q542S, A548S, P551N, P551R, P553L, R166I, D265T comparado com a Kumamolisinase AS conforme estabelecido na SEQ ID N.º 1.

**[5]. "VARIANTES ESTÁVEIS DE PROTEASE"**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, cuja variante de protease é caracterizada por ter pelo menos 2 substituições de aminoácidos em comparação com a cadeia principal da Kumamolisinase AS, tal como estabelecido na norma SEQ ID N.ºs 1 ou 4.

**[6]. "VARIANTES ESTÁVEIS DE PROTEASE"**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, cuja variante de protease é caracterizada por ter pelo menos uma, de preferência duas, pelo menos duas, de preferência três, pelo menos três, de preferência quatro, pelo menos, mais preferencialmente, pelo menos cinco, mais preferencialmente, pelo menos seis substituições de aminoácidos selecionados do grupo constituído por D447S, A449Y, A517T, N510H, E360L, E360V, E360C, V502C, E453W, A514T, A514Y, A514D, A514S, A460W, A386I.

**[7]. "VARIANTES ESTÁVEIS DE PROTEASE"**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, cuja variante de protease é caracterizada por ser um conjunto de substituições em resíduos selecionados na cadeia principal da Kumamolisinase AS conforme estabelecido na SEQ ID N.º 1 ou 4, que é pelo menos uma das seguintes: a) 360, 447, 449 e 510; b) 447, 449 e 514, e/ou; c) 447, 449, 453 e 517.

**[8]. "VARIANTES ESTÁVEIS DE PROTEASE"**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que a estabilidade melhorada é caracterizada por ser melhorada pela termostabilidade (IT50) da

enzima ativada ou do zimógeno.

[9]. **"VARIANTES ESTÁVEIS DE PROTEASE"**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, cuja variante de protease é caracterizada por ter um IT50 entre  $\geq 75^{\circ}\text{C}$  e  $\leq 105^{\circ}\text{C}$ .

[10]. **"VARIANTES ESTÁVEIS DE PROTEASE"**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada por uma molécula de ácido nucleico codificar uma variante da protease.

[11]. **"VARIANTES ESTÁVEIS DE PROTEASE"**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada por plasmídeo ou sistema vectorial ser constituído pela molécula de ácido nucleico.

