

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 1998.10.23	(73) Titular(es): DANISCO US INC.	
(30) Prioridade(s): 1997.10.23 US 956323	925 PAGE MILL ROAD PALO ALTO,	US
1997.10.23 US 956324	CALIFORNIA 94304	
1997.10.23 US 956564		
(43) Data de publicação do pedido: 2006.01.04	(72) Inventor(es):	
	KATHERINE D. COLLIER	US
	DONALD P. NAKI	US
(45) Data e BPI da concessão: 2011.06.01	ROBERT M. CALDWELL	US
167/2011	AYROOKARAN J. POULOSE	US
	VOLKER SCHELLENBERGER	US
	(74) Mandatário:	
	ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS	
	RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **VARIANTES DE PROTEASES MULTIPLAMENTE SUBSTITUÍDAS COM CARGA LÍQUIDA ALTERADA PARA UTILIZAÇÃO EM DETERGENTES**

(57) Resumo:

SÃO DIVULGADOS MÉTODOS PARA MELHORAR O DESEMPENHO DE PROTEASES EM VÁRIAS COMPOSIÇÕES DETERGENTE. AS PROTEASES SÃO MODIFICADAS POR SUBSTITUIÇÃO DE AMINOÁCIDOS PARA TORNAR A CARGA NESSAS POSIÇÕES MAIS NEGATIVA OU MENOS POSITIVA EM COMPARAÇÃO COM UMA PROTEASE PRECURSORA, OU MAIS POSITIVA OU MENOS NEGATIVA EM COMPARAÇÃO COM UMA PROTEASE PRECURSORA, O QUE RESULTA NA PROTEASE SER MAIS EFICAZ NUM SISTEMA DE MÉDIA CONCENTRAÇÃO DE DETERGENTE QUE A PROTEASE PRECURSORA. SÃO TAMBÉM PROPORCIONADOS MÉTODOS PARA MELHORAR O DESEMPENHO DE PROTEASES EM SISTEMAS DE BAIXA, MÉDIA E ALTA CONCENTRAÇÃO DE DETERGENTE POR SUBSTITUIÇÃO DE AMINOÁCIDOS PARA TORNAR A CARGA MAIS NEGATIVA OU MENOS POSITIVA EM COMPARAÇÃO COM UMA PROTEASE PRECURSORA, OU POR SUBSTITUIÇÃO DE AMINOÁCIDOS PARA TORNAR A CARGA MAIS POSITIVA OU MENOS NEGATIVA EM COMPARAÇÃO COM UMA PROTEASE PRECURSORA.

RESUMO**"VARIANTES DE PROTEASES MULTIPLAMENTE SUBSTITUÍDAS COM CARGA LÍQUIDA ALTERADA PARA UTILIZAÇÃO EM DETERGENTES"**

São divulgados métodos para melhorar o desempenho de proteases em várias composições detergente. As proteases são modificadas por substituição de aminoácidos para tornar a carga nessas posições mais negativa ou menos positiva em comparação com uma protease precursora, ou mais positiva ou menos negativa em comparação com uma protease precursora, o que resulta na protease ser mais eficaz num sistema de média concentração de detergente que a protease precursora. São também proporcionados métodos para melhorar o desempenho de proteases em sistemas de baixa, média e alta concentração de detergente por substituição de aminoácidos para tornar a carga mais negativa ou menos positiva em comparação com uma protease precursora, ou por substituição de aminoácidos para tornar a carga mais positiva ou menos negativa em comparação com uma protease precursora.

DESCRIÇÃO

"VARIANTES DE PROTEASES MULTIPLAMENTE SUBSTITUÍDAS COM CARGA LÍQUIDA ALTERADA PARA UTILIZAÇÃO EM DETERGENTES"

Antecedentes do Invento

As serina-proteases são um subgrupo das carbonil-hidrolases. Estas compreendem uma classe variada de enzimas possuindo uma ampla variedade de especificidades e funções biológicas. Stroud, R., *Sci. Amer.* 131: 74-88. Apesar da sua diversidade funcional, a maquinaria catalítica das serina-proteases foi abordada por pelo menos duas famílias geneticamente distintas de enzimas: 1) as subtilisinas e 2) as serina-proteases bacterianas e homólogas relacionadas com quimotripsina de mamífero (p. ex., tripsina e tripsina de *S. gresius*). Estas duas famílias de serina-proteases apresentam mecanismos de catálise notavelmente semelhantes, Kraut, J., *Ann. Rev. Biochem.* 46: 331-358, 1977. Para além disso, embora a estrutura primária não esteja relacionada, a estrutura terciária destas duas famílias de enzimas junta uma tríade catalítica conservada de aminoácidos consistindo em serina, histidina e aspartato.

As subtilisinas são serina-proteases (PM aprox. 27500) que são segregadas em grandes quantidades a partir de uma ampla variedade de espécies de *Bacillus* e outros microrganismos. A sequência proteica da subtilisina foi

determinada a partir de pelo menos nove espécies diferentes de *Bacillus*. Markland, F.S. et al., *Hope-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 364: 1537-1540, 1983. Foi relatada a estrutura cristalográfica tridimensional das subtilisinas de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* e de várias variantes naturais de *B. lentus*. Estes estudos indicam que embora a subtilisina não seja geneticamente relacionada com as serina-proteases de mamífero, possui uma estrutura semelhante do local activo. As estruturas cristalinas de raios X de subtilisina contendo inibidores peptídicos covalentemente ligados (Robertus, J.D. et al., *Biochemistry* 11: 2439-2449, 1972) ou complexos produtos (Robertus, J.D. et al., *J. Biol. Chem.* 251: 1097-1103, 1976) proporcionaram também informação em relação ao local activo e à putativa fenda de ligação ao substrato da subtilisina. Adicionalmente, foi relatado um grande número de estudos de modificação cinética e química para a subtilisina; Svendsen, B., *Carlsberg Res. Commun.* 41: 237-291, 1976; Markland, F.S. *Id.*) bem como pelo menos um relatório em que a cadeia lateral da metionina no resíduo 222 da subtilisina foi convertida através de peróxido de hidrogénio em sulfóxido de metionina (Stauffer, D.C. et al., *J. Biol. Chem.* 244: 5333-5338, 1965) e foi realizada extensa mutagénesse específica do local (Wells e Estell, *TIBS* 13: 291-297, 1988).

WO9100345 divulga um método de melhoramento do desempenho de subtilisinas em detergentes através da substituição de resíduos de aminoácidos com um resíduo mais

negativo ou mais positivo e da medição do desempenho da enzima em relação ao pH da solução de lavagem. WO9523221 divulga que a substituição de resíduos por uns mais negativos pode aumentar o desempenho na lavagem de uma subtilisina num sistema detergente europeu. Também a EP328229 divulga que a mudança da carga de um resíduo de aminoácido de subtilisina pode aumentar o desempenho na lavagem da enzima nalguns detergentes.

Um problema comum no desenvolvimento de uma variante de protease para utilização numa formulação de detergente é a variedade de condições de lavagem incluindo as variadas formulações de detergente em que uma variante de protease poderia ser utilizada. Por exemplo, formulações de detergente utilizadas em diferentes áreas têm concentrações diferentes dos seus componentes relevantes presentes na água de lavagem. Por exemplo, um sistema de detergente europeu tem tipicamente cerca de 4500-5000 ppm de componentes de detergente na água de lavagem enquanto que um sistema de detergente japonês tem tipicamente aproximadamente 667 ppm de componentes de detergente na água de lavagem. Na América do Norte, particularmente nos Estados Unidos, um sistema de detergente tem tipicamente cerca de 975 ppm de componentes de detergente presentes na água de lavagem. Surpreendentemente, foi desenvolvido um método para o desenho racional de uma variante de protease para utilização num sistema de baixa concentração de detergente, num sistema de alta concentração de detergente e/ou num sistema de concentração média de detergente bem

como para utilização em todos os três tipos de sistemas de concentração de detergente.

Sumário do Invento

O presente invento proporciona um método de melhoramento do desempenho de uma subtilisina num sistema de baixa, média e elevada concentração de detergente possuindo menos de cerca de 800 ppm, entre cerca de 800 ppm e cerca de 2000 ppm, e acima de 2000 ppm de componentes de detergente presentes na água de lavagem, respectivamente:

a) substituição de um aminoácido numa ou mais posições de resíduos numa subtilisina precursora para produzir uma variante de subtilisina em que a substituição altera a carga nessa posição para tornar a carga mais positiva ou menos negativa em comparação com a precursora;

b) substituição de um aminoácido numa ou mais posições de resíduos numa subtilisina precursora para produzir uma variante de subtilisina em que a substituição altera a carga nessa posição para tornar a carga mais negativa ou menos positiva em comparação com a precursora;

c) teste da variante para determinar a sua eficácia em comparação com a subtilisina precursora num sistema de baixa, média e elevada concentração de detergente possuindo menos de cerca de 800 ppm, entre cerca de 800 ppm e cerca de 2000 ppm, e acima de cerca de 2000

ppm de componentes de detergente presentes na água de lavagem, respectivamente; e

d) repetição dos passos a)-c) conforme necessário para produzir uma variante de subtilisina que seja mais eficaz num sistema de baixa, média e elevada concentração de detergente que uma protease precursora.

A precursora pode ser uma subtilisina de *Bacillus*, tal como subtilisina de *Bacillus lentus*.

É também proporcionado um método de produção de uma composição de detergente compreendendo o melhoramento do desempenho de uma subtilisina produzindo uma variante de subtilisina através de um método do invento, a formulação da variante de subtilisina numa composição de detergente em pó ou líquida possuindo um pH entre 6,5 e 12,0 a de cerca de 0,1 a cerca de 5% do peso.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

As Figs. 1 A-C representam a sequência de ADN e de aminoácidos para a subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* e um mapa de restrição parcial deste gene.

A Fig. 2 representa os resíduos de aminoácidos conservados entre as subtilisinas de *Bacillus amyloliquefaciens* (BPN') e *Bacillus lentus* (tipo selvagem).

As Figs. 3A e 3B representam a sequência de aminoácidos de quatro subtilisinas. A linha de cima representa a sequência de aminoácidos da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* (também por vezes referida como subtilisina BPN'). A segunda linha representa a sequência de aminoácidos da subtilisina de *Bacillus subtilis*. A terceira linha representa a sequência de aminoácidos da subtilisina de *B. licheniformis*. A quarta linha representa a sequência de aminoácidos da subtilisina de *Bacillus lentus* (também referida como subtilisina 309 em PCT WO89/06276). O símbolo * denota a ausência de resíduos de aminoácidos específicos em comparação com a subtilisina BPN'.

