



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

(11) BR 112012014082-5 B1



(22) Data do Depósito: 09/12/2010

(45) Data de Concessão: 15/12/2020

(54) Título: VARIANTE DE PROTEASE ISOLADA E SEU MÉTODO DE PRODUÇÃO, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA RECOMBINANTE, COMPOSIÇÃO E MÉTODO PARA LIMPEZA DE UM ITEM OU DE UMA SUPERFÍCIE EM NECESSIDADE DE LIMPEZA

(51) Int.Cl.: C12N 9/54; C12N 15/09; C11D 3/386; C07K 1/00.

(30) Prioridade Unionista: 09/12/2009 US 61/285,127; 12/10/2010 US 61/392,373.

(73) Titular(es): DANISCO US INC..

(72) Inventor(es): JOSHUA ROY BASLER; LUIS GUSTAVO CASCAO-PEREIRA; DAVID A. ESTELL; JAMES T. KELLIS; ALEXANDER PISARCHIK; AYROOKARAN J. POULOSE; DANIEL TORRES-PAZMINO.

(86) Pedido PCT: PCT US2010059628 de 09/12/2010

(87) Publicação PCT: WO 2011/072099 de 16/06/2011

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

(57) Resumo: VARIANTES DE PROTEASE E SEU MÉTODO DE PRODUÇÃO, ÁCIDO NUCLEICO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, COMPOSIÇÃO, BEM COMO MÉTODO PARA LIMPEZA DE UM ITEM OU UMA SUPERFÍCIE. A presente invenção refere-se a variantes de protease, a composições que compreendem variantes de protease, e a métodos de uso de tais variantes de protease e composições.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
"VARIANTE DE PROTEASE ISOLADA E SEU MÉTODO DE PRODUÇÃO, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA RECOMBINANTE, COMPOSIÇÃO E MÉTODO PARA LIMPEZA DE UM ITEM OU DE UMA SUPERFÍCIE EM NECESSIDADE DE LIMPEZA".

REFERÊNCIAS CRUZADAS A PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica a prioridade e o benefício do pedido de patente provisório U.S. nº 61/285.127, depositado em 9 de dezembro de 2009, e o pedido de patente provisório U.S. nº 61/392.373, depositado em 12 de outubro de 2010, a descrição de cada um dos quais está aqui incorporada a título de referência, em sua totalidade, para todos os propósitos.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A presente invenção refere-se a variantes de protease, composições que compreendem variantes de protease, e métodos de uso de tais variantes de protease e composições das mesmas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[003] Embora as proteases sejam conhecidas há muito tempo na técnica de enzimas industriais, ainda há uma necessidade por proteases manipuladas que sejam adequadas para condições e usos específicos. A presente invenção satisfaz esta e outras necessidades.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[004] Em um primeiro aspecto, a invenção apresenta uma variante de protease isolada de uma enzima protease original, a variante de protease tendo atividade proteolítica e compreendendo uma sequência de aminoácidos que compreende uma alteração em uma ou mais posições de aminoácido que correspondem às posições de aminoácido da SEQ ID nº 2 selecionadas do grupo que consiste nas posições 24, 53, 78, 97, 101, 128, e 217, em que a pelo menos uma alteração é in-

dependentemente (i) uma inserção de um ou mais resíduos de aminoácido à montante ou à jusante do resíduo de aminoácido que ocupa a posição, (ii) uma deleção do resíduo de aminoácido que ocupa a posição, ou (iii) uma substituição do resíduo de aminoácido que ocupa a posição por um resíduo de aminoácido diferente, sendo que cada posição de aminoácido é numerada por correspondência a uma posição de aminoácido na sequência de aminoácidos da BPN' da protease subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* apresentada na SEQ ID nº 2, conforme determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante com a SEQ ID nº 2.

[005] Em um segundo aspecto, a invenção apresenta uma variante de protease isolada de uma protease original, sendo que a variante compreende uma sequência de aminoácidos que compreende três substituições de aminoácidos selecionadas do grupo consistindo em X024G/R, X053G, X078N, X101N, X128A/S, e X217L/Q, sendo que a variante tem atividade proteolítica e cada posição de aminoácido da variante é numerada por correspondência a uma posição de aminoácido na sequência de aminoácidos da SEQ ID nº 2 conforme determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante com a SEQ ID nº 2.

[006] Em um terceiro aspecto, a invenção apresenta um polipeptídeo isolado que tem atividade de protease, sendo que o dito polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 85% de identidade de sequência com uma sequência de polipeptídeo selecionada do grupo que consiste em:

a) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+A088T+N109G+A116T+ G131H+N243V+L257G;

b) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+S033T+N076D;

c) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128S+Y217Q+

S009T+N109G+ K141R+N243V;

d) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+
S162G+K256R;

e) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+
N109G+A116T;

f) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+
N109G+L257G;

g) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+
S162G+L257G;

h) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+
N061G+N109G+N243V;

i) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128S+Y217Q+
N109G+N243V+S248A;

j) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128S+Y217Q+
S033T+N076D+N109G+

N218S+N243V+S248N+K256R;

k) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+
N109G+A116T+N243V+ K256R;

l) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+
A088T+N109G+A116T+ G131H+N243V;

m) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+
A088T+N109G;

n) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+
N109G+N243V;

o) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+
T158S+L257G;

p) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+
N061S+N109G+N243V;

q) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128S+Y217Q+
P040A+N109G+N243V+

S248N+K256R;

r) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128S+Y217Q+
S009T+S018T+Y021N+

N109G+K141R;

s) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+
A088T+N109G+A116T+

T158S+N243V+K256R;

t) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+
A088T+N109G+A116T+

T158S+N218S+L257G;

u) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+
N109G+K256R;

v) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128S+Y217Q+
N109G+N243V+K256R;

w) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+
S063G+K256R;

x) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+
S063G+N109G;

y) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128S+Y217Q+
S063G;

z) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+
S063G+N076D;

aa) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128S+Y217Q+
S033T+N076D+N218S;

bb) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+
N076D+N218S; e

cc) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q,
sendo que cada posição de aminoácido da variante é numerado por
correspondência com uma posição de aminoácido da sequência da
SEQ ID nº 2.

[007] Em um quarto aspecto, a invenção apresenta um polipeptídeo isolado que tem atividade da protease, selecionado do grupo que consiste em: (a) um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade de sequência com a sequência de polipeptídeo da SEQ ID nº 6; (b) um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo que hibridiza pelo menos sob condições de alta estringência com (i) a sequência de polinucleotídeo da SEQ ID nº 5 ou (ii) uma sequência de polinucleotídeo complementar de (i); e (c) um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo que compreende uma sequência de polinucleotídeo que tem pelo menos 95% de identidade de sequência à sequência de polinucleotídeo da SEQ ID nº 5.

[008] Em um quinto aspecto, a invenção apresenta uma variante de protease isolada de uma protease original, sendo que: (a) a variante compreende uma sequência de aminoácidos que tem não mais que 20, 15, ou 10 alterações em relação à protease original, sendo que (i) as alterações são independentemente selecionadas a partir de uma inserção, uma deleção, ou uma substituição, e (ii) as alterações incluem uma substituição de glicina nas posições 24 e 53, uma substituição de asparagina nas posições 78 e 101, uma substituição de alanina ou serina na posição 128, e uma substituição de glutamina na posição 217, (b) a protease original tem pelo menos 90% de identidade de sequência à SEQ. ID NO:2, (c) a sequência de aminoácidos da SEQ ID nº 2 é usada para determinar a numeração da posição; e (d) a variante tem atividade proteolítica aumentada em relação à protease original, sendo que cada posição de aminoácido é numerada por correspondência a uma posição de aminoácido da sequência da SEQ ID nº 2.

[009] Em um sexto aspecto, a invenção apresenta uma variante de protease isolada de uma protease original, em que (a) a variante

compreende uma sequência de aminoácidos (i) que tem pelo menos 85% de identidade à sequência da SEQ ID nº 2 e (ii) que compreende uma substituição da glicina nas posições 24 e 53, uma substituição de asparagina nas posições 78 e 101, uma substituição de alanina ou serina na posição 128, e uma substituição de glutamina na posição 217; (b) a protease original tem pelo menos 85% de identidade de sequência à SEQ. ID NO:2; (c) cada posição de aminoácido da variante é numerado por correspondência com uma posição do aminoácido da sequência da SEQ ID nº 2; e (d) a variante tem atividade proteolítica aumentada em relação à protease original.

[0010] Em outro aspecto, a invenção fornece um ácido nucleico isolado ou recombinante que compreende uma sequência de polinucleotídeo que codifica pelo menos uma variante de polipeptídeo (por exemplo, variante de protease) da invenção, ou uma sequência de polinucleotídeo complementar da mesma.

[0011] Em outro aspecto, a invenção fornece um ácido nucleico isolado ou recombinante que compreende uma sequência de polinucleotídeo que tem pelo menos 80% de identidade de sequência à sequência de polinucleotídeo apresentada na SEQ ID nº 3 ou SEQ ID nº 5, ou uma sequência de polinucleotídeo complementar da mesma.

[0012] Em outro aspecto, a invenção fornece um vetor de expressão que compreende pelo menos um ácido nucleico da invenção. Também é fornecida uma célula hospedeira ou cultura celular recombinante que compreende pelo menos um ácido nucleico ou um vetor de expressão da invenção.

[0013] Em outro aspecto, a invenção fornece um método de produzir pelo menos um polipeptídeo (por exemplo, variante de protease) da invenção, o método compreendendo: (a) introduzir um vetor de expressão recombinante da invenção que codifica um polipeptídeo (por exemplo, variante de protease) da invenção em uma população de cé-

lulas; (b) cultivar as células em um meio de cultura sob condições propícias para produzir o polipeptídeo (por exemplo, variante de protease) codificado pelo vetor de expressão; e opcionalmente (c) isolar ou recuperar a variante a partir das células ou a partir do meio de cultura.