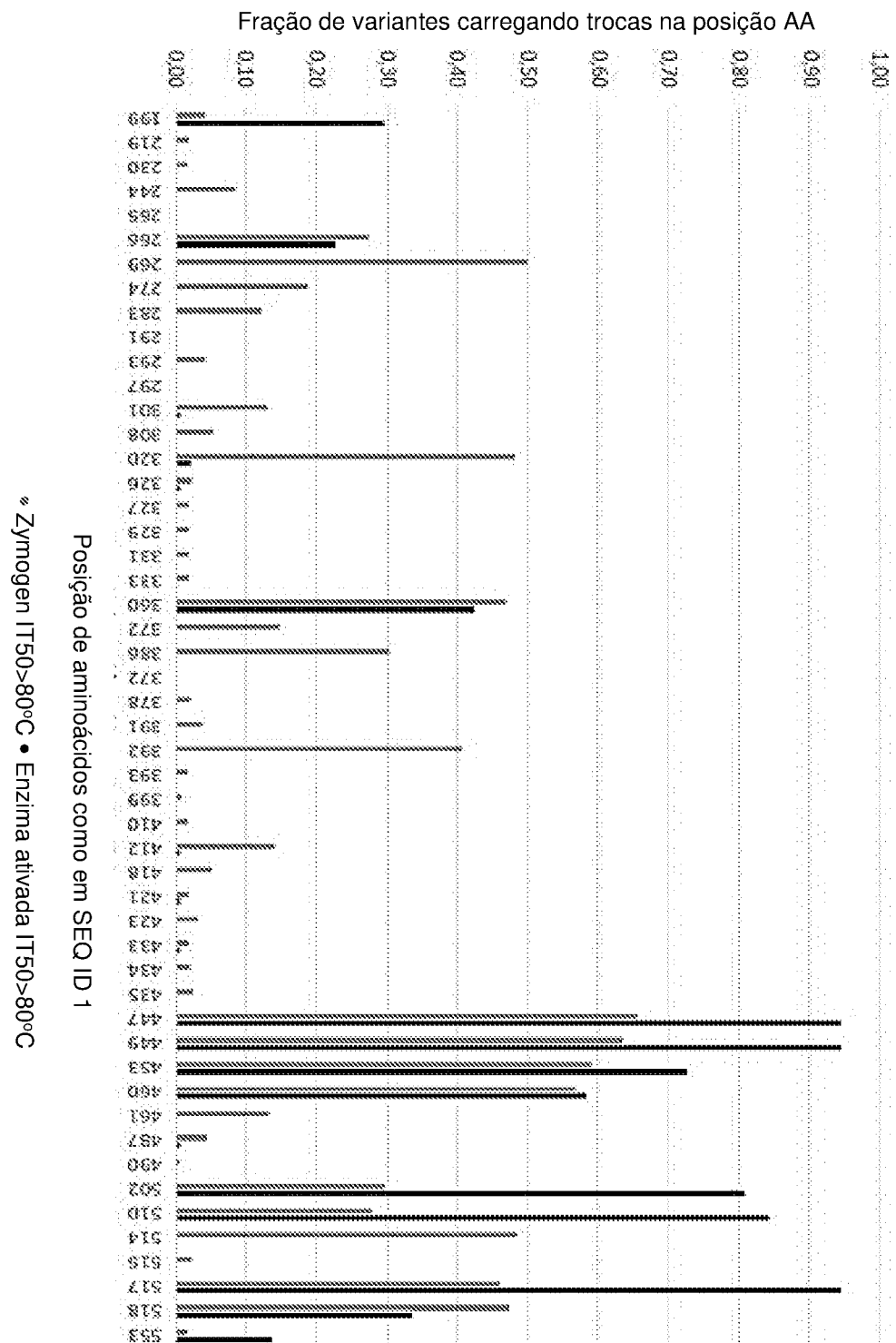
[12]. **"VARIANTES ESTÁVEIS DE PROTEASE"**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, onde a composição constituída por uma variante da protease ou protease é caracterizada por a composição ter um pH de  $\geq 5$ .

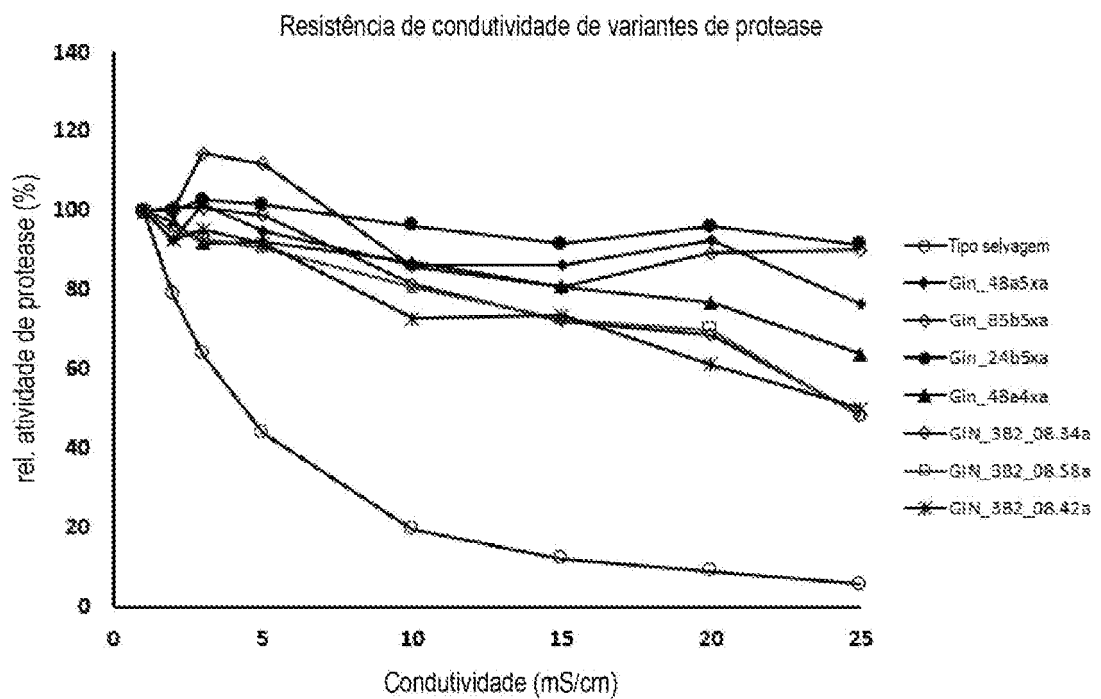
[13]. **"VARIANTES ESTÁVEIS DE PROTEASE"**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, onde aditivo, ingrediente, suplemento alimentar e/ou alimento para animais é caracterizado por incluir uma variante da protease ou protease ou uma composição.