Descrição Detalhada do Invento

Tal como observado acima, certas regiões geográficas têm certas condições de lavagem e, como tal, utilizam diferentes tipos de detergentes. Por exemplo, o Japão utiliza um sistema de baixa concentração de detergente enquanto que a Europa utiliza um sistema de alta concentração de detergente. Tal como discutido anteriormente, os Estados Unidos utilizam um sistema de concentração média de detergente. Verificámos que diferentes variantes de proteases têm um desempenho óptimo nestas diferentes formulações de detergente. No entanto, em resultado destas observações, esperar-se-ia que fosse impossível encontrar uma protease que funcionasse bem em todos os três tipos de detergentes.

Surpreendentemente, não é este o caso. Foi desenvolvido um método de concepção racional de uma variante de protease que funciona em todos os três sistemas de concentração de detergente.

Verificámos que para produzir uma variante de protease que seja mais eficaz num sistema de baixa concentração de detergente, é necessário substituir um ou mais resíduos carregados positivamente por resíduos carregados negativamente ou resíduos neutros e/ou um ou mais resíduos neutros por resíduos carregados negativamente. Pelo contrário, observámos que para produzir uma variante de protease que seja mais eficaz num sistema de alta concentração de detergente, é necessário substituir um ou mais resíduos carregados negativamente por resíduos carregados positivamente ou resíduos neutros e/ou um ou mais resíduos neutros por resíduos carregados positivamente. Ainda, verificámos que muitas das variantes de proteases úteis no sistema de baixa concentração de detergente e/ou no sistema de elevada concentração de detergente são também eficazes num sistema de média concentração de detergente. Equilibrando estas alterações, é possível produzir uma variante de protease que funcione bem em todos os três sistemas de concentração de detergente.

A carga electrostática que qualquer cadeia lateral de aminoácido ionizável com uma função ácida ou básica assume em solução aquosa é uma função do pH. Os resíduos ácidos Glu e Asp, num processo de equilíbrio,

perdem um protão através de dissociação entre pH 3 e 6 adquirindo deste modo uma carga negativa. De um modo semelhante, His, Lys e Arg perdem gradualmente um protão entre pH 5 e 8, pH 8,5 e 11,5 e pH 11 e 14, respectivamente, perdendo deste modo uma carga positiva. O protão do OH de Tyr dissocia-se de forma crescente entre pH 8,5 e 11,5, pelo que Tyr adquire uma carga negativa. O intervalo de dissociação do terminal carboxilo é pH 1 a 4, produzindo uma carga negativa, e para o terminal amino é pH 8 a 11, acompanhado da perda de uma carga positiva. O intervalo de dissociação para as cadeias laterais dos aminoácidos dados aqui são valores médios para muitas proteínas mas sabe-se que são afectados por configurações estruturais invulgares nalgumas proteínas.

O efeito cumulativo de todas as cargas determina se uma proteína tem uma carga positiva líquida ou negativa líquida a um dado pH. O pH ao qual as cargas positivas e negativas são igualmente eficazes e conferem um estado electrostaticamente neutro a uma proteína é designado o ponto isoeléctrico (pI). Uma proteína perderá ou ganhará carga quando o pH for mudado ou quando for adicionado ou removido um aminoácido com um resíduo de cadeia lateral ionizável. Um aumento na carga positiva líquida pode ser alcançado através da substituição de um resíduo que a um dado pH seja carregado negativamente por um resíduo sem carga ou carregado positivamente, conduzindo a uma mudança de carga formal de +1 e +2, respectivamente. Através da substituição de um resíduo de cadeia lateral sem carga por

um que esteja protonado a um dado pH a mudança de carga formal seria de +1. Semelhantemente, a carga negativa líquida pode ser aumentada através da substituição de cadeias laterais carregadas positivamente ou não carregadas por cadeias laterais carregadas negativamente ao pH de observação e ganho um aumento formal na carga negativa de -1 e -2, respectivamente.

Um sistema de baixa concentração de detergente inclui detergentes onde menos de cerca de 800 ppm de componentes de detergente estão presentes na água de lavagem. Os detergentes japoneses são tipicamente considerados sistemas de baixa concentração de detergente uma vez que têm aproximadamente 667 ppm de componentes de detergente presentes na água de lavagem.

Uma concentração de detergente média inclui detergentes onde entre cerca de 800 ppm e cerca de 2000 ppm de componentes de detergente estão presentes na água de lavagem. Os detergentes norte-americanos são geralmente considerados sistemas de concentração média de detergente uma vez que têm aproximadamente 975 ppm de componentes de detergente presentes na água de lavagem. O Brasil tem tipicamente aproximadamente 1500 ppm de componentes de detergente presentes na água de lavagem.

Um sistema de alta concentração de detergente inclui detergentes onde mais de cerca de 2000 ppm de componentes de detergente estão presentes na água de

lavagem. Os detergentes europeus são geralmente considerados sistemas de alta concentração de detergente uma vez que têm aproximadamente 4500-5000 ppm de componentes de detergente na água de lavagem.

Os detergentes da América Latina são geralmente detergentes ricos em sabões geradores de fosfatos e a variedade de detergentes utilizados na América Latina pode cair tanto nas concentrações médias de detergente como elevadas uma vez que variam de 1500 ppm a 6000 ppm de componentes de detergente na água de lavagem. Tal como mencionado acima, o Brasil tem tipicamente 1500 ppm de componentes de detergente presentes na água de lavagem. Contudo, outras regiões geográficas de detergentes ricos em sabões geradores de fosfatos, que não se limitam a outros países da América Latina, podem ter sistemas de alta concentração de detergente até 6000 ppm de componentes de detergente presentes na água de lavagem.

À luz do antecedente, é evidente que as concentrações das composições de detergente em soluções de lavagem típicas pelo mundo fora variam de menos de cerca de 800 ppm de composição do detergente ("regiões geográficas de baixa concentração de detergente"), por exemplo cerca de 667 ppm no Japão, a entre cerca de 800 ppm e cerca de 2000 ppm ("regiões geográficas de média concentração de detergente"), por exemplo cerca de 975 ppm nos EUA e cerca de 1500 ppm no Brasil, a mais de cerca de 2000 ppm ("regiões geográficas de alta concentração de detergente"),

por exemplo cerca de 4500 ppm a cerca de 5000 ppm na Europa e cerca de 6000 ppm em regiões geográficas de detergentes ricos em sabões geradores de fosfatos.

As concentrações das soluções de lavagem típicas são determinadas empiricamente. Por exemplo, nos EUA, uma máquina de lavar a roupa típica suporta um volume de cerca de 64,4 l de solução de lavagem. Concordantemente, para se obter uma concentração de cerca de 975 ppm de detergente na solução de lavagem têm de ser adicionados cerca de 62,79 g da composição de detergente aos 64,4 l da solução de lavagem. Esta quantidade é a quantidade típica medida para a água de lavagem pelo consumidor utilizando o copo medida proporcionado com o detergente.

As proteases são carbonil-hidrolases que actuam geralmente para clivar ligações peptídicas de proteínas ou péptidos. Tal como se utiliza aqui, "protease" significa uma protease de ocorrência natural ou uma protease recombinante. O termo "protease" é utilizado alternadamente com o termo "subtilisina", excepto onde o contexto o exige de outro modo. A subtilisinação é descrita em mais detalhe abaixo.

O presente invento faz uso de enzimas proteases que são variantes de ocorrência não natural de proteases possuindo uma actividade proteolítica, características de estabilidade, especificidade de substrato, perfil de pH e/ou desempenho diferentes em comparação com a precursora

da qual deriva a sequência de aminoácidos da variante. Especificamente, tais variantes de proteases têm uma sequência de aminoácidos que não se encontra na natureza, que é derivada através de substituição de uma variedade de resíduos de aminoácidos de uma protease precursora por aminoácidos diferentes. A protease precursora pode ser uma protease de ocorrência natural ou uma protease recombinante.

As variantes de proteases úteis aqui englobam a substituição de qualquer um dos dezanove L-aminoácidos de ocorrência natural nas designadas posições de resíduos de aminoácidos. Tais substituições podem ser feitas em qualquer subtilisina precursora (procariótica, eucariótica, etc.). Ao longo deste pedido é feita referência a vários aminoácidos por meio dos vulgares códigos de uma letra e de três letras. Tais códigos são identificados em Dale, M.W. (1989) "Molecular Genetics of Bacteria", John Wiley & Sons, Ltd., Apêndice B.

As variantes de proteases úteis aqui são variantes de subtilisinas e são de preferência derivadas de uma subtilisina de *Bacillus*. De maior preferência, as variantes de proteases são derivadas da subtilisina de *Bacillus lentus* e/ou da subtilisina 309.

As subtilisinas são proteases bacterianas ou fúngicas que actuam geralmente clivando ligações peptídicas de proteínas ou péptidos. Tal como aqui se utiliza,

"subtilisina" significa uma subtilisina de ocorrência natural ou uma subtilisina recombinante. Sabe-se que uma série de subtilisinas de ocorrência natural é produzida e frequentemente segregada por várias espécies microbianas. As sequências de aminoácidos dos membros desta série não são inteiramente homólogas. No entanto, as subtilisinas desta série exibem o mesmo tipo ou um tipo semelhante de actividade proteolítica. Esta classe de serina-proteases partilha uma sequência de aminoácidos comum definindo uma tríade catalítica que as distingue da classe de serina-proteases relacionadas com quimotripsina. As subtilisinas e as serina-proteases relacionadas com quimotripsina têm ambas uma tríade catalítica compreendendo aspartato, histidina e serina. Nas proteases relacionadas com subtilisina a ordem relativa destes aminoácidos, lendo do terminal amino para o carboxilo, é aspartato-histidina-serina. Nas proteases relacionadas com quimotripsina, a ordem relativa é, no entanto, histidina-aspartato-serina. Assim, a subtilisina aqui refere-se a uma serina-protease possuindo a tríade catalítica das proteases relacionadas com subtilisina. Exemplos incluem mas não se limitam às subtilisinas aqui identificadas na Fig. 3. Geralmente e para fins do presente invento, a numeração dos aminoácidos em proteases corresponde aos números atribuídos à sequência da subtilisina madura de *Bacillus amyloliquefaciens* apresentada na Fig. 1.

"Subtilisina recombinante" ou "protease recombinante" refere-se a uma subtilisina ou protease na qual a sequência de ADN codificando a subtilisina é modificada

para produzir uma sequência de ADN variante (ou mutante) que codifica a substituição, deleção ou inserção de um ou mais aminoácidos na sequência de aminoácidos de ocorrência natural. Métodos adequados para produzir uma tal modificação, e que podem ser combinados com os aqui divulgados, incluem os descritos em Patente US RE 34606, Patente US 5204015 e Patente US 5185258, Patente US 5700676, Patente US 5801038 e Patente US 5763257.