[0014] Em outro aspecto, a invenção fornece uma composição que compreende pelo menos uma variante de protease ou polipeptídeo da invenção, opcionalmente em combinação com outra enzima. Tal composição pode compreender um ingrediente auxiliar, como, por exemplo, um tensoativo e/ou builder, ou um veículo. Tal composição pode ser uma composição de limpeza ou uma composição detergente e pode ser útil nos métodos de limpeza descritos em outro local no presente documento. Tal composição pode ser um produto para cuidados de tecidos e da casa ou tal composição pode não ser um produto para cuidados de tecidos e da casa.

[0015] Em outro aspecto, a invenção fornece um método para limpar um item, objeto, ou superfície que precisa de limpeza, o método compreendendo colocar o item, objeto, ou superfície em contato com um polipeptídeo ou variante de protease da invenção ou uma composição da invenção, e opcionalmente enxaguar o item, objeto, ou superfície com água.

[0016] Em outro aspecto, a invenção fornece um método para limpar um item ou superfície (por exemplo, superfície dura), o método compreendendo colocar pelo menos uma porção do item ou superfície (por exemplo, superfície dura) a ser limpa em contato com um polipeptídeo ou variante de protease da invenção ou uma composição da invenção por um tempo suficiente e/ou sob condições suficientes ou eficazes para limpar ou lavar o item ou superfície (por exemplo, superfície dura) até um grau desejado e, opcionalmente, compreendendo enxaguar o item ou superfície (por exemplo, superfície dura) com água.

[0017] Outros aspectos da invenção são descritos a seguir.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0018] A figura 1 fornece um mapa plasmidial de pHPLT-BPN'-v3.

[0019] A figura 2 fornece um mapa plasmidial de pHPLT-BPN'-v3+S78N.

[0020] A figura 3 fornece um mapa plasmidial de pHPLT-BPN' parcial opt.

[0021] A figura 4 fornece um mapa plasmidial de pHPLT-BPN'-v36.

[0022] A figura 5 fornece um alinhamento das proteases subtilisina de referência maduras, incluindo: BPN' (SEQ ID n° 2) e GG36 (SEQ ID n° 755). Cada posição de aminoácido de cada variante de protease aqui descrita, incluindo cada variante de protease para água fria, é numerada de acordo com a numeração da posição de aminoácido correspondente na sequência de aminoácidos de BPN' da protease subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* (SEQ ID n° 2), conforme mostrado na figura 5, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos de BPN' da protease subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. Desta forma, exceto onde especificado em contrário, as posições da substituição são dadas em relação a BPN'.

[0023] A figura 6 fornece um mapa de pHPLT-GG36.

[0024] A figura 7 fornece um mapa de pRA68.

[0025] A figura 8 fornece um mapa de pRA96.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Definições

[0026] Exceto onde indicado em contrário, a prática da presente invenção envolve técnicas convencionais comumente usadas em biologia molecular, manipulação de proteínas, microbiologia e DNA recombinante, que estão dentro da perícia na técnica. Estas técnicas são conhecidas daqueles versados na técnica e são descritas em vários

textos e trabalhos de referência bem conhecidos daqueles versados na técnica. Todas as patentes, pedidos de patente, artigos e publicações aqui mencionadas, tanto anteriormente quanto *mais* adiante *neste* documento, estão aqui expressamente incorporadas, a título de referência.

[0027] A menos que definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos usados na presente invenção têm o mesmo significado, conforme comumente compreendido pelo versado na técnica a qual a invenção pertence. Muitos dicionários técnicos são conhecidos daqueles versados na técnica. Embora quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes aos descritos aqui possam ser usados na prática da presente invenção, alguns métodos e materiais adequados são descritos aqui. Consequentemente, os termos definidos imediatamente abaixo são mais completamente descritos por referência ao relatório descritivo como um todo. Os intervalos numéricos incluem os números que definem o intervalo. Exceto onde indicado em contrário, os ácidos nucleicos são escritos da esquerda para a direita na orientação 5' para 3'; as sequências de aminoácidos são escritas da esquerda para a direita na orientação amino para carbóxi, respectivamente. Deve ser compreendido que esta invenção não é limitada à metodologia, aos protocolos, e reagentes particulares descritos, uma vez que estes podem variar dependendo do contexto em que eles são usados pelos versados na técnica.

[0028] A prática da presente invenção emprega, exceto onde indicado em contrário, técnicas convencionais de purificação de proteínas, biologia molecular, microbiologia, técnicas de DNA recombinante e sequenciamento de proteínas, que estão no âmbito do conhecimento dos versados na técnica.

[0029] Além disso, os cabeçalhos aqui fornecidos não são limitações dos vários aspectos da invenção que podem ser tidos por re-

ferência ao relatório descritivo como um todo. Consequentemente, os termos definidos imediatamente abaixo são mais completamente definidos por referência ao relatório descritivo como um todo. Contudo, de modo a facilitar o entendimento da invenção, inúmeros termos são definidos abaixo.

[0030] Para uso na presente invenção, os termos "protease" e "proteinase" referem-se a uma proteína enzimática que tem a capacidade de decompor outras proteínas. Uma protease tem a capacidade de conduzir "proteólise," que começa o catabolismo proteico por hidrólise das ligações peptídicas que unem os aminoácidos em uma cadeia peptídica ou polipeptídica que forma a proteína. Esta atividade de uma protease como uma enzima que digere proteínas é chamada de "atividade proteolítica." Existem muitos procedimentos bem conhecidos para medir a atividade proteolítica (vide, por exemplo, Kalisz, "Microbial Proteinases", *In: Fiechter (ed.), Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology (1988)*). Por exemplo, a atividade proteolítica pode ser confirmada por testes comparativos que analisam a capacidade da respectiva protease de hidrolisar um substrato comercial. Exemplos de substratos úteis na análise da atividade de protease ou proteolítica, incluem, mas não se limitam a, dimetil caseína (Sigma C-9801), colágeno bovino (Sigma C-9879), elastina bovina (Sigma E-1625), e queratina bovina (ICN Biomedical 902111). Testes colorimétricos que usam estes substratos são bem conhecidos na técnica (vide, por exemplo, WO 99/34011 e patente US nº 6.376.450, ambos estão aqui incorporados a título de referência). O teste de pNA (vide, por exemplo, Del Mar et al., *Anal. Biochem.* 99:316-320 [1979]) também é usado para determinar a concentração de enzimas ativas para frações coletadas durante a eluição gradiente. Este teste mede a taxa na qual a p-nitroanilina é liberada conforme a enzima hidrolisa o substrato sintético solúvel, succinil-alanina-alanina-prolina-fenilalanina-p-nitroanilida

(suc-AAPF-pNA). A taxa de produção da cor amarela a partir da reação de hidrólise é medida a 410 nm em um espectrofotômetro e é proporcional à concentração de enzimas ativas. Além disso, as medições de absorbância a 280 nanômetros (nm) podem ser usadas para determinar a concentração total de proteínas. A razão enzimas ativas/proteínas totais indica a pureza da enzima.

[0031] Para uso na presente invenção, o termo "subtilisina" refere-se a qualquer membro da família de serina proteases S8, conforme descrito em MEROPS - The Peptidase Data base (vide Rawlings et al., MEROPS: the peptidase database, Nucl. Acids Res., número da base de dados 34, D270-272 [2006]). Conforme descrito neste documento, a família de peptidases S8 contém a subtilisina de serina endopeptidase e seus homólogos (Rawlings e Barrett, Biochem. J. 290:205-218, [1993]). A família S8, também conhecida como a família da subtilase, é a segunda maior família de serina peptidases. As estruturas terciárias para vários membros da família S8 foram agora determinadas. Uma estrutura de proteína S8 típica consiste em três camadas com uma folha β com sete fitas entre duas camadas de hélices. A subtilisina (S08.001) é a estrutura tipo para o clã SB (SB). Apesar da estrutura diferente, os sítios ativos da subtilisina e quimotripsina (S01.001) podem ser sobrepostos, o que sugere que a similaridade é o resultado de evolução convergente e não divergente.

[0032] Uma "variante de protease" (ou "protease variante") pode se referir a uma protease que difere na sua sequência de aminoácidos a partir da sequência de aminoácidos de uma protease de referência ou protease original em pelo menos um resíduo de aminoácido. Uma protease original ou protease de referência não precisa ser uma protease selvagem, mas pode ser uma variante de uma protease selvagem. A protease de referência ou original não se limita a qualquer sequência de aminoácidos particular. Uma variante de protease de

uma protease de referência ou original pode compreender uma sequência de aminoácidos compreendendo pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade à sequência de aminoácidos da protease original ou protease de referência e pelo menos uma substituição, inserção, ou deleção de aminoácido em relação à sequência de aminoácidos da protease original ou protease de referência. Em um aspecto, a invenção inclui uma variante de uma serina protease, sendo que a variante tem pelo menos uma mutação em relação à serina protease. Em um aspecto, a presente invenção inclui uma "variante de BPN" (ou "variante de subtilisina BPN") que compreende uma sequência de aminoácidos compreendendo uma ou mais mutações em relação à sequência de BPN' madura da SEQ ID n° 2.