[14]. **"VARIANTES ESTÁVEIS DE PROTEASE"**, onde uma variante de protease, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, ou de uma composição, de acordo com a reivindicação 12, é caracterizado por ser utilizado para o fabrico de um alimento para animais.

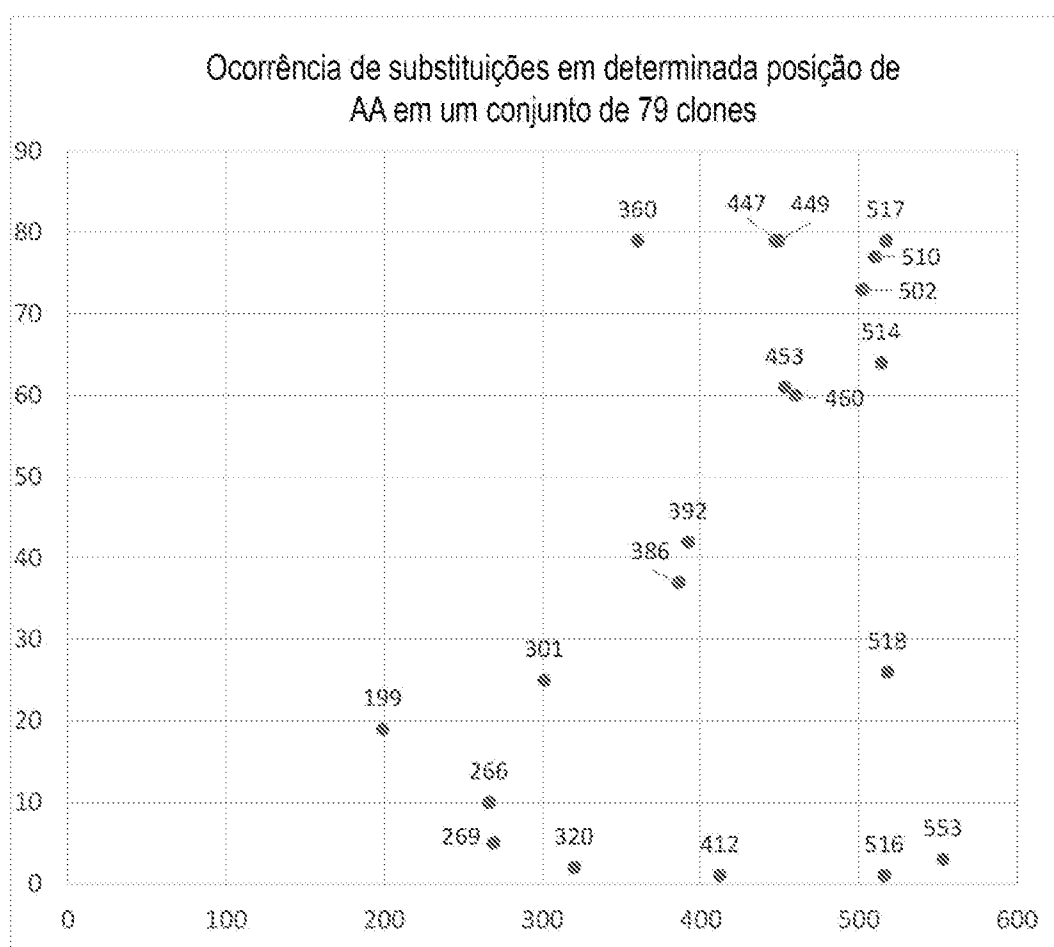
[15]. **"VARIANTES ESTÁVEIS DE PROTEASE"**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, onde o processo de fazer uma variante de protease é caracterizado por compreender o seguinte processo:  
(i) mutagénese de um ADN, cDNA ou mRNA que codifique uma sequência