As "subtilisinas não humanas" e o ADN que as codifica podem ser obtidos a partir de muitos organismos procarióticos e eucarióticos. Exemplos adequados de organismos procarióticos incluem organismos Gram-negativos tais como *E. coli* ou *Pseudomonas* e bactérias Gram-positivas tais como *Micrococcus* ou *Bacillus*. Exemplos de organismos eucarióticos a partir dos quais podem ser obtidos a subtilisina e os seus genes incluem leveduras tais como *Saccharomyces cerevisiae*, fungos tais como *Aspergillus* sp.

Uma "variante de protease" tem uma sequência de aminoácidos que é derivada da sequência de aminoácidos de uma "protease precursora". As proteases precursoras incluem proteases de ocorrência natural e proteases recombinantes. A sequência de aminoácidos da variante de protease é "derivada" da sequência de aminoácidos da protease precursora através da substituição, deleção ou inserção de um ou mais aminoácidos da sequência de aminoácidos precursora. Tal modificação é da "sequência de ADN precursora" que codifica a sequência de aminoácidos da protease precursora

em vez da manipulação da enzima protease precursora per se. Métodos adequados para tal manipulação da sequência de ADN precursora incluem os métodos aqui divulgados, bem como métodos conhecidos dos peritos na arte (ver, por exemplo, EP 0328299, WO 89/06279 e as Patentes e Pedidos US já aqui referenciados).

Estes números das posições de aminoácidos referem-se ao atribuídos à sequência da subtilisina madura de *Bacillus amyloliquefaciens* apresentada na Fig. 1. No entanto, o invento, não se limita à mutação desta subtilisina em particular mas estende-se a proteases precursoras contendo resíduos de aminoácidos nas posições que são "equivalentes" aos resíduos particulares identificados na subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. Numa concretização preferida do presente invento, a protease precursora é a subtilisina de *Bacillus lentus* e as substituições são feitas nas posições de resíduos de aminoácidos equivalentes em *B. lentus* que correspondem às listadas acima.

Uma posição de resíduo (de aminoácido) de uma protease precursora é equivalente a um resíduo da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* se for homólogo (*i.e.*, correspondendo na posição à estrutura primária ou terciária) ou análogo a um resíduo específico ou porção desse resíduo na subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* (*i.e.*, possuindo a mesma capacidade funcional ou uma capacidade semelhante para combinar, reagir ou interagir quimicamente).

Para estabelecer homologia com a estrutura primária, a sequência de aminoácidos de uma protease precursora é directamente comparada com a sequência primária da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* e particularmente com um conjunto de resíduos que se sabe ser invariante nas subtilisinas para as quais é conhecida a sequência. Por exemplo, a Fig. 2 aqui mostra os resíduos conservados entre a subtilisina de *B. amyloliquefaciens* e a subtilisina de *B. lentus*. Após alinhamento dos resíduos conservados, permitindo as inserções e deleções necessárias para manter o alinhamento (*i.e.*, evitando a eliminação de resíduos conservados através de deleção e inserção arbitrárias), são definidos os resíduos equivalentes a determinados aminoácidos na sequência primária da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. O alinhamento dos resíduos conservados deve de preferência conservar 100% desses resíduos. No entanto, um alinhamento de mais de 75% ou de apenas 50% dos resíduos conservados é também adequado para definir os resíduos equivalentes. A conservação da tríade catalítica, Asp32/His64/Ser221 deve ser mantida. Siezen *et al.*, 1991, *Protein Eng.* 4(7): 719-737 mostra o alinhamento de um grande número de serina-proteases. Siezen *et al.* referem-se ao agrupamento como subtilases ou serina-proteases semelhantes a subtilisina.

Por exemplo, na Fig. 3, as sequências de aminoácidos da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus lincheniformis* (carlsbergensis)

e *Bacillus lentus* estão alinhadas para proporcionarem a quantidade máxima de homologia entre as sequências de aminoácidos. Uma comparação destas sequências mostra que existem vários resíduos conservados contidos em cada sequência. Estes resíduos conservados (tal como entre BPN' e *B. lentus*) estão identificados na Fig. 2.

Estes resíduos conservados, podem assim ser utilizados para definir os resíduos de aminoácidos equivalentes correspondentes da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* noutras subtilisinas tais como a subtilisina de *Bacillus lentus* (Publicação PCT N° WO 89/06279 publicada a 13 de Julho de 1989), a enzima precursora da protease aqui preferida, ou a subtilisina referida como PB92 (EP 0328299), que é altamente homóloga à subtilisina de *Bacillus lentus* preferida. As sequências de aminoácidos de algumas destas subtilisinas estão alinhadas nas Figs. 3A e 3B com a sequência da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* para produzirem a homologia máxima de resíduos conservados. Tal como se pode observar, existem várias deleções na sequência de *Bacillus lentus* em comparação com a subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. Assim, por exemplo, o aminoácido equivalente para Val165 na subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* nas outras subtilisinas é isoleucina para *B. lentus* e *B. licheniformis*.

Os "resíduos equivalentes" podem também ser definidos através da determinação da homologia ao nível da estrutura terciária para uma protease precursora cuja

estrutura terciária foi determinada através de cristalografia de raios X. Os resíduos equivalentes são definidos como aqueles para os quais as coordenadas atómicas de dois ou mais dos átomos da cadeia principal de um determinado resíduo de aminoácido da protease precursora e da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* (N em N, CA em CA, C em C e O em O) estão dentro de 0,13 nm e de preferência 0,1 nm após alinhamento. O alinhamento é alcançado após o melhor modelo ter sido orientado e posicionado para dar a sobreposição máxima das coordenadas atómicas dos átomos da proteína que não hidrogénio da protease em questão com a subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. O melhor modelo é o modelo da cristalográfico que dá o menor factor R para os dados experimentais de difracção à maior resolução disponível.

$$FactorR = \frac{\sum_h |Fo(h)| - |Fc(h)|}{\sum_h |Fo(h)|}$$

Os resíduos equivalentes que são funcionalmente análogos a um resíduo específico da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* são definidos como os aminoácidos da protease precursora que podem adoptar uma conformação tal que alteram, modificam ou contribuem para a estrutura proteica, ligação ao substrato ou catálise de um modo definido e atribuído a um resíduo específico da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. Mais, são aqueles resíduos da protease precursora (para a qual foi obtida uma estrutura terciária através de cristalografia de raios X)

que ocupam uma posição análoga até ao ponto em que, embora os átomos da cadeia principal do dado resíduo possam não satisfazer os critérios de equivalência com base na ocupação de uma posição homóloga, as coordenadas atómicas de pelo menos dois átomos da cadeia lateral do resíduo ficam a 0,13 nm dos átomos correspondentes da cadeia lateral da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. As coordenadas da estrutura tridimensional da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* estão expostas na Publicação EPO N° 0251446 (equivalente à Patente US 5182204, cuja divulgação é aqui incorporada por referência) e podem ser utilizados tal como delineado acima para determinar os resíduos equivalentes ao nível da estrutura terciária.

Alguns dos resíduos identificados para substituição são resíduos conservados enquanto que outros não são. No caso de resíduos que não são conservados, a substituição de um ou mais aminoácidos está limitada a substituições que produzam uma variante que tenha uma sequência de aminoácidos que não corresponda a uma verificada na natureza. No caso de resíduos conservados, tais substituições não devem resultar numa sequência de ocorrência natural. As variantes de proteases do presente invento incluem as formas maduras de variantes de proteases, bem como as pró- e as prepró-formas de tais variantes de proteases. As prepró-formas são a construção preferida uma vez que isto facilita a expressão, secreção e maturação das variantes de proteases.

"Pró-sequência" refere-se a uma sequência de aminoácidos ligada à porção N-terminal da forma madura de uma protease que quando é removida resulta no aparecimento da forma "madura" da protease. Muitas enzimas proteolíticas encontram-se na natureza como produtos pró-enzima da tradução e, na ausência de processamento pós-tradução, são expressos deste modo. Uma pró-sequência preferida para produção de variantes de proteases é a putativa pró-sequência da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, embora possam ser utilizadas outras pró-sequências de proteases.

Uma "sequência sinal" ou "pré-sequência" refere-se a qualquer sequência de aminoácidos ligada à porção N-terminal de uma protease ou à porção N-terminal de uma pró-protease que pode participar na secreção das formas madura ou pró- da protease. Esta definição de sequência sinal é funcional, pretendendo incluir todas as sequências de aminoácidos codificadas pela porção N-terminal do gene da protease que participa na realização da secreção da protease sob condições nativas. O presente invento utiliza tais sequências para efectuar a secreção das variantes de proteases tal como aqui definidas. Uma possível sequência sinal compreende os primeiros sete resíduos de aminoácidos da sequência sinal da subtilisina de *Bacillus subtilis* fundidos com o restante da sequência sinal da subtilisina de *Bacillus lentus* (ATCC 21536).

Uma forma "prepró" de uma variante de protease consiste na forma madura da protease possuindo uma pró-sequência operativamente ligada ao terminal amino da protease e uma sequência "pré" ou "sinal" operativamente ligada ao terminal amino da pró-sequência.

"Vector de expressão" refere-se a uma construção de ADN contendo uma sequência de ADN que é operativamente ligada a uma sequência de controlo adequada capaz de efectuar a expressão do referido ADN num hospedeiro adequado. Tais sequências de controlo incluem um promotor para efectuar a transcrição, uma sequência operadora opcional para controlar tal transcrição, uma sequência codificando locais adequados de ligação do ARNm ao ribossoma e sequências que controlam a terminação da transcrição e da tradução. O vector pode ser um plasmídeo, uma partícula fágica ou simplesmente uma potencial inserção genómica. Uma vez transformado num hospedeiro adequado, o vector pode replicar-se e funcionar independentemente do genoma do hospedeiro ou pode, nalguns casos, integrar-se no próprio genoma. No presente fascículo, "plasmídeo" e "vector" são por vezes utilizados alternadamente uma vez que o plasmídeo é a forma de vector mais vulgarmente utilizada actualmente. No entanto, pretende-se que o invento inclua outras formas de vectores de expressão que servem funções equivalentes e que são, ou que se tornem, conhecidas na arte.

As "células hospedeiras" utilizadas no presente

invento são geralmente hospedeiros procarióticos ou eucarióticos que de preferência foram manipulados através dos métodos divulgados na Patente US RE 34606 para os tornar incapazes de segregar endoprotease enzimaticamente activa. Uma célula hospedeira preferida para expressar protease na estirpe de *Bacillus* BG2036 que é deficiente em protease neutra enzimaticamente activa e protease alcalina (subtilisina). A construção da estirpe BG2036 está descrita em detalhe na Patente US 5264366. Outras células hospedeiras para a expressão de protease incluem *Bacillus subtilis* I168 (também descrito na Patente US RE 34606 e na Patente US 5264366), bem como qualquer estirpe de *Bacillus* adequada tal como *B. licheniformis*, *B. lentus*, etc.