[0033] Uma protease original ou protease de referência pode ser, mas não se limita, por exemplo, a uma protease conhecida (incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a BPN') ou uma protease disponível para comercialização ou uma variante da protease disponível para comercialização. Uma protease original ou protease de referência pode ser em si uma variante de uma protease conhecida ou disponível para comercialização. Uma variante de protease pode ser derivada de uma protease original que está disponível para comercialização ou é uma variante desta protease original disponível para comercialização. As proteases comercialmente disponíveis, incluem, mas não se limitam, por exemplo, a proteases comercializadas sob as marcas registradas SAVINASE®, POLARZYME®, KANNASE®, LIQUANASE®, LIQUANASE ULTRA®, SAVINASE ULTRA®, OVOZYME®, (por Novozymes A/S); MAXACAL®, PROPERASE®, PURAFECT®, FN3®, FN4® e PURAFECT OXP®, PURAFAST™, PURAFECT® PRIME, PURAMAX® (por Danisco US Inc., anteriormente Genencor International, Inc.); e aquelas disponíveis junto à Henkel/Kemira, especificamen-

te BLAP (sequência de aminoácidos mostrada na figura 29 de US 5.352.604 com as seguintes mutações S99D+S101R+S103A+V104I+G159S, deste ponto em diante no presente documento chamadas de BLAP) e BLAP X (BLAP com S3T+V4I+V205I).

[0034] Para uso na presente invenção, uma "protease para água fria" é uma enzima que exibe um ou mais dos seguintes quatro critérios: (a) um índice de desempenho de pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de 1,1 a cerca de 10, de 1,1 a cerca de 8, ou mesmo de 1,1 a cerca de 5 de SLT a um pH 8 e 16°C (60°F) quando comparada com PURAFECT® Prime (SEQ ID n° 2 com a substituição de aminoácido Y217L), conforme definido no "método de teste" descrito neste documento na parte I, exemplo 1; (b) um índice de desempenho de pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de 1,3 a cerca de 10, de 1,3 a cerca de 8, ou mesmo de 1,3 a cerca de 5 de SLT a um pH 8 e 16°C (60°F) quando comparada a BPN' (SEQ ID n° 2), conforme definido no "método de teste" descrito neste documento na parte I, exemplo 1; (c) um índice de desempenho de pelo menos 0,9, pelo menos 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de 0,9 a cerca de 10, de 0,9 a cerca de 8, ou mesmo de 0,9 a cerca de 5 de SLT a um pH 8 e a 16°C (60°F) quando comparada a BPN'-v3 (SEQ ID n° 4), conforme definido no "método de teste" descrito neste documento na parte I, exemplo 1; e/ou (d) um índice de desempenho de pelo menos 0,9, pelo menos 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de 0,9 a cerca de 10, de 0,9 a cerca de 8, de 0,9 a cerca de

5, de 1,0 a cerca de 10, de 1,0 a cerca de 8, ou mesmo de 1,0 a cerca de 5 de SLT a um de pH 8 e a 16°C (60°F) quando comparada a BPN'-v36 (SEQ ID n° 6), conforme definido no "método de teste" descrito neste documento na parte I, exemplo 1.

[0035] Algumas proteases para água fria adequadas são derivadas de subtilisinas, particularmente as derivadas da subtilisina BPN' (SEQ ID n° 2). Uma protease para água fria pode ser uma variante de BPN' que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID n° 2 (por exemplo, "variante de BPN'" ou "variante de subtilisina BPN'"). Algumas proteases para água fria compreendem uma ou mais das substituições de aminoácido aqui descritas.

[0036] Para uso na presente invenção, o gênero *Bacillus* inclui todas as espécies do gênero *Bacillus*, conforme é de conhecimento dos versados na técnica, incluindo, mas não se limitando a *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. clausii*, *B. halodurans*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus*, e *B. thuringiensis*. É reconhecido que o gênero *Bacillus* continua a sofrer reorganização taxonômica. Desta forma, pretende-se que o gênero inclua espécie que foram reclassificadas, incluindo, mas não se limitando a organismos tais como *B. stearothermophilus*, que agora é chamado "*GeoBacillus stearothermophilus*." A produção de endosporos resistentes na presença de oxigênio é considerada a característica que define o gênero *Bacillus*, embora esta característica também se aplique aos recentemente nomeados *alicyclobacillus*, *amphibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Anoxybacillus*, *Brevibacillus*, *Filobacillus*, *Gracilibacillus*, *Halobacillus*, *Paenibacillus*, *Salibacillus*, *Thermobacillus*, *Ureibacillus*, e *Virgibacillus*.

[0037] Os termos "polinucleotídeo" e "ácido nucleico," que são usados de maneira intercambiável na presente invenção, referem-se a um polímero com qualquer comprimento de monômeros de nucleotí-

deo ligados de modo covalente em uma cadeia. O DNA (ácido desoxirribonucleico), um polinucleotídeo que compreende desoxirribonucleotídeos, e RNA (ácido ribonucleico), um polímero de ribonucleotídeos, são exemplos de polinucleotídeos ou ácidos nucleicos que possuem função biológica distinta. Os polinucleotídeos ou ácidos nucleicos incluem, mas não se limitam a, DNA de fita simples, dupla, ou tripla, DNA genômico, cDNA, RNA, híbrido de DNA-RNA, ou um polímero que compreende bases purina e pirimidina, ou outras bases de nucleotídeo naturais, modificadas quimicamente, bioquimicamente, não naturais ou derivatizadas. A seguir estão exemplos não limitadores de polinucleotídeos: genes, fragmentos de gene, fragmentos cromossômicos, sinalizador(es) de sequência expresso(s) (EST(s)), éxons, íntrons, RNA mensageiro (mRNA), RNA de transferência (tRNA), RNA ribossomal (rRNA), ribozimas, DNA complementar (cDNA), polinucleotídeos recombinantes, polinucleotídeos ramificados, plasmídios, vetores, DNA isolado de qualquer sequência, RNA isolado de qualquer sequência, sondas de ácido nucleico, e iniciadores. Alguns polinucleotídeos compreendem nucleotídeos modificados, como, por exemplo, nucleotídeos metilados e análogos de nucleotídeo, uracila, outros açúcares e grupos de ligação, como, por exemplo, fluororibose e tioato, e ramificações de nucleotídeo. Uma sequência de nucleotídeos pode ser interrompida por componentes não nucleotídeo.

[0038] Para uso na presente invenção, o termo "vetor" refere-se a um construto de ácido nucleico ou construto de polinucleotídeo usado para introduzir ou transferir ácido nucleico(s) ou polinucleotídeo(s) para dentro de uma célula ou tecido alvo. Um vetor é usado tipicamente para introduzir DNA estranho em outra célula ou tecido. Um vetor compreende geralmente uma sequência de DNA que é um transgene e uma sequência de polinucleotídeo maior que serve como a "cadeia principal" do vetor. O vetor serve tipicamente para transferir infor-

mações genéticas, como, por exemplo, o transgene inserido, até uma célula ou tecido alvo de modo a isolar, multiplicar ou expressar o inserto na célula ou tecido alvo. Os vetores incluem plasmídios, vetores de clonagem, bacteriófagos, vírus (por exemplo, vetor viral), cosmídios, vetores de expressão, vetores de transporte, cassetes, e similares. Um vetor inclui tipicamente uma origem de replicação, um sítio de multiclonagem, e um marcador selecionável. O processo de inserção de um vetor em uma célula alvo é chamado tipicamente de transformação em células bacterianas e de levedura e como transfecção em células de mamífero. A presente invenção inclui um vetor que compreende uma sequência de DNA que codifica uma variante de protease (por exemplo, variante de protease precursora ou madura) que é operacionalmente ligada a uma pró-sequência adequada (por exemplo, sequência secretória, de peptídeo de sinal, etc.) capaz de efetuar a expressão da sequência de DNA em um hospedeiro adequado.

[0039] Para uso na presente invenção, o termo "cassete de expressão" ou "vetor de expressão" refere-se a um construto ou vetor de ácido nucleico gerado de forma recombinante ou sinteticamente para a expressão de um ácido nucleico de interesse (por exemplo, um ácido nucleico estranho ou transgene) em uma célula alvo. O ácido nucleico de interesse expressa tipicamente uma proteína de interesse. Um vetor de expressão ou cassete de expressão compreende tipicamente uma sequência de nucleotídeo promotora que direciona ou promove a expressão do ácido nucleico estranho. O vetor ou cassete de expressão também inclui tipicamente quaisquer outros elementos de ácido nucleico especificados que permitem a transcrição de um ácido nucleico particular em uma célula alvo. Um cassete de expressão recombinante pode ser incorporado em um plasmídio, cromossomo, DNA mitocondrial, DNA de plastídio, vírus, ou fragmento de ácido nucleico. Alguns vetores de expressão possuem a capacidade de incorporar e ex-

pressar fragmentos de DNA heterólogo em uma célula hospedeira. Muitos vetores de expressão procarióticos e eucarióticos estão comercialmente disponíveis. A seleção dos vetores de expressão adequados está dentro do conhecimento dos versados na técnica. A seleção de vetores de expressão adequados para expressão de uma proteína a partir de uma sequência de ácido nucleico incorporada no vetor de expressão está dentro do conhecimento daqueles versados na técnica.