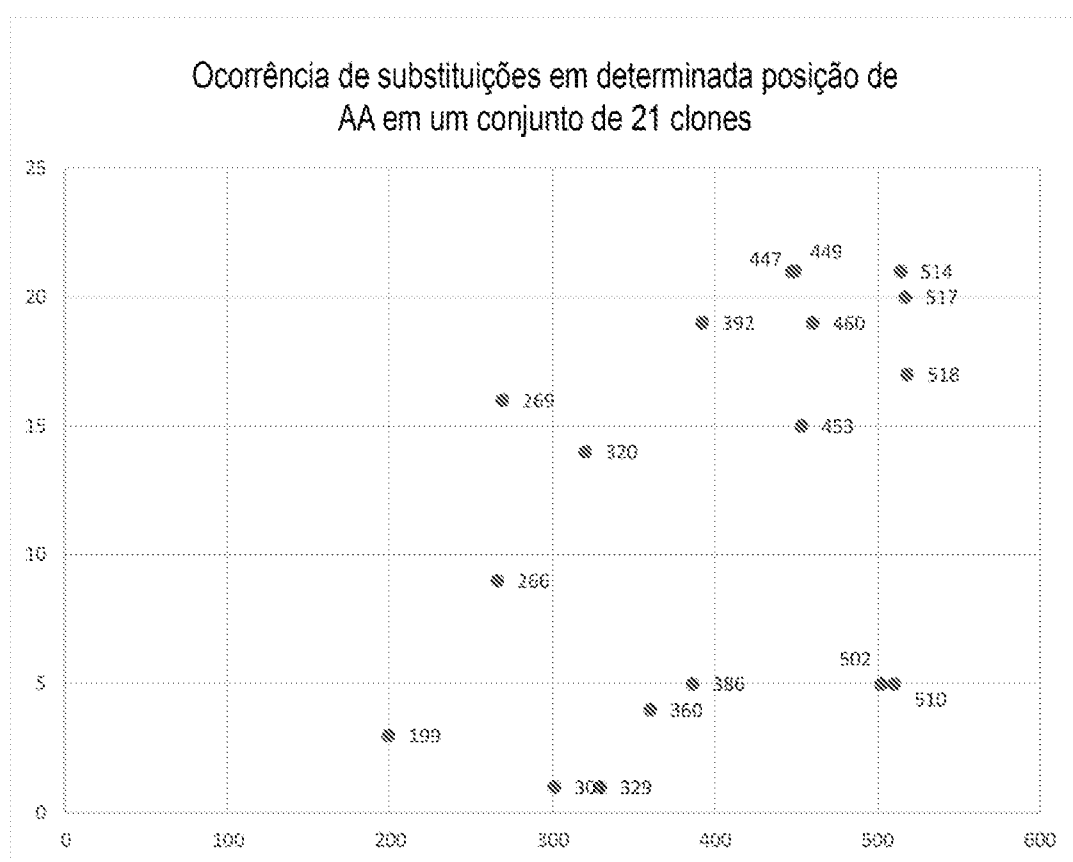
de aminoácidos da Kumamolisina AS, tal como estabelecido em qualquer das SEQ ID N.ºs 1 a 4; (ii) expressando um ou mais mutantes da Kumamolisina AS assim obtidos, e; (iii) testar a estabilidade, de preferência a termostabilidade, de um ou mais mutantes da Kumamolisina AS.