As células hospedeiras são transformadas ou transfectadas com vectores construídos utilizando técnicas de ADN recombinante. Tais células hospedeiras transformadas são capazes de replicar vectores codificando as variantes de proteases ou de expressar a variante de protease desejada. No caso de vectores que codificam a pré-forma ou a prepró-forma da variante de protease, tais variantes, quando expressas, são tipicamente segregadas a partir da célula hospedeira para o meio da célula hospedeira.

"Operativamente ligada", quando se descreve a relação entre duas regiões de ADN, significa simplesmente que estas estão funcionalmente relacionadas uma com a outra. Por exemplo, uma pré-sequência está operativamente

ligada a um péptido se funcionar como sequência sinal, participando na secreção da forma madura da proteína muito provavelmente envolvendo a clivagem da sequência sinal. Um promotor está operativamente ligado a uma sequência de codificação se controlar a transcrição da sequência; um local de ligação ao ribossoma está operativamente ligado a uma sequência de codificação se estiver posicionado de forma a permitir a tradução.

Os genes codificando a protease precursora de ocorrência natural podem ser obtidos de acordo com os métodos gerais conhecidos dos peritos na arte. Os métodos compreendem geralmente a síntese de sondas marcadas possuindo putativas sequências codificando regiões da protease de interesse, a preparação de bibliotecas genómicas de organismos que expressam a protease e a pesquisa das bibliotecas quanto ao gene de interesse através da hibridação com as sondas. Os clones que hibridam positivamente são então mapeados e sequenciados.

A protease clonada é então utilizada para transformar uma célula hospedeira para expressar a protease. O gene da protease é então ligado a um plasmídeo de elevado número de cópias. Este plasmídeo replica-se em hospedeiros no sentido em que ele contém os elementos bem conhecidos necessários para a replicação de plasmídeos: um promotor operativamente ligado ao gene em questão (que pode ser fornecido como o próprio promotor homólogo do gene se

for reconhecido, *i.e.*, transcrito, pelo hospedeiro), uma região de terminação da transcrição e poliadenilação (necessária para a estabilidade do ARNm transcrito pelo hospedeiro a partir do gene da protease em certas células hospedeiras eucarióticas) que é exógena ou é fornecida pela região terminadora endógena do gene da protease e, desejavelmente, um gene de selecção tal como um gene de resistência a antibióticos que permite a manutenção contínua em cultura das células hospedeiras infectadas pelo plasmídeo através de crescimento em meios contendo antibiótico. Os plasmídeos de elevado número de cópias contêm também uma origem de replicação para o hospedeiro, permitindo deste modo que seja gerado um grande número de plasmídeos no citoplasma sem limitações cromossómicas. No entanto, está dentro do âmbito daqui integrar múltiplas cópias do gene da protease no genoma do hospedeiro. Isto é facilitado por organismos procariotas e eucariotas que sejam particularmente susceptíveis a recombinação homóloga.

O gene pode ser um gene de *B. lentus* natural. Alternativamente, pode ser produzido um gene sintético codificando uma protease precursora de ocorrência natural ou mutante. Numa tal abordagem, é determinada a sequência de ADN e/ou de aminoácidos da protease precursora. Múltiplos fragmentos sintéticos de ADN de cadeia simples sobreponíveis são a partir daí sintetizados, os quais após hibridação e ligação produzem um ADN sintético codificando a protease precursora. Um exemplo de uma construção génica sintética é exposto no Exemplo 3 da Patente US 5204015.

Uma vez clonado o gene de ocorrência natural ou sintético da protease precursora, são efectuadas várias modificações para aumentar a utilização do gene para além da síntese da protease precursora de ocorrência natural. Tais modificações incluem a produção de proteases recombinantes tal como divulgado na Patente US RE 34606 e na Publicação EPO N° 0251446 e a produção das variantes de proteases aqui descritas.

O seguinte método de mutagénese por cassette pode ser utilizado para facilitar a construção das variantes de proteases do presente invento, embora possam ser utilizados outros métodos. Primeiro, o gene de ocorrência natural codificando a protease é obtido e sequenciado no todo ou em parte. Depois a sequência é pesquisada quanto a um ponto no qual é desejado fazer uma mutação (deleção, inserção ou substituição) de um ou mais aminoácidos na enzima codificada. As sequências que flanqueiam este ponto são avaliadas quanto à presença de locais de restrição para substituição de um curto segmento do gene por um banco de oligonucleótidos que quando expresso codificará vários mutantes. Tais locais de restrição são de preferência locais únicos dentro do gene da protease de forma a facilitar a substituição do segmento génico. No entanto, pode ser utilizado qualquer local de restrição conveniente que não seja globalmente redundante no gene da protease, desde que os fragmentos génicos gerados através da digestão

de restrição possam ser novamente montados na sequência correcta. Se não estiverem presentes locais de restrição em localizações dentro de uma distância conveniente a partir do ponto seleccionado (de 10 a 15 nucleótidos), tais locais são gerados através da substituição de nucleótidos no gene de um tal modo que nem o enquadramento de leitura nem os aminoácidos codificados sejam alterados na construção final. A mutação do gene para alterar a sua sequência conforme a sequência desejada é alcançada através de extensão do iniciador M13 de acordo com métodos geralmente conhecidos. A tarefa de localização de regiões flanqueadoras adequadas e avaliação das alterações necessárias para se chegar a duas sequências de locais de restrição convenientes é tornada rotina através da redundância do código genético, de um mapa de enzimas de restrição do gene e do grande número de enzimas de restrição diferentes. Observe-se que se estiver disponível um local de restrição flanqueador conveniente, o método de cima apenas necessita de ser utilizado em associação com a região flanqueadora que não contiver um local.

Uma vez clonado o ADN de ocorrência natural ou o ADN sintético, os locais de restrição que flanqueiam as posições a mutar são digeridos com as enzimas de restrição cognatas e é ligada no gene uma pluralidade de cassetes oligonucleotídicas complementares às extremidades terminais. A mutagenese é simplificada através deste método porque todos os oligonucleótidos podem ser sintetizados de

forma a terem os mesmos locais de restrição e não são necessários ligadores sintéticos para criar os locais de restrição.

Tal como aqui se utiliza, actividade proteolítica é definida como a taxa de hidrólise de ligações peptídicas por miligrama de enzima activa. Existem muitos procedimentos bem conhecidos para medição da actividade proteolítica (K.M. Kalisz, "Microbial Proteinases", "Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology", A. Fichter ed., 1988). Para além ou como alternativa a uma actividade proteolítica modificada, as enzimas variantes podem ter outras propriedades modificadas tais como a razão K_m , k_{cat} , k_{cat}/K_m e/ou especificidade de substrato modificada e/ou perfil de actividade do pH modificado. Estas enzimas podem ser modificadas para o substrato em particular que se antecipa esteja presente, por exemplo, em utilizações em lavagem de roupa.

Verificou-se que variantes de proteases contendo substituições dos aminoácidos numa ou mais posições de resíduos para que as substituições alterem a carga nessa posição para tornar a carga mais negativa ou menos positiva em comparação com uma protease precursora, são mais eficazes numa concentração de detergente baixa que uma protease precursora.

Verificou-se que variantes de proteases contendo

substituições dos aminoácidos numa ou mais posições de resíduos para que as substituições alterem a carga nessa posição para tornar a carga mais positiva ou menos negativa em comparação com uma protease precursora são mais eficazes numa concentração de detergente elevada que uma protease precursora.

Ainda, verificámos que muitas das variantes de proteases úteis no sistema de baixa concentração de detergente e/ou no sistema de elevada concentração de detergente são também eficazes num sistema de média concentração de detergente.

Estas substituições são de preferência feitas na subtilisina de *Bacillus lentus* (recombinante ou de tipo nativo), embora as substituições possam ser feitas em qualquer protease de *Bacillus*, de preferência subtilisinas de *Bacillus*.

Com base nos resultados da pesquisa obtidos com as proteases variantes, as mutações observadas na subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* são importantes para a actividade proteolítica, desempenho e/ou estabilidade destas enzimas e para o desempenho de limpeza ou lavagem de tais enzimas variantes.

As variantes de proteases descritas são úteis na formulação de composições de detergentes. Vários compostos

conhecidos são tensioactivos adequados úteis em composições compreendendo tais mutantes de proteases. Estes incluem detergentes não iónicos, aniónicos, catiónicos ou zwitteriónicos, tal como divulgado em US 4404128 para Barry J. Anderson e US 4261868 para Jiri Flora, *et al.* Uma formulação de detergente adequada é a descrita no Exemplo 7 da Patente US 5204015. A arte está familiarizada com as diferentes formulações que podem ser utilizadas como composições de limpeza. As variantes descritas apresentam um maior desempenho numa composição de detergente (em comparação com a precursora). Tal como aqui se utiliza, um desempenho maior num detergente é definido como um aumento da eliminação de certas nódoas sensíveis à enzima tais como gordura ou sangue, determinado através de avaliação habitual após um ciclo de lavagem padrão.

As proteases podem ser formuladas em detergentes em pó e líquidos possuindo um pH entre 6,5 e 12,0 a níveis de cerca de 0,01 a cerca de 5% (de preferência de 1% a 5%) do peso. Estas composições de detergente de limpeza podem incluir também outras enzimas tais como proteases, amilases, celulasas, lipases ou endoglicosidasas conhecidas, bem como estruturadores e estabilizantes.

A adição de proteases a composições de limpeza convencionais não cria qualquer limitação especial de utilização. Por outras palavras, qualquer temperatura e pH adequados para o detergente são também adequados para as

presentes composições desde que o pH esteja dentro do intervalo de cima e a temperatura esteja abaixo da temperatura de desnaturação da protease descrita. Adicionalmente, podem ser utilizadas proteases numa composição de limpeza sem detergentes, novamente sozinhas ou em combinação com estruturadores e estabilizantes.

O presente invento refere-se também a composições de limpeza contendo variantes de proteases. As composições de limpeza podem adicionalmente conter aditivos que sejam vulgarmente utilizados em composições de limpeza. Estes podem ser seleccionados a partir de, mas não se limitando a, branqueadores, tensioactivos, estruturadores, enzimas e catalisadores branqueadores. Será facilmente aparente para um perito na arte que aditivos são adequados para inclusão nas composições. A lista aqui proporcionada não é de modo algum exaustiva e deve ser tida apenas como exemplo de aditivos adequados. Será também facilmente aparente para o perito na arte utilizar apenas os aditivos que sejam compatíveis com as enzimas e outros componentes na composição, por exemplo, o tensioactivo.