[0040] Um construto de DNA é um segmento de ácido nucleico construído artificialmente que pode ser introduzido em uma célula ou tecido alvo. Um construto de DNA compreende tipicamente um inserto de DNA que compreende uma sequência de nucleotídeo que codifica uma proteína de interesse que foi subclonada em um vetor. O vetor pode conter genes de resistência bacteriana para crescimento em bactérias e um promotor para expressão da proteína de interesse em um organismo. O DNA pode ser gerado *in vitro* por PCR ou qualquer outra técnica adequada conhecida dos versados na técnica. O construto de DNA pode compreender uma sequência de ácido nucleico de interesse. Em um aspecto, a sequência é operacionalmente ligada a elementos adicionais como, por exemplo, elementos de controle (por exemplo, promotores, etc.). O construto de DNA pode compreender, adicionalmente, um marcador selecionável e pode compreender, adicionalmente, uma sequência de entrada flanqueada por seções de homologia. O construto pode compreender outras sequências não homólogas adicionadas às extremidades (por exemplo, sequências "stuffer" ou flaqueadoras). As extremidades da sequência podem ser fechadas para que o construto de DNA forme um círculo fechado. A sequência de ácido nucleico de interesse, que é incorporada ao construto de DNA com o uso de métodos bem conhecidos na técnica podem ser um ácido nucleico selvagem, mutante, ou modificado. O construto de DNA pode compreender uma ou mais sequências de ácido nucleico homó-

logas ao cromossomo da célula hospedeira. O construto de DNA pode compreender uma ou mais sequências de nucleotídeo não homólogas. Uma vez que o construto de DNA é montado *in vitro*, ele pode ser usado, por exemplo, para: 1) inserir sequências heterólogas em uma sequência alvo desejada de uma célula hospedeira; e/ou 2) mutagenizar uma região do cromossomo da célula hospedeira (isto é, substituir uma sequência endógena por uma sequência heteróloga); 3) deletar genes alvo; e/ou 4) introduzir um plasmídeo de replicação no hospedeiro. O "construto de DNA" é usado de maneira intercambiável na presente invenção com "cassete de expressão."

[0041] Para uso na presente invenção, um "plasmídeo" refere-se a uma molécula de DNA extracromossômica que é capaz de se replicar independentemente do DNA cromossômico. Um plasmídeo tem filamento duplo (ds - "double stranded"), pode ser circular e é usado tipicamente como um vetor de clonagem.

[0042] Para uso na presente invenção no contexto de introduzir uma sequência de ácido nucleico em uma célula, o termo "introduzido" refere-se a qualquer método adequado para transferir a sequência de ácido nucleico para dentro da célula. Tais métodos para a introdução incluem, mas não se limitam a, fusão de protoplasto, transfecção, transformação, eletroporação, conjugação, e transdução (vide, por exemplo, Ferrari et al., "Genetics," em Hardwood et al. (eds.), Bacillus, Plenum Publishing Corp., pp. 57-72 [1989]).

[0043] A transformação refere-se à alteração genética de uma célula que resulta da absorção, incorporação genômica, e expressão de material genético (por exemplo, DNA).

[0044] Para uso na presente invenção, um ácido nucleico é "operacionalmente ligado" a outra sequência de ácido nucleico quando ela é colocada em uma relação funcional com outra sequência de ácido nucleico. Por exemplo, um promotor ou intensificador é operacional-

mente ligado a uma sequência de nucleotídeo codificante caso o promotor afete a transcrição da sequência codificante. Um sítio de ligação ao ribossoma é ligado operacionalmente a uma sequência codificante se ele estiver posicionado de modo a facilitar a tradução da sequência codificante. Tipicamente, sequências de DNA "operacionalmente ligadas" são contíguas. Entretanto, intensificadores não precisam ser contíguos. A ligação é feita por ligação a sítios de restrição convenientes. Se estes sítios não existirem, adaptadores ou ligantes de oligonucleotídeo sintéticos podem ser usados de acordo com a prática convencional.

[0045] Para uso na presente invenção, "recombinante" quando usado com relação a uma célula, indica tipicamente que a célula foi modificada pela introdução de uma sequência de ácido nucleico heteróloga ou que a célula é derivada de uma célula assim modificada. Por exemplo, uma célula recombinante pode compreender um gene não encontrado de forma idêntica dentro da forma nativa (não recombinante) da célula, ou uma célula recombinante pode compreender um gene nativo (encontrado sob a forma nativa na célula), mas que foi modificado e reintroduzido na célula. Uma célula recombinante pode compreender um ácido nucleico endógeno à célula, que foi modificado sem remover o ácido nucleico da célula; tais modificações incluem aquelas obtidas por reposição gênica, mutação sítio-específica, e técnicas relacionadas conhecidas dos versados na técnica. DNA recombinante (rDNA) é uma forma de DNA artificial que é criada pela combinação de duas ou mais sequências de nucleotídeo que não ocorreriam normalmente juntas através do processo de splicing gênico. A tecnologia de DNA recombinante inclui técnicas para a produção de DNA recombinante *in vitro* e transferência do DNA recombinante para dentro de células onde ele pode ser expresso ou propagado, produzindo, assim, um polipeptídeo recombinante.

[0046] Para uso na presente invenção, o termo "amplificação" de ácido nucleico ou gene refere-se a um processo pelo qual sequências de DNA específicas são replicadas desproporcionalmente para que tal ácido nucleico ou gene amplificado fique presente em número de cópias mais elevado do que o inicialmente presente no genoma. A seleção de células por cultivo na presença de um fármaco (por exemplo, um inibidor de uma enzima inibível) pode resultar na amplificação de gene endógeno que codifica o produto gênico necessário para o crescimento na presença do fármaco ou por amplificação de sequências exógenas (isto é, inseridas) que codificam este ácido nucleico ou produto gênico ou ambos.

[0047] Para uso na presente invenção, o termo "iniciador" refere-se a um oligonucleotídeo (um polímero de resíduos de nucleotídeo), que pode ocorrer naturalmente, tal como em um digesto de restrição purificado ou produzido sinteticamente, que é capaz de agir como um ponto de início da síntese quando colocado sob condições nas quais a síntese de um produto de extensão do iniciador que é complementar a uma fita de ácido nucleico é induzida (isto é, na presença de nucleotídeos e um agente indutor como, por exemplo, DNA polimerase e a temperatura e pH adequados). Um iniciador é, de preferência, de fita simples para máxima eficiência na amplificação, mas pode ser alternativamente de filamento duplo. Se for dupla fita, o iniciador é primeiro tratado para separar suas fitas antes de ser usado para preparar os produtos de extensão. O iniciador pode compreender um oligodesoxirribonucleotídeo. O iniciador precisa ser suficientemente longo para iniciar a síntese de produtos de extensão na presença do agente indutor. O comprimento exato de um iniciador depende de uma variedade de fatores, incluindo a temperatura, fonte do iniciador, e do uso do método.

[0048] Para uso na presente invenção, o termo "sonda" refere-se a

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

[0049] Para uso na presente invenção, o termo "reação em cadeia da polimerase" (PCR) refere-se aos métodos das patentes US n° 4.683.195; 4.683.202 e 4.965.188, aqui incorporados por referência, que incluem métodos para aumentar a concentração de um segmento de uma sequência alvo em uma mistura de DNA genômico sem clonagem ou purificação. Este processo para amplificar a sequência alvo é bem conhecido na técnica.

[0050] Para uso na presente invenção, o termo "reagentes de amplificação" refere-se aos reagentes (por exemplo, trifosfatos de desoxirribonucleotídeo, tampão, etc.) necessários para a amplificação, exceto iniciadores, molde de ácido nucleico, e a enzima de amplificação. Tipicamente, reagentes de amplificação junto com outros componentes de reação são colocados e contidos em um vaso de reação (tubo de ensaio, micropoço, etc.).

[0051] Para uso na presente invenção, o termo "endonuclease de restrição" ou "enzima de restrição" refere-se a uma enzima (por exemplo, enzima bacteriana) que é capaz de cortar DNA dupla fita ou fita-

simples em uma sequência de nucleotídeos específica conhecida como um sítio de restrição, ou próximo dela. A sequência de nucleotídeo que compreende o sítio de restrição é reconhecida e clivada por uma dada endonuclease de restrição ou enzima de restrição e é frequentemente o sítio para inserção de fragmentos de DNA. Um sítio de restrição pode ser manipulado em um vetor de expressão ou construto de DNA.

[0052] Tal como é conhecido na técnica, uma sequência de DNA pode ser transcrita por uma RNA polimerase para produzir uma sequência de RNA, mas uma sequência de RNA pode ser transcrita de modo reverso pela transcriptase reversa para produzir uma sequência de DNA.

[0053] "Cepa hospedeira" ou "célula hospedeira" refere-se a um hospedeiro adequado para um vetor de expressão que compreende uma sequência de DNA de interesse. Uma sequência de DNA de interesse pode expressar uma proteína de interesse na cepa hospedeira ou célula hospedeira.

[0054] Uma "proteína" ou "polipeptídeo" ou "peptídeo" é uma sequência polimérica de resíduos de aminoácido. Um grupo carboxila de um aminoácido é ligado ao grupo amino de outro. Os termos "proteína" e "polipeptídeo" e "peptídeo" podem ser usados de maneira intercambiável na presente invenção. Um peptídeo compreende dois ou mais aminoácidos. Os peptídeos contém, tipicamente, menos aminoácidos que os polipeptídeos ou proteínas. O código de uma e de 3 letras para aminoácidos, conforme definido de acordo com a nomenclatura da IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN), é usado em toda esta descrição. A letra X refere-se a qualquer um dos vinte aminoácidos. Também deve ser compreendido que um polipeptídeo pode ser codificado por mais de uma sequência de nucleotídeo devido à degeneração do código genético.