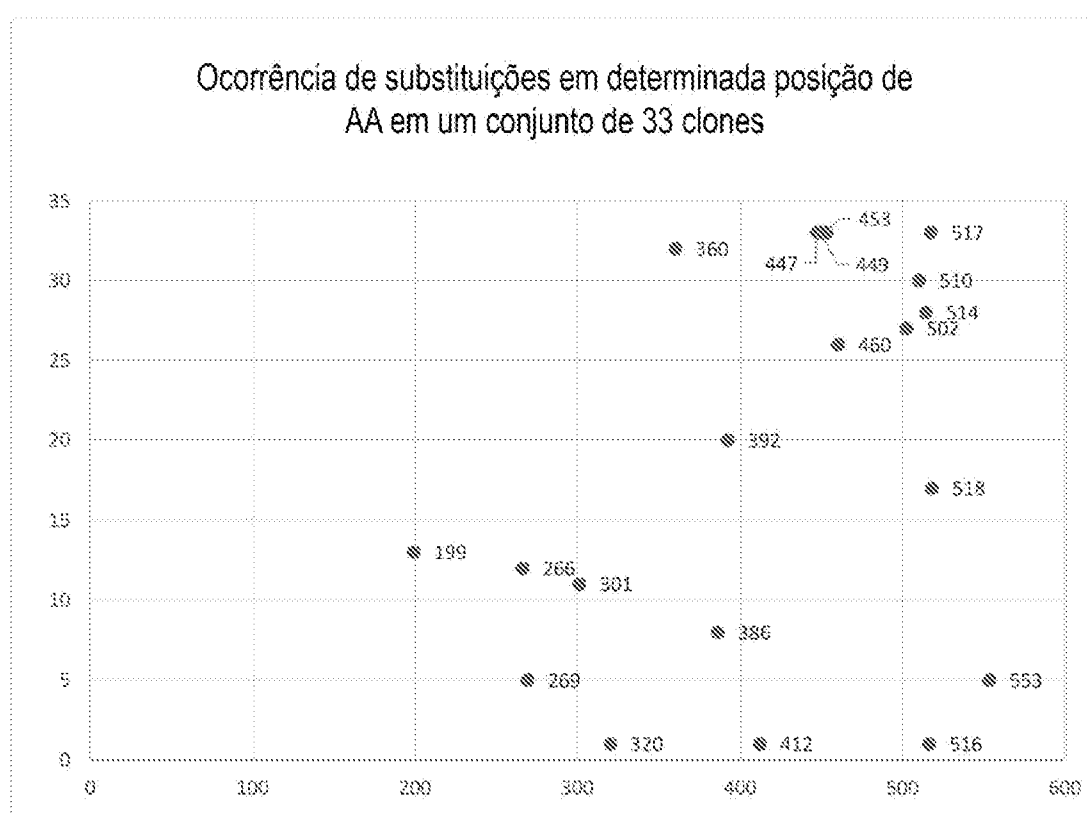
**FIG. 1**

**FIG. 2**



**FIG. 3**

**FIG. 4**

**FIG. 5**

**RESUMO****"VARIANTES ESTÁVEIS DE PROTEASE".**

A presente invenção diz respeito a uma variante da protease que seja pelo menos 90% idêntica à sequência de aminoácidos de comprimento total de uma estrutura de Kumamolisinina AS da SEQ ID N.ºs 1 a 3, mantendo a atividade proteolítica, ou um fragmento, fração ou variante embaralhada da mesma mantendo a atividade proteolítica, cuja variante da protease demonstre estabilidade alterada ou melhorada em comparação com o tipo selvagem de Kumamolisinina AS da SEQ ID N.º 4, ou a estrutura de Kumamolisinina AS conforme estabelecido em qualquer das colunas vertebrais de SEQ ID N.ºs 1 a 3.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

### Código de Controle

Campo 1



Campo 2



### Outras Informações:

- Nome do Arquivo: EW NUTRITION GMBH\_ Listagem de sequência\_ PI
- Data de Geração do Código: 04/05/2020
- Hora de Geração do Código: 14:39:33
- Código de Controle:
  - Campo 1: B4407394ABBA7010
  - Campo 2: 8A89BA73CE68DA6D