Quando presente, a quantidade de aditivo presente na composição de limpeza é de cerca de 0,01% a cerca de 99,9%, de preferência de cerca de 1% a cerca de 95%, sendo preferível de cerca de 1% a cerca de 80%.

Uma composição de detergente produzida através

dos métodos do presente invento pode ser utilizada para tratar por exemplo seda ou lã tal como descrito em publicações tais como RD 216034; EP 134267; US 4533359; e EP 344259.

O seguinte é apresentado para fins de exemplo e não deve ser entendido como uma limitação ao âmbito das reivindicações.

Exemplo 1

Um grande número de variantes de proteases foi produzido e purificado utilizando métodos bem conhecidos na arte. Todas as mutações foram feitas na subtilisina de *Bacillus lentus* GG36.

As variantes de proteases produzidas foram testadas quanto ao desempenho em dois tipos de detergentes e condições de lavagem utilizando um ensaio de microlavagem descrito em "An improved method of assaying for a preferred enzyme and/or preferred detergent composition", N° de Série U.S. 60/068796.

As Tabelas 1-13 listam as proteases variantes ensaiadas e os resultados dos testes em dois detergentes diferentes. Todos os valores são dados em comparação com a primeira protease mostrada na tabela (i.e., um valor de

1,32 indica uma capacidade para libertar 132% da nódoa em oposição aos 100% da primeira variante da tabela).

A coluna A mostra a diferença de carga de uma variante para a coluna B, o detergente foi Ariel Ultra (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, USA) filtrado a 0,67 g/l numa solução contendo uma dureza mista de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ de 3 grãos por galão e foram utilizadas 0,3 ppm de enzima em cada poço a 25°C (sistema de detergente de baixa concentração). Para a coluna C, o detergente foi Ariel Futur (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, USA) filtrado a 3,38 g/l numa solução contendo uma dureza mista de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ de 15 grãos por galão e foram utilizadas 0,3 ppm de enzima em cada poço a 40°C (sistema de detergente de alta concentração).

Tabela 1

						A	B	C
N76D	S103A	V104I	Q109R				1,00	1,00
N76D	S103A	V104I	Q109R	Q245R		+1	0,48	1,41

Tabela 2

									A	B	C
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	Q245R				1,00	1,00
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	N204D	Q236H	Q245R		-1	1,11	0,03

Tabela 3

						A	B	C
V68A	N76D	S103A	V104I				1,00	1,00
T22K	V68A	N76D	S103A	V104I		+1	0,74	1,85

Tabela 4

							A	B	C
N76D	S103A	V104I	M222S					1,00	1,00
N76D	S103A	V104I	N173R	M222S			0	0,66	1,84
Q12R	N76D	S103A	V104I	M222S	Q245R		+1	0,41	5,84

Tabela 5

										A	B	C
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R					1,00	1,00
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R	N261D			-1	1,79	0,81
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	R170S	N185D	M222S	N243D	Q245R	-3	2,87	0,02

Tabela 6

										A	B	C
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H						1,00	1,00
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	Q245R				+1	0,94	6,80
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K			+3	0,44	20,60

Tabela 7

										A	B	C
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R				1,00	1,00
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210R	A232V	Q236H	Q245R		+1	0,44	2,66

Tabela 8

										A	B	C
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K				1,00	1,00
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		-1	1,96	0,65

Tabela 9

										A	B	C
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R					1,00	1,00
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	K237E	Q245R			-2	1,27	0,12

Tabela 10

										A	B	C
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V				1,00	1,00
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V		-1	1,56	0,48

Tabela 11

										A	B	C
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1,00	1,00
S103A	V104I	G159D	L217E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		-1	1,90	0,15

Tabela 12

											A	B	C
S103A	V104I	S101G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1,00	1,00
N76D	S103A	V104I	S101G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		-1	1,28	0,39

Tabela 13

											A	B	C
N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			1,00	1,00
N62D	S103A	V104I	Q109R	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	+1	0,40	1,74

Exemplo 2

As seguintes variantes de proteases foram feitas e testadas tal como observado no Exemplo 1.

As variantes da Tabela 14 são variantes de proteases que possuem ambos os tipos de substituições: as que alteram a carga numa posição para tornar a carga mais negativa ou menos positiva e as que alteram a carga numa posição para tornar a carga mais positiva ou menos negativa em comparação com GG36 de *B. lentus* bem como substituições neutras que não afectam a carga numa dada posição de resíduo. Isto produz variantes que têm um desempenho melhor que um padrão tanto em sistemas de baixa concentração de detergente (coluna A; Ariel Ultra (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, USA) filtrado a 0,67 g/l), numa solução contendo uma dureza mista de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ de 3 grãos por galão

e foram utilizadas 0,3 ppm de enzima em cada poço a 25°C) como em sistemas de alta concentração de detergente (coluna B; Ariel Futur (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, USA) filtrado a 3,38 g/l numa solução contendo uma dureza mista de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ de 15 grãos por galão e foram utilizadas 0,3 ppm de enzima em cada poço a 40°C).

Tabela 14

											A	B
N76D	S103A	V104I									1,00	1,00
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K				1,41	1,85
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A		1,30	1,73
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2,77	1,20
V68A	S103A	V104I	N140D	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K			2,96	1,42
N43K	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R				2,05	1,78
N43D	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K			2,00	1,34
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A215R	A232V	Q236H	Q245R			1,67	1,45
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R			2,16	1,72
N76D	S103A	V104I	V147I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248S	K251R		1,35	1,29
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	S256R			2,01	1,72
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R			2,09	1,62
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1,44	1,41
G20R	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		1,81	1,72
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	L257K		1,51	1,41
V68A	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	N248S	N252K				1,04	1,50
N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V				1,92	1,09

LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS

<110> Genencor International, Inc.

<120> Variantes de Proteases Multiplamente Substituídas com
Carga Líquida Alterada para Utilização em Detergentes

<130> GFR/FP6304083

<140>

<141>

<150> 98955111.4

<151> 1998-10-23

<150> 08/956323

<151> 1997-10-23

<150> 08/956564

<151> 1997-10-23

<150> 08/956324

<151> 1997-10-23

<160> 6.

<170> FastSEQ para Windows Versão 3.0

<210> 1

<211> 1497

<212> ADN

<213> *B. amyloliquefaciens*

<220>

<221> CDS

<222> (96)...(1245)

<400> 1

```

ggctactatc aatatttttc catactatac aattatatac cagataatc tgtctattgg      80
ttattcttgc aatgaaaaaa aggagaggat aaaga gtg agc ggc aaa aaa gta      113
                               Val Arg Gly Lys Lys Val
                               1         5

tgg atc agt ttg ctg ttt gct tta gcg tta atc ttc acg atg gcg ttc      161
Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Ala Leu Ile Phe Thr Met Ala Phe
          10          15          20

ggc agc sca tcc tct gcc cag gcg gca ggg aaa tca sac ggg gaa aag      209
Gly Ser Thr Ser Ser Ala Gln Ala Ala Gly Lys Ser Asn Gly Glu Lys
          25          30          35

aaa kat att gtc ggg ttt aaa cag aca atg agc acg atg agc gcc gct      257
Lys Tyr Ile Val Gly Phe Lys Gln Thr Met Ser Thr Met Ser Ala Ala
          40          45          50

aag aag aaa gat gtc att tct gaa aaa ggc ggg aaa gtg caa aag caa      305
Lys Lys Lys Asp Val Ile Ser Glu Lys Gly Gly Lys Val Gln Lys Gln
          55          60          65          70

```

ttc aaa tat gta gac gca gct tca gtc aca tta aac gaa aaa gct gta	353
Phe Lys Tyr Val Asp Ala Ala Ser Val Thr Leu Asn Glu Lys Ala Val	
75 80 85	
aaa gaa ttg aaa aaa gac ccg agc gtc gct tac gtt gaa gaa gat cac	401
Lys Glu Leu Lys Lys Asp Pro Ser Val Ala Tyr Val Glu Glu Asp His	
90 95 100	
gta gca cat gcg tac gcg cag tcc gtg cct tac ggc gta tca caa att	449
Val Ala His Ala Tyr Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Val Ser Gln Ile	
105 110 115	
aaa gcc cct gct ctg cac tct caa ggc tac act gga tca aat gtt aaa	497
Lys Ala Pro Ala Leu His Ser Gln Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys	
120 125 130	
gta gcg gtt atc gac agc ggt atc gat tct tct cat cct gat tta aag	545
Val Ala Val Ile Asp Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asp Leu Lys	
135 140 145 150	
gta gca agc gga gcc agc atg gtt cct tct gaa aca aat cct ttc caa	593
Val Ala Ser Gly Ala Ser Met Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Phe Gln	
155 160 165	
gac aac aac tct cac gga act cac gtt gcc ggc aca gtt gcg gct ctt	641
Asp Asn Asn Ser His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu	
170 175 180	
aat aac tca atc ggt gta tta ggc gtt gcg cca agc gca tca ctt tac	689
Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser Leu Tyr	
185 190 195	
gct gta aaa gtt ctg ggt gct gac ggt tcc ggc caa tac agc tgg atc	737
Ala Val Lys Val Leu Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile	
200 205 210	
att aac gga atc gag tgg gcg atc gca aac aat atg gac gtt att aac	785
Ile Asn Gly Ile Glu Trp Ala Ile Ala Asn Asn Met Asp Val Ile Asn	
215 220 225 230	
atg agc ctg ggc gga cct tct ggt tct gct gct tta aaa gcg gca gtt	833
Met Ser Leu Gly Gly Pro Ser Gly Ser Ala Ala Leu Lys Ala Ala Val	
235 240 245	
gat aaa gcc gtt gca tcc ggc gtc gta gtc gtt gcg gca gcc ggt aac	881
Asp Lys Ala Val Ala Ser Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn	
250 255 260	
gaa ggc act tcc ggc agc tca agc aca gtg ggc tac cct ggt aaa tac	929
Glu Gly Thr Ser Gly Ser Ser Thr Val Gly Tyr Pro Gly Lys Tyr	
265 270 275	
cct tct gtc att gca gta ggc gct gtt gac agc agc aac caa aga gca	977
Pro Ser Val Ile Ala Val Gly Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arg Ala	
280 285 290	
tct ttc tca agc gta gga cct gag ctt gat gtc atg gca cct ggc gta	1025
Ser Phe Ser Ser Val Gly Pro Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val	
295 300 305 310	

```

tct atc caa agc acg ctt cct gga aac aac tac ggg gcg tac aac ggc      1073
Ser Ile Gln Ser Thr Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly
          315                      320                      325

acg tca atg gca tct ccg cac gtt gcc gga gcg gct gct ttg att cct      1121
Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu
          330                      335                      340

tct aag cac ccg aac tgg aca aac act caa gtc cgc agc agt tta gaa      1169
Ser Lys His Pro Asn Trp Thr Asn Thr Gln Val Arg Ser Ser Leu Glu
          345                      350                      355

aac acc act aca aac ctt ggt gat tct ttg tac tat gga aac ggg ctg      1217
Asn Thr Thr Thr Lys Leu Gly Asp Ser Leu Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu
          360                      365                      370

atc aac gta caa gcg gca gct cag taa a acataaaaaa ccggcccttgg      1265
Ile Asn Val Gln Ala Ala Ala Gln *
          375                      380