[0055] Ao descrever variantes de enzimas, a seguinte nomenclatura é tipicamente usada para facilidade de referência: Aminoácido(s) original(is):posição(ões):aminoácido(s) substituído(s). A abreviação para aminoácidos de uma letra ou três letras da IUPAC aceita é empregada. A letra "X" refere-se a qualquer resíduo de aminoácido. Entretanto, no contexto de uma substituição de aminoácido (por exemplo, "X003C"), deve ser compreendido que "X" refere-se a um resíduo de aminoácido diferente do resíduo de aminoácido que resulta da substituição (por exemplo, X é um resíduo de aminoácido diferente de C). As mutações são tipicamente designadas pelo código de uma letra para o aminoácido original, seguido por um número da posição do aminoácido de três ou dois ou um dígito em uma sequência de aminoácidos e, então, o código de uma letra para o aminoácido substituído. Por exemplo, a mutação do aminoácido glicina (G) na posição de aminoácido 87 em uma sequência de aminoácidos mediante a substituição da glicina (G) pelo aminoácido serina (S) é representada como "G087S" ou "G87S". Tipicamente, a substituição de uma glicina na posição 2 por uma treonina é representada como G002T; Entretanto, tal substituição podem, também, ser representada como G02T ou G2T. Um ou dois zeros condutores ("0") podem estar incluídos simplesmente para fornecer uma designação de três números conveniente para cada posição de aminoácido. A posição de aminoácido "001" é a mesma que "1" e, desta forma, "A001C" é igual a "A1C". "X001G" refere-se à substituição com glicina (G) na posição de aminoácido 1 em uma sequência de aminoácido, sendo que o aminoácido que deve ser substituído pela glicina é qualquer aminoácido. Várias mutações são indicadas pela inserção de um "-" entre as mutações ou pelo uso de um sinal de mais (+) entre as mutações. Por exemplo, substituições de aminoácido nas posições de resíduos de aminoácido 87 e 90 em uma sequência de aminoácidos são representadas como "G087S-A090Y" ou "G87S-

A90Y" ou "G87S + A90Y" ou "G087S + A090Y". Para deleções, é usado o código de "Z" uma letra. Para uma inserção em relação à sequência original, o código de uma letra "Z" está no lado esquerdo do número da posição. Para uma deleção, o código de uma letra "Z" está do lado direito do número da posição. Para inserções, o número da posição é o número da posição antes do(s) aminoácido(s) inserido(s), mais 0,01 para cada aminoácido. Por exemplo, uma inserção de três aminoácidos alanina (A), serina (S) e tirosina (Y) entre a posição 87 e 88 é mostrado como "Z087.01A-Z087.02S-Z087.03Y." Desta forma, a combinação de todas as mutações acima mais uma deleção na posição 100 é: "G087S- Z087.01A-Z087.02S-Z087.03Y-A090Y-A100Z."

[0056] Uma "pró-sequência" ou "sequência de pró-peptídeo" refere-se a uma sequência de aminoácidos entre a sequência do peptídeo de sinal e a sequência de protease madura que é necessária para a secreção da protease. A clivagem da pró-sequência ou sequência de pró-peptídeo resulta em uma protease ativa madura.

[0057] O termo "sequência de sinal" ou "peptídeo de sinal" refere-se a uma sequência de resíduos de aminoácido que pode participar na secreção ou transporte direto da forma madura ou precursora de uma proteína. A sequência de sinal está localizada tipicamente em posição N-terminal à sequência de proteína precursora ou madura. A sequência de sinal podem, também, ser chamada de uma sequência líder. A sequência de sinal pode ser endógena ou exógena. Uma sequência de sinal exógena exemplificadora compreende os primeiros sete resíduos de aminoácido da sequência de sinal da subtilisina de *Bacillus subtilis* fundidas ao restante da sequência de sinal da subtilisina de *Bacillus lentus* (ATCC 21536). Uma sequência de sinal está normalmente ausente da proteína madura. Uma sequência de sinal é tipicamente clivada a partir da proteína por uma peptidase sinal após a proteína ser transportada.

[0058] O termo "sequência de sinal híbrida" refere-se a sequências de sinal nas quais parte da sequência é obtida a partir do hospedeiro de expressão fundido à sequência de sinal do gene a ser expresso. sequências sintéticas podem ser utilizadas.

[0059] O termo forma "madura" de uma proteína, polipeptídeo, ou peptídeo refere-se à forma funcional da proteína, polipeptídeo, ou peptídeo sem a sequência do peptídeo de sinal e a sequência do pró-peptídeo.

[0060] O termo forma "precursora" de uma proteína ou peptídeo refere-se à forma madura da proteína que tem uma pró-sequência operacionalmente ligada à terminação amino ou carbonila da proteína. O precursor podem, também, ter uma sequência de "sinal" operacionalmente ligada à terminação amino da pró-sequência. O precursor podem, também, ter polinucleotídeos adicionais que estão envolvidos na atividade pós-traducional (por exemplo, polinucleotídeos clivados deles para deixar a forma madura de uma proteína, polipeptídeo, ou peptídeo).

[0061] O termo "selvagem" com relação a uma sequência de aminoácidos ou sequência de ácido nucleico indica que a sequência de aminoácidos ou sequência de ácido nucleico é uma sequência nativa ou de ocorrência natural. Para uso na presente invenção, o termo "que ocorre naturalmente" refere-se a tudo (por exemplo, proteínas, aminoácidos, ou sequências de ácido nucleico) que é encontrado na natureza (por exemplo, não foi manipulado através de métodos recombinantes ou químicos). Para uso na presente invenção, o termo "que não tem ocorrência natural" refere-se a tudo que não é encontrado na natureza (por exemplo, ácidos nucleicos recombinantes ou sintetizados quimicamente produzidos no laboratório).

[0062] Um resíduo de aminoácido em uma sequência de aminoácidos específica pode ser numerada por correspondência a um resíduo

de aminoácido em uma posição de uma sequência de aminoácidos de referência. Um resíduo de aminoácido de uma sequência de aminoácidos de interesse que está em uma posição que "corresponde a" ou está "correspondendo a" ou em "correspondência com" a posição de um resíduo de aminoácido de uma sequência de aminoácidos de referência indica que o resíduo de aminoácido da sequência de interesse está situado em uma posição que é equivalente ou homóloga à posição de um resíduo de aminoácido na sequência de aminoácidos de referência. O versado na técnica pode determinar se uma posição de resíduo particular em um polipeptídeo corresponde a uma posição de uma sequência de referência homóloga. Por exemplo, uma variante de protease pode ser alinhada com a de uma sequência de referência (por exemplo, sequência de BPN' da SEQ ID nº 2) com o uso de técnicas conhecidas. As posições dos resíduos de aminoácido na sequência de referência são usadas para numerar os resíduos de aminoácido na sequência de interesse. Consequentemente, os resíduos de aminoácido da variante de protease podem ser numerados de acordo com a numeração da posição do resíduo de aminoácido correspondente da sequência de referência. Por exemplo, os resíduos de aminoácido na sequência de referência de SEQ ID nº 2 podem ser usados para determinar a numeração da posição do resíduo de aminoácido de cada resíduo de aminoácido de uma variante de protease de interesse.

[0063] Para uso na presente invenção, "homologia" refere-se a uma similaridade ou identidade de sequência, com identidade sendo preferencial. A homologia pode ser determinada com o uso de técnicas padrão conhecidas na arte (vide, por exemplo, Smith e Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 [1981]; Needleman e Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 [1970; Pearson e Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 [1988]; programas de software como, por exemplo, GAP, BESTFIT, FASTA, e TFASTA no pacote de programas Wisconsin Genetics

Software Package (Genetics Computer Group, Madison, WI); e Devereux et al., Nucl. Acid Res. 12:387-395 [1984]). Um exemplo de um algoritmo útil é o PILEUP. O PILEUP cria um alinhamento de múltiplas sequências a partir de um grupo de sequências relacionadas usando alinhamentos progressivos aos pares. Ele também pode plotar uma árvore mostrando as relações de agrupamento usadas para criar o alinhamento. O PILEUP usa uma simplificação do método de alinhamento progressivo de Feng e Doolittle (vide Feng e Doolittle, J. Mol. Evol. 35:351-360 [1987]). O método é similar ao descrito por Higgins e Sharp (vide Higgins e Sharp, CABIOS 5:151-153 [1989]). Parâmetros de PILEUP úteis, incluindo um peso para lacuna padrão de 3,00, um peso para o comprimento de lacuna padrão de 0,10, e lacunas de extremidade ponderadas. Outro exemplo de um algoritmo útil é o algoritmo BLAST, descrito por Altschul et al., (vide Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 [1990]; e Karlin e Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 [1993]). Um programa BLAST particularmente útil é o programa WU-BLAST-2 (vide Altschul et al., Meth. Enzymol. 266:460-480 [1996]). O WU-BLAST-2 usa vários parâmetros de busca, a maioria destes são ajustados para os valores padrão. Os parâmetros ajustáveis são ajustados com os seguintes valores: distância da sobreposição = 1, fração de sobreposição = 0,125, limite da palavra (T) = 11. Os parâmetros HSP S e HSP S2 são valores dinâmicos e são estabelecidos pelo programa em si dependendo da composição da sequência particular e da composição da base de dados particular contra a qual a sequência de interesse está sendo pesquisada. Entretanto, os valores podem ser ajustados para aumentar a sensibilidade.

[0064] O percentual de identidade de sequência (% de identidade de sequência ou simplesmente % de identidade) entre uma sequência de polipeptídeo em questão e uma sequência de polipeptídeo de referência significa que a sequência de aminoácidos em questão é idên-

tica com base em uma análise de resíduo de aminoácido-por-resíduo de aminoácido em uma porcentagem especificada à sequência de polipeptídeo de referência ao longo de um comprimento de comparação quando as sequências são otimamente alinhadas, conforme determinado, por exemplo, por um algoritmo de comparação de sequência de aminoácidos ou por inspeção visual. O percentual de identidade de sequência entre uma sequência de ácido nucleico em questão e uma sequência de ácido nucleico de referência significa, de maneira similar, que a sequência de nucleotídeo em questão é idêntica com base em uma análise de resíduo de ácido nucleico-por-resíduo de ácido nucleico em uma porcentagem especificada à sequência de nucleotídeo de referência ao longo de um comprimento de comparação quando as sequências são otimamente alinhadas.