```

```

ccccgcgggt tttttattat ttttttctct ccgcattgttc aatccgcttc ataactgacg      1325
gatggctccc tctgaaaatt ttacggagaa scggcgggtt gaccoggttc agtcccgtaa      1385
cggcgaactc ctgaaaagtc tcaatgcgcg ctteccgggtt tccggtcagc tcaatgccat      1445
aacggtcggc ggcgttttcc tgataccggg agacggcatt cgtaatcggg tc          1497

```

<210> 2

<211> 1497

<212> PRT

<213> *B. amyloliquefaciens*

<400> 2

```

Gly Gly Thr Cys Thr Ala Cys Thr Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Thr
 1          5          10          15
Ala Thr Thr Cys Cys Ala Thr Ala Cys Thr Ala Thr Ala Cys Ala Ala
 20          25          30
Thr Thr Ala Ala Thr Ala Cys Ala Cys Ala Gly Ala Ala Thr Ala Ala
 35          40          45
Thr Cys Thr Gly Thr Cys Thr Ala Thr Thr Gly Gly Thr Thr Ala Thr
 50          55          60
Thr Cys Thr Gly Cys Ala Ala Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 65          70          75          80
Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Thr Ala Ala Ala Gly Ala Gly
 85          90          95
Thr Gly Ala Gly Ala Gly Gly Cys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Thr
100          105          110
Ala Thr Gly Gly Ala Thr Cys Ala Gly Thr Thr Thr Gly Cys Thr Gly
115          120          125
Thr Thr Thr Gly Cys Thr Thr Ala Gly Cys Gly Thr Thr Ala Ala
130          135          140
Thr Cys Thr Thr Thr Ala Cys Gly Ala Thr Gly Gly Cys Gly Thr Thr
145          150          155          160
Cys Gly Gly Cys Ala Gly Cys Ala Cys Ala Thr Cys Cys Thr Cys Thr
165          170          175
Gly Cys Cys Cys Ala Gly Gly Cys Gly Gly Cys Ala Gly Gly Gly Ala
180          185          190
Ala Ala Thr Cys Ala Ala Ala Cys Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala
195          200          205
Gly Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Thr Gly Thr Cys Gly Gly Gly

```

210	215	220
Thr Thr Thr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Ala Cys Ala Ala Thr Gly Ala		
225	230	235
Gly Cys Ala Cys Gly Ala Thr Gly Ala Gly Cys Gly Cys Cys Gly Cys		240
	245	250
Thr Ala Ala Gly Ala Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ala Thr Gly Thr Cys		255
	260	265
Ala Thr Thr Thr Cys Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Cys Gly		270
	275	280
Gly Gly Ala Ala Ala Gly Thr Gly Cys Ala Ala Ala Gly Cys Ala		285
	290	295
Ala Thr Thr Cys Ala Ala Thr Ala Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys		300
305	310	315
Gly Cys Ala Gly Cys Thr Thr Cys Ala Gly Thr Cys Ala Cys Ala Thr		320
	325	330
Thr Ala Ala Ala Cys Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Cys Thr Gly Thr		335
	340	345
Ala Ala Ala Ala Gly Ala Ala Thr Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala		350
	355	360
Gly Ala Cys Cys Cys Gly Ala Gly Cys Gly Thr Cys Gly Cys Thr Thr		365
	370	375
Ala Cys Gly Thr Thr Gly Ala Ala Gly Ala Ala Gly Ala Thr Cys Ala		380
385	390	395
Cys Gly Thr Ala Gly Cys Ala Cys Ala Thr Gly Cys Gly Thr Ala Cys		400
	405	410
Gly Cys Gly Cys Ala Gly Thr Cys Cys Gly Thr Gly Cys Cys Thr Thr		415
	420	425
Ala Cys Gly Gly Cys Gly Thr Ala Thr Cys Ala Cys Ala Ala Ala Thr		430
	435	440
Thr Ala Ala Ala Gly Cys Cys Cys Cys Thr Gly Cys Thr Cys Thr Gly		445
	450	455
Cys Ala Cys Thr Cys Thr Cys Ala Ala Gly Gly Cys Thr Ala Cys Ala		460
465	470	475
Cys Thr Gly Gly Ala Thr Cys Ala Ala Ala Thr Gly Thr Thr Ala Ala		480
	485	490
Ala Gly Thr Ala Gly Cys Gly Gly Thr Thr Ala Thr Cys Gly Ala Cys		495
	500	505
Ala Gly Cys Gly Gly Thr Ala Thr Cys Gly Ala Thr Thr Cys Thr Thr		510
	515	520
Cys Thr Cys Ala Thr Cys Cys Thr Gly Ala Thr Thr Thr Ala Ala Ala		525
	530	535
Gly Gly Thr Ala Gly Cys Ala Ala Gly Cys Gly Gly Ala Gly Cys Cys		540
545	550	555
Ala Gly Cys Ala Thr Gly Gly Thr Thr Cys Cys Thr Thr Cys Thr Gly		560
	565	570
Ala Ala Ala Cys Ala Ala Ala Thr Cys Cys Thr Thr Thr Cys Cys Ala		575
	580	585
Ala Gly Ala Cys Ala Ala Cys Ala Ala Cys Thr Cys Thr Cys Ala Cys		590
	595	600
Gly Gly Ala Ala Cys Thr Cys Ala Cys Gly Thr Thr Gly Cys Cys Gly		605
	610	615
Gly Cys Ala Cys Ala Gly Thr Thr Gly Cys Gly Gly Cys Thr Cys Thr		620
625	630	635
Thr Ala Ala Thr Ala Ala Cys Thr Cys Ala Ala Thr Cys Gly Gly Thr		640
	645	650
Gly Thr Ala Thr Ala Gly Gly Cys Gly Thr Thr Gly Cys Gly Cys		655
	660	665
Cys Ala Ala Gly Cys Gly Cys Ala Thr Cys Ala Cys Thr Thr Thr Ala		670
	675	680
		685

Cys Gly Cys Thr Gly Thr Ala Ala Ala Ala Gly Thr Thr Cys Thr Cys
 690 695 700
 Gly Gly Thr Gly Cys Thr Gly Ala Cys Gly Gly Thr Thr Cys Cys Gly
 705 710 715 720
 Gly Cys Cys Ala Ala Thr Ala Cys Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Thr
 725 730 735
 Cys Ala Thr Thr Ala Ala Cys Gly Gly Ala Ala Thr Cys Gly Ala Gly
 740 745 750
 Thr Gly Gly Gly Cys Gly Ala Thr Cys Gly Cys Ala Ala Ala Cys Ala
 755 760 765
 Ala Thr Ala Thr Gly Gly Ala Cys Gly Thr Thr Ala Thr Thr Ala Ala
 770 775 780
 Cys Ala Thr Gly Ala Gly Cys Cys Thr Cys Gly Gly Cys Gly Gly Ala
 785 790 795 800
 Cys Cys Thr Thr Cys Thr Gly Gly Thr Thr Cys Thr Gly Cys Thr Gly
 805 810 815
 Cys Thr Thr Thr Ala Ala Ala Ala Gly Cys Gly Gly Cys Ala Gly Thr
 820 825 830
 Thr Gly Ala Thr Ala Ala Ala Gly Cys Cys Gly Thr Thr Gly Cys Ala
 835 840 845
 Thr Cys Cys Gly Gly Cys Gly Thr Cys Gly Thr Ala Gly Thr Cys Gly
 850 855 860
 Thr Thr Gly Cys Gly Gly Cys Ala Gly Cys Cys Gly Gly Thr Ala Ala
 865 870 875 880
 Cys Gly Ala Ala Gly Gly Cys Ala Cys Thr Thr Cys Cys Gly Gly Cys
 885 890 895
 Ala Gly Cys Thr Cys Ala Ala Gly Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Gly
 900 905 910
 Gly Cys Thr Ala Cys Cys Cys Thr Gly Gly Thr Ala Ala Ala Thr Ala
 915 920 925
 Cys Cys Cys Thr Thr Cys Thr Gly Thr Cys Ala Thr Thr Gly Cys Ala
 930 935 940
 Gly Thr Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly Thr Thr Gly Ala Cys Ala
 945 950 955 960
 Gly Cys Ala Gly Cys Ala Ala Cys Cys Ala Ala Ala Gly Ala Gly Cys
 965 970 975
 Ala Thr Cys Thr Thr Thr Cys Thr Cys Ala Ala Gly Cys Gly Thr Ala
 980 985 990
 Gly Gly Ala Cys Cys Thr Gly Ala Gly Cys Thr Thr Gly Ala Thr Gly
 995 1000 1005
 Thr Cys Ala Thr Gly Gly Cys Ala Cys Cys Thr Gly Gly Cys Gly Thr
 1010 1015 1020
 Ala Thr Cys Thr Ala Thr Cys Cys Ala Ala Ala Gly Cys Ala Cys Gly
 1025 1030 1035 104
 Cys Thr Thr Cys Cys Thr Gly Gly Ala Ala Cys Ala Ala Ala Thr
 1045 1050 1055
 Ala Cys Gly Gly Gly Cys Gly Thr Ala Cys Ala Ala Cys Gly Gly
 1060 1065 1070
 Thr Ala Cys Gly Thr Cys Ala Ala Thr Gly Gly Cys Ala Thr Cys Thr
 1075 1080 1085
 Cys Cys Gly Cys Ala Cys Gly Thr Thr Gly Cys Cys Gly Gly Ala Gly
 1090 1095 1100
 Cys Gly Gly Cys Thr Gly Cys Thr Thr Thr Gly Ala Thr Thr Cys Thr
 1105 1110 1115 112
 Thr Thr Cys Thr Ala Ala Gly Cys Ala Cys Cys Gly Ala Ala Cys
 1125 1130 1135
 Thr Gly Gly Ala Cys Ala Ala Ala Cys Ala Cys Thr Cys Ala Ala Gly
 1140 1145 1150
 Thr Cys Cys Gly Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr Thr Thr Ala Gly Ala

1155	1160	1165
Ala Ala Ala Cys Ala Cys Cys	Ala Cys Thr Ala Cys Ala	Ala Ala Ala Ala
1170	1175	1180
Cys Thr Thr Gly Gly Thr Gly	Ala Thr Thr Cys Thr Thr	Thr Gly Thr
1185	1190	1195
Ala Cys Thr Ala Thr Gly Gly	Ala Ala Ala Gly Gly Gly	Cys Thr
1205	1210	1215
Gly Ala Thr Cys Ala Ala Cys	Gly Thr Ala Cys Ala Ala	Gly Cys Gly
1220	1225	1230
Gly Cys Ala Gly Cys Thr Cys	Ala Gly Thr Ala Ala Ala	Ala Cys Ala
1235	1240	1245
Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala	Cys Cys Gly Gly Cys Cys	Thr Thr Gly
1250	1255	1260
Gly Cys Cys Cys Cys Gly Cys	Cys Gly Gly Thr Thr Thr	Thr Thr Thr
1265	1270	1275
Ala Thr Thr Ala Thr Thr Thr	Thr Thr Thr Cys Cys Thr	Cys Thr Cys
1285	1290	1295
Cys Gly Cys Ala Thr Gly Thr	Thr Thr Cys Ala Ala Thr	Cys Cys Gly Cys
1300	1305	1310
Thr Cys Cys Ala Thr Ala Ala	Thr Cys Gly Ala Cys Gly	Gly Ala Thr
1315	1320	1325
Gly Gly Cys Thr Cys Cys Cys	Thr Cys Thr Gly Ala Ala	Ala Ala Thr
1330	1335	1340
Thr Thr Thr Ala Ala Cys Gly	Ala Gly Ala Ala Cys Gly	Gly Cys
1345	1350	1355
Gly Gly Gly Thr Thr Gly Ala	Cys Cys Cys Gly Gly Cys	Thr Cys Ala
1365	1370	1375
Gly Thr Cys Cys Cys Gly Thr	Ala Ala Cys Gly Gly Cys	Cys Ala Ala
1380	1385	1390
Cys Thr Cys Cys Thr Gly Ala	Ala Ala Cys Gly Thr Cys	Thr Cys Ala
1395	1400	1405
Ala Thr Cys Gly Cys Cys Gly	Cys Thr Thr Cys Cys Gly	Gly Thr
1410	1415	1420
Thr Thr Cys Cys Gly Gly Thr	Cys Ala Gly Cys Thr Cys	Ala Ala Thr
1425	1430	1435
Gly Cys Cys Ala Thr Ala Ala	Cys Gly Gly Thr Cys Gly	Gly Cys Gly
1445	1450	1455
Gly Cys Gly Thr Thr Thr Thr	Cys Cys Thr Gly Ala Thr	Ala Cys Cys
1460	1465	1470
Gly Gly Gly Ala Gly Ala Cys	Gly Gly Cys Ala Thr Thr	Cys Gly Thr
1475	1480	1485
Ala Ala Thr Cys Gly Gly Ala	Thr Cys	
1490	1495	

<210> 3

<211> 275

<212> PRT

<213> *B. amyloliquefaciens*

<400> 3

Ala	Gln	Ser	Val	Pro	Tyr	Gly	Val	Ser	Gln	Ile	Lys	Ala	Pro	Ala	Leu
1				5					10					15	
His	Ser	Gln	Gly	Tyr	Thr	Gly	Ser	Asn	Val	Lys	Val	Ala	Val	Ile	Asp
			20					25					30		
Ser	Gly	Ile	Asp	Ser	Ser	His	Pro	Asp	Leu	Lys	Val	Ala	Gly	Gly	Ala
			35				40					45			
Ser	Met	Val	Pro	Ser	Glu	Thr	Asn	Pro	Phe	Gln	Asp	Asn	Asn	Ser	His
	50					55					60				
Gly	Thr	His	Val	Ala	Gly	Thr	Val	Ala	Ala	Leu	Asn	Asn	Ser	Ile	Gly

```

65          70          75          80
Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu
      85          90          95
Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu
      100          105          110
Trp Ala Ile Ala Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
      115          120          125
Pro Ser Gly Ser Ala Ala Leu Lys Ala Ala Val Asp Lys Ala Val Ala
      130          135          140
Ser Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Thr Ser Gly
145          150          155          160
Ser Ser Ser Thr Val Gly Tyr Pro Gly Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala
      165          170          175
Val Gly Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val
      180          185          190
Gly Pro Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr
      195          200          205
Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser
      210          215          220
Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn
225          230          235          240
Trp Thr Asn Thr Gln Val Arg Ser Ser Leu Glu Asn Thr Thr Thr Lys
      245          250          255
Leu Gly Asp Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala
      260          265          270
Ala Ala Gln
      275

```

<210> 4

<211> 275

<212> PRT

<213> *B. subtilis*

<400> 4

```

Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Ile Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu
1      5      10      15
His Ser Gln Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp
      20      25      30
Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asp Leu Asn Val Arg Gly Gly Ala
      35      40      45
Ser Phe Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Tyr Gln Asp Gly Ser Ser His
      50      55      60
Gly Thr His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly
      65      70      75      80
Val Leu Gly Val Ser Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu
      85      90      95
Asp Ser Thr Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu
      100          105          110
Trp Ala Ile Ser Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
      115          120          125
Pro Thr Gly Ser Thr Ala Leu Lys Thr Val Val Asp Lys Ala Val Ser
      130          135          140
Ser Gly Ile Val Val Ala Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Ser Ser Gly
145          150          155          160
Ser Thr Ser Thr Val Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Pro Ser Thr Ile Ala
      165          170          175
Val Gly Ala Val Asn Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Ala
      180          185          190
Gly Ser Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr

```

[illegible]

```
<210> 5
<211> 274
<212> PRT
<213> B. licheniformis
```

<400> 5

[illegible]

<400> 6

Lisboa, 24 de Agosto de 2011

REIVINDICAÇÕES

1. Método de melhoramento do desempenho de uma subtilisina num sistema de baixa, média e elevada concentração de detergente possuindo menos de cerca de 800 ppm, entre cerca de 800 ppm e cerca de 2000 ppm, e acima de cerca de 2000 ppm de componentes de detergente presentes na água de lavagem, respectivamente:

a) substituição de um aminoácido numa ou mais posições de resíduos numa subtilisina precursora para produzir uma variante de subtilisina em que a substituição altera a carga nessa posição para tornar a carga mais positiva ou menos negativa em comparação com a precursora; e

b) substituição de um aminoácido numa ou mais posições de resíduos numa subtilisina precursora para produzir uma variante de subtilisina em que a substituição altera a carga nessa posição para tornar a carga mais negativa ou menos positiva em comparação com a precursora

c) teste da variante para determinar a sua eficácia em comparação com a subtilisina precursora num sistema de baixa, média e elevada concentração de detergente possuindo menos de cerca de 800 ppm, entre cerca de 800 ppm e cerca de 2000 ppm, e acima de cerca de 2000 ppm de componentes de detergente presentes na água de lavagem, respectivamente; e

d) repetição dos passos a)-c) conforme necessário para produzir uma variante de subtilisina que seja mais eficaz num sistema de baixa, média e elevada concentração de detergente que uma protease precursora.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a precursora é uma subtilisina de *Bacillus*.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, em que a precursora é subtilisina de *Bacillus lentus*

4. Método de produção de uma composição de detergente compreendendo, tendo melhorado o desempenho de uma subtilisina através da produção de uma variante de subtilisina através de um método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, a formulação da referida variante de subtilisina numa composição de detergente em pó ou líquida possuindo um pH entre 6,5 e 12,0 e de cerca de 0,1 a cerca de 5% do peso.

Lisboa, 24 de Agosto de 2011

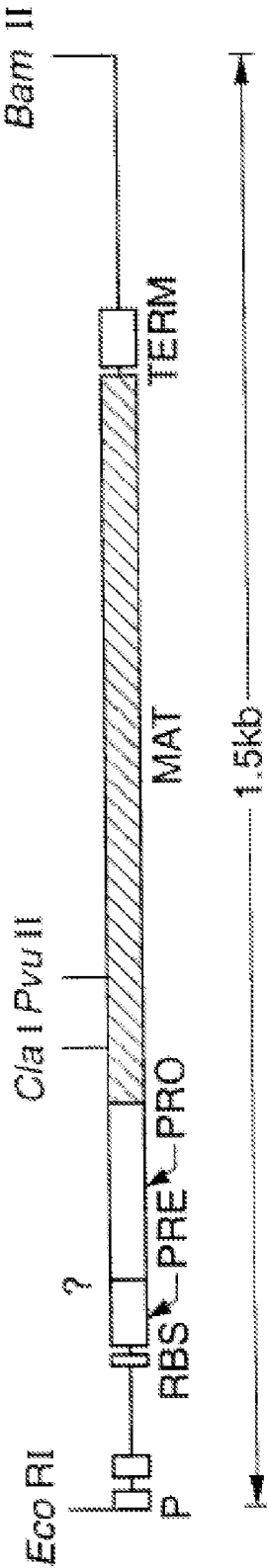


FIG. 1A



```

549 Ala Gly Gly Ala Ser Met Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Asn Asp 60 Asp
GCA GCC GGA GCC AGC ATG GTT CCT TCT TCT GAA ACA AAT CCT TTC CAA GAC AAC AAC TCT CAC GGA ACT His Gly Thr His Val Ala
GCT GTT GCC

624 Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser 90 Ser
GGC ACA GTT GCG GCT CTT AAT AAC TCA ATC GGT GTA TTA GGC GTT GCG CCA AGC GCA TCA CTT TAC Tyr Ala Val Lys
GCT GTA AAA

699 Val Leu Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Thr Ile Ile Asn Gly Ile Glu Trp Ala Ile Ala Asn Asn Met
GTT CTC GGT GCT GAC GGT TCC GGC CAA TAC AGC TGG ATC ATC AAC GGA ATC GAG TGG GCG ATC GCA AAC AAT ATG

774 Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro Ser Gly Ser Ala Ala Leu Lys Ala Val Asp Lys Ala Val Ala
GAC GTT ATT AAC ATG ATG AGC CTC GGC GGA CCT TCT TCT GGT TCT TCT GCT TTA AAA GCG GCA GTT GAT AAA GCC GTT GCA

849 Ser Gly Val Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Thr Ser Gly Thr Ser Ser Thr Thr Val Gly Tyr Pro Gly
TCC GGC GTC GTA GTC GTT GCG GCA GCC GGT AAC AAC GAA GGC ACT TCC GGC AGC TCA AGC ACA GTG GGC TAC CCT GGT

924 Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala Val Gly Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly Pro Gly
AAA TAC CCT TCT GTC ATT GCA GTA GGC CCT GTT GAC AGC AGC CAA AGA GCA TCT TTC TCA AGC GTA GGA CCT

999 Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr Thr Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly
GAG CTT GAT GTC ATG GCA CCT GGC GTA TCT ATC CAA AGC ACG CTT CCT GGA AAC AAA TAC GCG GCG TAC AAC GGT

1074 Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Val Ala Gly Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Trp Thr Asn Thr
ACG TCA ATG GCA TCT CCG CAC GTT GCC GGA GCG GCT GCT TTG ATT CTT TCT AAG CAC CCG AAC TCG ACA AAC ACT