[0065] O percentual de identidade de sequência (percentual de identidade ou % de identidade de sequência ou % de identidade) entre uma sequência de referência e uma sequência de interesse em questão pode ser facilmente determinado pelo versado na técnica. O percentual de identidade compartilhado por duas sequências de polipeptídeo pode ser determinado, por exemplo, por comparação direta entre os resíduos de aminoácido em cada sequência pelo alinhamento dos resíduos das respectivas sequências para similaridade máxima e determinação do número de resíduos de aminoácido idênticos entre as sequências usando um algoritmo de comparação de sequência conhecido na técnica ou por inspeção visual. As duas sequências de polipeptídeo otimamente alinhadas podem ser comparadas ao longo do comprimento de comparação e o número de posições no alinhamento ótimo no qual os resíduos de aminoácido idênticos ocorrem em ambas as sequências de polipeptídeo pode ser determinado, fornecendo, assim, o número de posições pareadas, e o número de posições pareadas é então dividido pelo número total de posições ao longo do com-

primento de comparação. O número resultante é multiplicado por 100 para gerar o percentual de identidade da sequência de polipeptídeo em questão à sequência de polipeptídeo de referência (ou de pesquisa). O percentual de identidade compartilhado por duas sequências de sequência de ácido nucleico pode, do mesmo modo, ser determinado por comparação direta entre os resíduos de nucleotídeo em cada sequência pelo alinhamento dos resíduos das respectivas sequências para similaridade máxima e determinação do número de resíduos de nucleotídeo idênticos entre as sequências de ácido nucleico usando um algoritmo de comparação de sequência conhecido na técnica ou por inspeção visual. O percentual de identidade entre duas ou mais sequências podem, também, ser descrito como as sequências sendo um percentual específico idênticas.

[0066] Um exemplo de um algoritmo que é adequado para determinar a identidade de sequência é o algoritmo BLAST (vide Altschul, et al., J. Mol. Biol., 215:403-410 [1990]). Um programa para fazer as análises BLAST está disponíveis ao público através do National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo envolve primeiro identificar pares de sequência de alta semelhança (HSPs) pela identificação de pequenas palavras de comprimento W na sequência pesquisada que pareiam ou satisfazem algum limiar de pontuação de valor positivo T quando alinhada com uma palavra com o mesmo comprimento em uma sequência da base de dados. Estes acertos iniciais de palavras vizinhas agem como pontos de partida para encontrar HSPs mais longos que as contenham. Os acertos da palavra são estendidos em ambas as direções das duas sequências que estão sendo comparadas até o ponto em que a pontuação do alinhamento cumulativo pode ser aumentada. A extensão dos acertos de palavra é interrompida quando: a pontuação de alinhamento cumulativo cai pela quantidade X a partir de seu valor máximo; a pontuação cumulativa cai para zero ou menos;

ou o final de uma das sequências é atingido. Os parâmetros W, T, e X do algoritmo BLAST determinam a sensibilidade e a velocidade do alinhamento. O programa BLAST usa como padrões um tamanho de palavra (W) de 11, a matriz de pontuação BLOSUM62 (vide Henikoff e Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 [1992]) alinhamentos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M'5, N'-4, e uma comparação entre ambas as fitas.

[0067] O algoritmo BLAST faz então uma análise estatística da similaridade entre as duas sequências (consulte, por exemplo, Karlin e Altschul, *supra*). Uma medição de similaridade fornecida pelo algoritmo BLAST é a probabilidade da menor soma ($P(N)$), que fornece uma indicação da probabilidade pela qual um pareamento entre duas sequências de nucleotídeo ou aminoácido poderia ocorrer ao acaso. Por exemplo, um ácido nucleico é considerado similar a um ácido nucleico que codifica uma protease desta invenção caso a probabilidade da menor soma em uma comparação entre o ácido nucleico de teste e o ácido nucleico de que codifica a protease seja menor que cerca de 0,1, com mais preferência, menos que cerca de 0,01 e, com a máxima preferência, menos que cerca de 0,001. Quando o ácido nucleico de teste codifica um polipeptídeo de protease, ele é considerado similar a um ácido nucleico que codifica uma protease especificada se os resultados da comparação em uma probabilidade da menor soma forem menores que cerca de 0,5, e com mais preferência, menores que cerca de 0,2.

[0068] "Alinhamento ótimo" ou "otimamente alinhado" refere-se ao alinhamento de duas (ou mais) sequências dando a pontuação de percentual de identidade mais elevada. Por exemplo, o alinhamento ótimo de duas sequências de polipeptídeo pode ser alcançado por alinhar manualmente as sequências para que o número máximo de resíduos de aminoácido idênticos em cada sequência sejam alinhados juntos ou

pelo uso de programas de software ou procedimentos aqui descritos ou conhecidos na técnica. O alinhamento ótimo de duas sequências de ácido nucleico pode ser alcançado por alinhar manualmente as sequências para que o número máximo de resíduos de nucleotídeo idênticos em cada sequência sejam alinhados juntos ou pelo uso de programas de software ou procedimentos aqui descritos ou conhecidos na técnica.

[0069] Duas sequências (por exemplo, sequências de polipeptídeo) podem ser consideradas "otimamente alinhadas" quando elas são alinhadas com o uso de parâmetros definidos, como, por exemplo, uma matriz de substituição de aminoácido definida, penalidade por existência de lacuna (também chamada penalidade por abertura de lacuna), e penalidade por extensão da lacuna, de modo obter a pontuação de identidade mais elevada possível para aquele par de sequências. A matriz de pontuação BLOSUM62 (vide Henikoff e Henikoff, *supra*) é frequentemente usada como uma matriz de substituição de pontuação padrão em algoritmos de alinhamento de sequências de polipeptídeo (por exemplo, BLASTP). A penalidade por existência de lacuna é imposta para a introdução de uma única lacuna de aminoácido em uma das sequências alinhadas, e a penalidade por extensão da lacuna é imposta para cada posição de resíduo na lacuna. Exemplos dos parâmetros de alinhamento empregados são: Matriz de pontuação BLOSUM62, penalidade por existência de lacuna =11, e penalidade por extensão da lacuna=1. A pontuação do alinhamento é definida pelas posições de aminoácido de cada sequência na qual o alinhamento começa e termina (por exemplo, a janela de alinhamento) e, opcionalmente, pela inserção de uma lacuna ou várias lacunas em uma ou ambas as sequências, de modo a obter a pontuação de similaridade mais alta possível.

[0070] O alinhamento ótimo entre duas ou mais sequências pode

ser determinado manualmente por inspeção visual ou usando um computador, como, por exemplo, mas não se limitando, por exemplo, ao programa BLASTP para sequências de aminoácido e ao programa BLASTN para sequência de ácido nucleico (vide, por exemplo, Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402 (1997); vide também a página da Internet do National Center for Biotechnology Information (NCBI)) ou o programa CLUSTALW.

[0071] Um polipeptídeo de interesse pode ser dito "substancialmente idêntico" a um polipeptídeo de referência se o polipeptídeo de interesse compreender uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos cerca de 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 99,5% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos do polipeptídeo de referência. O percentual de identidade entre dois polipeptídeos pode ser determinado manualmente por inspeção das duas sequências de polipeptídeo otimamente alinhadas ou pelo uso de programas de software ou algoritmos (por exemplo, BLAST, ALIGN, CLUSTAL) com o uso de parâmetros padrão. Um indício de que dois polipeptídeos são substancialmente idênticos é que o primeiro polipeptídeo faz reação imunológica cruzada com o segundo polipeptídeo. Tipicamente, os polipeptídeos que diferem por substituições de aminoácido conservativas são imunologicamente reativos de forma cruzada. Desta forma, um polipeptídeo é substancialmente idêntico a um segundo polipeptídeo, por exemplo, quando os dois peptídeos diferem apenas por uma substituição de aminoácido conservativa ou uma ou mais substituições de aminoácido conservativas.

[0072] Um ácido nucleico de interesse pode ser dito "substancialmente idêntico" a um ácido nucleico de referência se o ácido nucleico de interesse compreender uma sequência de nucleotídeo que tem pelo menos cerca de 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%,

94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 99,5% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo do ácido nucleico de referência. O percentual de identidade entre dois ácidos nucleicos pode ser determinado manualmente por inspeção das duas sequências de ácido nucleico otimamente alinhadas ou pelo uso de programas de software ou algoritmos (por exemplo, BLAST, ALIGN, CLUSTAL) com o uso de parâmetros padrão. Uma indicação de que duas sequências de ácido nucleico são substancialmente idênticas é que as duas moléculas de ácido nucleico hibridizam uma a outra sob condições estringentes (por exemplo, dentro de uma faixa de estringência média a alta).

[0073] Para uso na presente invenção, "isolado" com relação a um componente particular de interesse significa que o componente é essencialmente ou substancialmente isento de outros componentes. Por exemplo, um polipeptídeo "isolado" significa que o polipeptídeo é essencialmente ou substancialmente isento de outros componentes, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a outros polipeptídeos e componentes celulares. Um ácido nucleico "isolado" significa que o ácido nucleico é essencialmente ou substancialmente isento de outros componentes, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a outros ácidos nucleicos e componentes celulares. Para os propósitos deste pedido, "isolado" se refere a ácidos nucleicos ou polipeptídeos que não fazem parte de uma biblioteca (por exemplo, biblioteca de seleção).

[0074] A pureza e a homogeneidade são tipicamente determinadas com o uso de técnicas de química analítica, como, por exemplo, eletroforese em gel de poliacrilamida ou cromatografia líquida de alta eficiência. Uma proteína ou um ácido nucleico que é a espécie predominante presente em uma preparação é substancialmente purificada. O termo "purificado" denota que um ácido nucleico ou proteína gera essencialmente uma banda em um gel eletroforético, eluído cromatográfico, e/ou um meio submetido à centrifugação por gradiente de den-

cidade. Particularmente, "purificado" significa que quando isolado, o isolado contém pelo menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 99,5% ou mais ácido nucleico ou proteína com base no peso do isolado. Polipeptídeos purificados podem ser obtidos por vários métodos incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a sínteses de laboratório, cromatografia (por exemplo, cromatografia líquida de alta eficiência) eletroforese preparativa, eletroforese em gel de poliacrilamida seguida de visualização por coloração, centrifugação, precipitação, purificação por afinidade, etc. (vide, geralmente, R Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y. (1982), Deutscher, Methods in Enzymol., Vol. 182: Guide to Protein Purification, Academic Press, Inc. N.Y. (1990)). A invenção inclui polipeptídeos isolados ou purificados (por exemplo, variantes de protease isoladas ou variantes de subtilisina da invenção) e ácidos nucleicos isolados ou purificados (por exemplo, ácidos nucleicos que codificam variantes de protease ou variantes de subtilisina da invenção).

[0075] Em um sentido relacionado, a invenção fornece métodos de enriquecer as composições para uma ou mais moléculas da invenção, como, por exemplo, um ou mais polipeptídeos da invenção (por exemplo, uma ou mais variantes de protease da invenção) ou um ou mais ácidos nucleicos da invenção (por exemplo, um ou mais ácidos nucleicos que codificam uma ou mais variantes de protease da invenção). Uma composição é enriquecida para uma molécula quando há um aumento substancial na concentração da molécula após aplicação de uma técnica de purificação ou enriquecimento. Um polipeptídeo ou ácido nucleico substancialmente puro compreenderá tipicamente pelo menos cerca de 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, 99,5% ou mais, em peso (com base molar) de todas as espécie macromoleculares em uma composição específica.

[0076] Para uso na presente invenção, o termo "mutagênese combinatória" refere-se a métodos pelos quais bibliotecas de variantes de ácido nucleico de uma sequência de ácido nucleico de referência são geradas. Nestas bibliotecas, as variantes contêm uma ou várias mutações escolhidas a partir de um conjunto pré-definido de mutações. Os métodos também fornecem meios para introduzir mutações aleatórias que não eram membros do conjunto pré-definido de mutações. Alguns destes métodos incluem os apresentados na patente US 6.582.914, aqui incorporada por referência. Alguns métodos de mutagênese combinatória incluem e/ou abrangem métodos incorporados em kits comercialmente disponíveis (por exemplo, kit de mutagênese sítio-dirigida QUIKCHANGE® Multisite-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)).

[0077] Para uso na presente invenção, ter "propriedades aprimoradas" usado com relação a uma variante de protease refere-se a uma variante de protease que tem propriedades aprimoradas em comparação a uma protease de referência ou original. As variantes de protease da invenção pode ter uma ou mais das seguintes propriedades: atividade proteolítica intensificada ou aprimorada, estabilidade intensificada ou aprimorada, capacidade intensificada ou aprimorada de limpar uma superfície ou item, desempenho de limpeza intensificado ou aprimorado, desempenho de limpeza de tecido ou lavanderia ou desempenho de lavagem intensificado ou aprimorado, desempenho de lavagem das mãos intensificado ou aprimorado, desempenho de lavagem de louças manual ou com as mãos intensificado ou aprimorado, desempenho de lavagem de louças automática intensificado ou aprimorado, desempenho de lavagem de roupas intensificado ou aprimorado em comparação a uma protease de referência ou protease original de interesse.

[0078] Para uso na presente invenção, o termo "teste funcional"

refere-se a um teste que fornece uma indicação da atividade de uma proteína. O termo se refere, tipicamente, a sistemas de teste nos quais uma proteína é analisada quanto a sua capacidade de funcionar na sua capacidade usual. Por exemplo, no caso de enzimas, um teste funcional envolve determinar a eficácia da enzima em catalisar a reação.

[0079] O termo "propriedade" ou equivalentes gramaticais do mesmo no contexto de uma molécula pode se referir a qualquer característica ou atributo da molécula que pode ser selecionado ou detectado. Por exemplo, no contexto de um polipeptídeo, uma propriedade pode ser uma atividade enzimática (por exemplo, atividade proteolítica), estabilidade, ou outra propriedade.

[0080] Uma sequência de ácido nucleico "mutante" se refere tipicamente uma sequência de ácido nucleico que tem uma alteração em pelo menos um códon que ocorre em uma sequência selvagem da célula hospedeira, para que o produto de expressão da sequência de ácido nucleico mutante seja uma proteína com uma sequência de aminoácidos alterada em relação à proteína selvagem. O produto de expressão pode ter uma capacidade funcional alterada (por exemplo, atividade enzimática intensificada).

[0081] Para uso na presente invenção, o termo "carga líquida" é definido como a soma de todas as cargas presentes em uma molécula. "Alterações de carga líquida" podem ser feitas em uma molécula de proteína original para fornecer uma variante de proteína que tem uma carga líquida que difere daquela da molécula de proteína original (isto é, a variante tem uma carga líquida que não é igual a da molécula original). Por exemplo, a substituição de um aminoácido neutro de uma proteína por um aminoácido negativamente carregado ou substituição de um aminoácido positivamente carregado de uma proteína por um aminoácido neutro resulta em uma carga líquida de -1 com relação a

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

[0082] Os termos "termicamente estáveis" e "termoestáveis" e "termoestabilidade" com relação a um polipeptídeo indica que o polipeptídeo é resistente a uma alteração permanente na sua atividade causada somente por calor, como, por exemplo, através de exposição a uma temperatura mais elevada. Por exemplo, uma enzima termicamente estável significa que a enzima é resistente a uma alteração permanente na sua atividade enzimática causada somente pelo calor, como, por exemplo, através da exposição a uma temperatura mais elevada. Tipicamente, a protease que é termicamente estável é capaz de reter pelo menos cerca de 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% da sua atividade proteolítica após exposição a temperaturas aumentadas ao longo de um dado período de tempo, por exemplo, pelo menos cerca de 60 minutos, 120 minutos, 180 minutos, 240 minutos, 300 minutos, etc.

[0083] A atividade de limpeza de um polipeptídeo ou protease pode se referir a um desempenho de limpeza obtido por uma protease. A atividade de limpeza pode ser determinada pelo uso de vários testes para limpar uma ou mais das várias manchas sensíveis a enzimas so-

bre um objeto, item, ou superfície (por exemplo, uma mancha causada por alimento, grama, sangue, tinta, sangue/leite/tinta, leite/óleo/pigmento, gema de ovo, leite, óleo, e/ou proteína de ovo). O desempenho de limpeza de um polipeptídeo (por exemplo, um polipeptídeo da invenção (como, por exemplo, uma variante de protease) ou um polipeptídeo de referência (por exemplo, protease de referência) pode ser determinado por submeter a mancha sobre o objeto, item, ou superfície da(s) condição(ões) de lavagem padrão e avaliar o grau de remoção da mancha por usar várias metodologias cromatográficas, espectrofotométricas ou outras metodologias quantitativas. Exemplos de testes e métodos de limpeza são conhecidos na técnica e incluem, mas não se limitam a, os descritos em WO 99/34011 e na patente U.S. 6.605.458, ambos aqui incorporados, a título de referência, assim como os testes de limpeza e métodos incluídos nos exemplos da parte I e nos exemplos da parte II fornecidos abaixo.

[0084] O termo "quantidade eficaz de limpeza" de uma variante de protease ou protease de referência refere-se à quantidade de protease que obtém um nível desejado de atividade enzimática em uma composição de limpeza específica. Tais quantidades eficazes são facilmente verificadas por um versado na técnica e são baseadas em muitos fatores, como, por exemplo, a protease específica usada, a aplicação de limpeza, a composição específica da composição de limpeza, e se uma composição líquida ou seca (por exemplo, granular, tablete, barra) é necessária, etc.

[0085] O termo "material composto auxiliar de limpeza" refere-se a qualquer material líquido, sólido, ou gasoso incluído na composição de limpeza diferente de uma variante de protease da invenção. As composições de limpeza da presente invenção podem incluir um de mais materiais auxiliares de limpeza. Cada material auxiliar de limpeza é selecionado dependendo tipicamente do tipo e forma particular de com-

posição de limpeza (por exemplo, líquido, grânulo, pó, barra, pasta, aspersão, tablete, gel, espuma, ou outra composição). De preferência, cada material auxiliar de limpeza é compatível com a enzima protease usada na composição.

[0086] O termo "desempenho aprimorado" no contexto de atividade de limpeza refere-se a uma atividade de limpeza aumentada ou maior por uma enzima sobre determinadas manchas sensíveis à enzima como, por exemplo, ovo, leite, grama, tinta, óleo, e/ou sangue, como determinado por avaliação usual após um ciclo de lavagem padrão e/ou múltiplos ciclos de lavagem.

[0087] O termo "desempenho reduzido" no contexto de atividade de limpeza refere-se a uma atividade de limpeza reduzida ou menor por uma enzima sobre certas manchas sensíveis à enzima como, por exemplo, ovo, leite, grama ou sangue, como determinado por avaliação usual após um ciclo de lavagem padrão.

[0088] Para uso na presente invenção, o termo "composição de limpeza institucional" refere-se a produtos adequados para uso em instituições como por exemplo, mas não se limitando a escolas, hospitais, indústrias, lojas, corporações, edifícios, restaurantes, complexos e edifícios de escritórios, instalações de processamento e/ou fabricação, hospitais veterinários, fazendas de criação, ranchos de criação, etc.