```

FIG._1B-2

[illegible]

FIG. 1B-3

FIG. 1B-1

RESÍDUOS CONSERVADOS EM SUBTILISINAS DE

Bacillus amyloliquefaciens

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

FIG._2

COMPARAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE SUBTILISINA DE:

B. amyloliquefaciens

B. subtilis

B. licheniformis

B. lentus

	10	20	30	
01	A Q S S V P Y G V S Q I K A P A L H S Q G Y T G S N V K V A V I D S S G I D S S S H P			
	A Q S S V P Y G I S Q I K A P A L H S Q G Y T G S N V K V A V I D S S G I D S S S H P			
	A Q T V P Y G I P L I K A D K V Q A Q G F K G A N V K V A V L D T G I Q A S H P			
	A Q S V P P W G I S R V Q A P A A H N R G L T G S G V K V A V L D T G I S T * H P			
	50	60	70	
41	D L K V A G G A S M V P S E T N P F Q D D N N S H G T H V A G T V A A L N N S I G			
	D L N V R G G A S F V P S E T N P Y Q D D G S S H G T H V A G T V A A L N N S I G			
	D L N V V G G A S F V A G E A Y N * T D D G N G H G T H V A G T V A A L D N T G			
	D L N I R G G A S F V P G E * P S T Q D D G N G H G T H V A G T V A A L N N S I G			
	90	100	110	
81	V L G V A P S A S L Y A V K V L G A D G S S G Q Y S W I I N G I E W A I A N N M D			
	V L G V S P S A S L Y A V K V L D S S G Q Y S W I I N G I E W A I S N N M D			
	V L G V A P S V S L Y A V K V L N S S G S Y S G I V S G I E W A T N N G M D			
	V L G V A P S A E L Y A V K V L G A S S G S Y S S I A Q G L E W A G N N G M H			
	130	140	150	
121	V I N M S L G G P S G S A A L K A A V D K A V A S S G V V V A A A A G N E G T S G			
	V I N M S L G G P T G S T A L K T V V D K A V S S G I V V A A A A A G N E G S S G			
	V I N M S L G G A S G S T A M K Q A V D N A Y A R G V V V A A A A A G N S G S G			
	V A N L S L G S P S P S A T L E Q A V N S A T S R G V L V V A A A A A G N S G A G S			

FIG. 3A

161	S	T	V	G	Y	P	G	K	Y	P	S	V	I	A	V	G	A	V	D	S	N	Q	R	A	S	F	S	S	V	G	P	E	L	D	V	M	A
162	S	T	V	G	Y	P	G	K	Y	P	S	V	I	A	V	G	A	V	D	S	N	Q	R	A	S	F	S	S	V	G	P	E	L	D	V	M	A
163	S	T	V	G	Y	P	G	K	Y	P	S	V	I	A	V	G	A	V	D	S	N	Q	R	A	S	F	S	S	V	G	P	E	L	D	V	M	A
164	S	T	V	G	Y	P	G	K	Y	P	S	V	I	A	V	G	A	V	D	S	N	Q	R	A	S	F	S	S	V	G	P	E	L	D	V	M	A
165	S	T	V	G	Y	P	G	K	Y	P	S	V	I	A	V	G	A	V	D	S	N	Q	R	A	S	F	S	S	V	G	P	E	L	D	V	M	A
166	S	T	V	G	Y	P	G	K	Y	P	S	V	I	A	V	G	A	V	D	S	N	Q	R	A	S	F	S	S	V	G	P	E	L	D	V	M	A
167	S	T	V	G	Y	P	G	K	Y	P	S	V	I	A	V	G	A	V	D	S	N	Q	R	A	S	F	S	S	V	G	P	E	L	D	V	M	A
168	S	T	V	G	Y	P	G	K	Y	P	S	V	I	A	V	G	A	V	D	S	N	Q	R	A	S	F	S	S	V	G	P	E	L	D	V	M	A
169	S	T	V	G	Y	P	G	K	Y	P	S	V	I	A	V	G	A	V	D	S	N	Q	R	A	S	F	S	S	V	G	P	E	L	D	V	M	A
170	S	T	V	G	Y	P	G	K	Y	P	S	V	I	A	V	G	A	V	D	S	N	Q	R	A	S	F	S	S	V	G	P	E	L	D	V	M	A
171	S	T	V	G	Y	P	G	K	Y	P	S	V	I	A	V	G	A	V	D	S	N	Q	R	A	S	F	S	S	V	G	P	E	L	D	V	M	A
172	S	T	V	G	Y	P	G	K	Y	P	S	V	I	A	V	G	A	V	D	S	N	Q	R	A	S	F	S	S	V	G	P	E	L	D	V	M	A
173	S	T	V	G	Y	P	G	K	Y	P	S	V	I	A	V	G	A	V	D	S	N	Q	R	A	S	F	S	S	V	G	P	E	L	D	V	M	A
174	S	T	V	G	Y	P	G	K	Y	P	S	V	I	A	V	G	A	V	D	S	N	Q	R	A	S	F	S	S	V	G	P	E	L	D	V	M	A
175	S	T	V	G	Y	P	G	K	Y	P	S	V	I	A	V	G	A	V	D	S	N	Q	R	A	S	F	S	S	V	G	P	E	L	D	V	M	A
176	S	T	V	G	Y	P	G	K	Y	P	S	V	I	A	V	G	A	V	D	S	N	Q	R	A	S	F	S	S	V	G	P	E	L	D	V	M	A
177	S	T	V	G	Y	P	G	K	Y	P	S	V	I	A	V	G	A	V	D	S	N	Q	R	A	S	F	S	S	V	G	P	E	L	D	V	M	A</

201	V	S	I	Q	S	T	L	P	G	N	K	Y	G	A	Y	N	G	T	S	M	A	S	P	H	V	A	G	A	A	L	I	L	S	K	H	P	N
202	V	S	I	Q	S	T	L	P	G	N	K	Y	G	A	Y	N	G	T	S	M	A	S	P	H	V	A	G	A	A	L	I	L	S	K	H	P	N
203	V	S	I	Q	S	T	L	P	G	N	K	Y	G	A	Y	N	G	T	S	M	A	S	P	H	V	A	G	A	A	L	I	L	S	K	H	P	N
204	V	S	I	Q	S	T	L	P	G	N	K	Y	G	A	Y	N	G	T	S	M	A	S	P	H	V	A	G	A	A	L	I	L	S	K	H	P	N
205	V	S	I	Q	S	T	L	P	G	N	K	Y	G	A	Y	N	G	T	S	M	A	S	P	H	V	A	G	A	A	L	I	L	S	K	H	P	N
206	V	S	I	Q	S	T	L	P	G	N	K	Y	G	A	Y	N	G	T	S	M	A	S	P	H	V	A	G	A	A	L	I	L	S	K	H	P	N
207	V	S	I	Q	S	T	L	P	G	N	K	Y	G	A	Y	N	G	T	S	M	A	S	P	H	V	A	G	A	A	L	I	L	S	K	H	P	N
208	V	S	I	Q	S	T	L	P	G	N	K	Y	G	A	Y	N	G	T	S	M	A	S	P	H	V	A	G	A	A	L	I	L	S	K	H	P	N
209	V	S	I	Q	S	T	L	P	G	N	K	Y	G	A	Y	N	G	T	S	M	A	S	P	H	V	A	G	A	A	L	I	L	S	K	H	P	N
210	V	S	I	Q	S	T	L	P	G	N	K	Y	G	A	Y	N	G	T	S	M	A	S	P	H	V	A	G	A	A	L	I	L	S	K	H	P	N
211	V	S	I	Q	S	T	L	P	G	N	K	Y	G	A	Y	N	G	T	S	M	A	S	P	H	V	A	G	A	A	L	I	L	S	K	H	P	N
212	V	S	I	Q	S	T	L	P	G	N	K	Y	G	A	Y	N	G	T	S	M	A	S	P	H	V	A	G	A	A	L	I	L	S	K	H	P	N
213	V	S	I	Q	S	T	L	P	G	N	K	Y	G	A	Y	N	G	T	S	M	A	S	P	H	V	A	G	A	A	L	I	L	S	K	H	P	N
214	V	S	I	Q	S	T	L	P	G	N	K	Y	G	A	Y	N	G	T	S	M	A	S	P	H	V	A	G	A	A	L	I	L	S	K	H	P	N
215	V	S	I	Q	S	T	L	P	G	N	K	Y	G	A	Y	N	G	T	S	M	A	S	P	H	V	A	G	A	A	L	I	L	S	K	H	P	N
216	V	S	I	Q	S	T	L	P	G	N	K	Y	G	A	Y	N	G	T	S	M	A	S	P	H	V	A	G	A	A	L	I	L	S	K	H	P	N
217	V	S	I	Q	S	T	L	P	G	N	K	Y	G	A	Y	N	G	T	S	M	A	S	P	H	V	A	G	A	A	L	I	L	S	K	H	P	N</

[illegible]

FIG. 3B

FIG. 3

FIG. 3A

FIG. 38

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- * WO 8100345 A
- * WO 8523221 A
- * EP 328229 A
- * WO 8906276 A
- * US RE34606 E
- * US 5204015 A
- * US 5185258 A
- * US 5700676 A
- * US 5801038 A
- * US 5763257 A
- * EP 0326299 A
- * WO 8906278 A
- * EP 0251446 A
- * US 5182204 A
- * US 5264366 A
- * US 4404128 A, Barry J. Anderson
- * US 4261868 A, Jiri Flora
- * EP 216034 A
- * EP 134267 A
- * US 4533359 A
- * EP 344259 A
- * US 60066796 B
- * WO 98955111 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- * Stroud, R. *Sci. Amer.*, vol. 131, 74-88
- * Kraut, J. *Annu. Rev. Biochem.*, 1977, vol. 46, 331-358
- * Markland, F.S. et al. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1983, vol. 354, 1537-1540
- * Robertus, J.D. et al. *Biochemistry*, 1972, vol. 11, 2439-2449
- * Robertus, J.D. et al. *J. Biol. Chem.*, 1976, vol. 251, 1097-1103
- * Svendsen, B. *Carsberg Res. Commun.*, 1976, vol. 41, 237-281
- * Stauffer, D.C. et al. *J. Biol. Chem.*, 1965, vol. 244, 5333-5338
- * Wells ; Estell. *TIBS*, 1988, vol. 13, 291-297
- * Dale, M.W. *Molecular Genetics of Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd, 1969
- * Siezen et al. *Protein Eng.*, 1991, vol. 4 (7), 719-737
- * Microbial Proteinases. K. M. Kalisz. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 1988