[0089] Para uso na presente invenção, "produto para cuidados de tecidos e da casa" refere-se a um produto ou dispositivo geralmente destinado a ser usado ou consumido sob a forma na qual ele é vendido e que é para tratar tecido, uma superfície dura e qualquer outra superfície na área de cuidados com tecidos e com a casa, que inclui: cuidados com o ar, incluindo perfumadores de ar e sistemas de liberação de aroma, cuidado com automóveis, lavagem de louças, condicionamento de tecidos (incluindo amaciamento and/ou renovação), detergentes para roupas, aditivos e/ou cuidados para lavanderia e enxágue,

limpeza e/ou tratamento de superfícies duras incluindo piso e agentes para limpeza de vasos sanitários e outros produtos de limpeza para uso doméstico e institucional.

[0090] Para uso na presente invenção, os termos "composição de limpeza" e "formulação de limpeza" referem-se a composições que podem ser usadas na remoção de composto(s) indesejado(s) de um item(s) a ser limpo, como, por exemplo, mas não se limitando a tecido, roupas, pratos, louças, lentes de contato, outros substratos sólidos, pêlo (incluindo cabelo humano ou pêlo de animais) (xampus), pele (sabões, cosméticos, e cremes), dentes (enxaguatórios bucais, pastas dentais), objetos para cuidado de não tecidos e da casa, filtros, membranas (por exemplo, membrana de filtração, incluindo, mas não se limitando a membranas de ultrafiltração), superfícies duras e outras superfícies, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, à superfície dura de uma tabela (tampo ou pernas da mesa), parede, outro item ou objeto de mobília, piso, teto, etc. Uma composição de limpeza ou formulação de limpeza pode ser útil em uma aplicação de cuidados pessoais e/ou item de cuidados pessoais, incluindo, por exemplo, mas não se limitando a xampu (para limpar pêlo humano ou animal); sabão, creme ou cosméticos (para limpeza da pele e/ou tratamento de pele); enxaguatório bucal (para cuidados da cavidade oral); creme dental (para limpeza dos dentes e/ou cuidados da cavidade oral). Os termos abrangem qualquer material/composto selecionado para o tipo particular de composição ou formulação de limpeza desejada e a forma do produto (por exemplo, composição líquida, em gel, grânulo, ou aspersão), contanto que a composição ou formulação seja compatível com a protease e/ou outra(s) enzima(s) usada(s) na composição ou formulação. A seleção específica dos materiais da composição ou formulação de limpeza é facilmente feita por considerar a superfície, objeto, ou item (por exemplo, tecido) a ser limpo, e a forma desejada da

composição ou formulação para as condições de limpeza durante o uso. Em um aspecto, uma composição ou formulação de limpeza pode ser um produto para cuidados de tecidos e da casa (por exemplo, uma composição de limpeza para lavar roupa). Em outro aspecto, uma composição ou formulação de limpeza não é um produto para cuidados de tecidos e da casa (por exemplo, uma composição de limpeza para limpar lente de contato, cabelo, dentes, ou pele, ou útil em aplicações para cuidados pessoais e/ou itens para cuidados pessoais).

[0091] As composições de limpeza e as formulações para limpeza incluem qualquer composição que seja adequada para limpar, alvejar, desinfetar, e/ou esterilizar qualquer objeto, item, e/ou superfície. Tais composições e formulações incluem, mas não se limitam a, por exemplo, composições líquidas e/ou sólidas, incluindo composições de limpeza ou detergentes (por exemplo, composições para lavar roupa ou detergentes líquidos, em tablete, gel, barra, grânulo, e/ou sólidas e composições detergentes para tecidos delicados; composições e formulações para limpeza de superfícies duras, como, por exemplo, para vidro, madeira, cerâmica e bancadas de metal e janelas; limpadores de carpete; limpadores de forno; agentes para renovar tecidos; amaciantes de tecidos; e produto têxteis, composições detergentes ou de limpeza para uso como reforço de lavanderia, composições de limpeza para uso como aditivos de lavanderia e composições de limpeza pré-removedor de mancha para uso em lavanderia; composições para lavagem de louças, incluindo composições para lavagem de louças com as mãos ou manual (por exemplo, "detergentes para lavagem de louças com as "mãos" ou "manual") e composições para lavagem automática de louças (por exemplo, "detergentes para lavagem automática de louças").

[0092] As composições de limpeza ou as formulações para limpeza, para uso na presente invenção, incluem, exceto onde indicado em

contrário, agentes de lavagem para múltiplas finalidades ou para tarefas pesadas granulares ou em pó, especialmente detergentes de limpeza; os agentes de lavagem para múltiplas finalidades líquidos, granulares, em gel, sólidos, em tablete, ou forma de pasta, especialmente os chamados detergentes líquidos para tarefas pesadas (HDL) ou detergentes em pó para tarefas pesadas (HDD); detergentes líquidos para tecidos finos; agentes lavagem de louças manual ou com as mãos, inclusive aqueles que fazem muita espuma; lavagem de louça manual ou com as mãos, lavagem de louça automática, ou agentes para lavagem de louças ou utensílios de mesa, incluindo os vários tipos em tablete, em pó, sólidos, granulares, líquidos, em gel, e de auxílio ao enxágue para uso doméstico e institucional; agentes de limpeza e desinfecção líquidos, incluindo tipos para lavagem bactericida das mãos, barras de limpeza, enxaguatórios bucais, limpadores de dentadura, xampus para carro, xampus para carpete, limpadores de banheiro; itens para cuidados pessoais, como, por exemplo, mas não se limitando, por exemplo, a xampus para cabelos e/ou enxágues para cabelo para seres humanos (e outros animais), géis para banho e espumas para banho, itens para tratamento de pele, cosméticos, cremes, sabões para banho e para uso pessoal humano; limpadores de metal; assim como compostos auxiliares de limpeza, como, por exemplo, aditivos alvejantes e "bastões removedores de manchas" ou tipos pré-tratamento. Algumas composições granulares estão sob a forma "compacta"; algumas composições líquidas estão em uma forma "concentrada".

[0093] Em um aspecto, a invenção fornece uma composição de limpeza ou composição detergente que compreende pelo menos uma variante de protease ou polipeptídeo da invenção, sendo que a composição de limpeza ou composição detergente é útil para limpar lente(s) de contato. Em outro aspecto, a invenção fornece uma

composição de limpeza ou composição detergente que compreende pelo menos uma variante de protease ou polipeptídeo da invenção, sendo que a composição de limpeza ou composição detergente é útil em uma aplicação para cuidados pessoais. Em outro aspecto, a invenção fornece uma composição de limpeza ou composição detergente que compreende pelo menos uma variante de protease ou polipeptídeo da invenção, sendo que a composição de limpeza ou composição detergente é útil para limpar ou enxaguar os cabelos, incluindo cabelo humano e/ou pêlo animal (por exemplo, xampu para cabelos e/ou enxágue para os cabelos). Em outro aspecto, a invenção fornece uma composição de limpeza ou composição detergente que compreende pelo menos uma variante de protease ou polipeptídeo da invenção, sendo que a composição de limpeza ou composição detergente é útil para limpar ou tratar a pele (por exemplo, pele humana e/ou animal) (por exemplo, gel para banho, espuma para espuma, limpador para tratamento de pele, sabão cosmético, em creme, e/ou para banho). Em outro aspecto, a invenção fornece uma composição de limpeza ou composição detergente que compreende pelo menos uma variante de protease ou polipeptídeo da invenção, sendo que a composição de limpeza ou composição detergente é útil para limpar os dentes e/ou dentaduras e/ou para cuidar da cavidade oral. Tais composições de limpeza ou composições detergentes podem compreender pelo menos um ingrediente auxiliar ou veículo, pelo menos uma enzima adicional, pelo menos um builder, e/ou pelo menos um tensoativo e pode ser formulada ou estar sob uma forma adequada ao uso. Tais composições de limpeza ou detergentes podem conter fosfato ou podem ser isentas de fosfato. Detalhes adicionais com relação às composições da invenção são fornecidos em outro local no presente documento.

[0094] Para uso na presente invenção, "composições de limpeza

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

[0095] Para uso na presente invenção, "composições para limpeza de não tecidos" incluem composições para limpeza da superfície de não têxteis (isto é, não tecidos), incluindo, mas não se limitando a, por exemplo, composições detergentes para lavagem de louça à mão ou manual ou automática, composições para limpeza oral, composições para limpeza de dentaduras, e composições para limpeza pessoal.

[0096] Para uso na presente invenção, o termo "composição de detergente" ou "formulação do detergente" é usado com relação a uma composição destinada ao uso em um meio de lavagem para a limpeza de objetos sujos ou manchados, que inclui objetos ou itens de tecido e/ou não tecido específicos. Tais composições da presente invenção não se limitam a, qualquer composição ou formulação detergente particular. De fato, os detergentes da invenção podem compreender pelo menos uma variante de protease da invenção e, além disso, um ou mais tensoativos, transferase(s), enzimas hidrolíticas, peridrolases, óxido redutases, builders (por exemplo, um sal builder), agentes alvejantes, ativadores de alvejantes, agentes de azulamento, corantes fluorescentes, inibidores de formação de torta, agentes de mascaramento, ativadores de enzima, antioxidantes, e/ou solubilizantes. Em alguns casos, um sal builder é uma mistura de um sal de silicato e um sal de fosfato, de preferência, com mais silicato (por exemplo, metassilicato de sódio) do que fosfato (por exemplo, tripolifosfato de sódio). Algumas composições da invenção, como, por exemplo, mas não se limitando a, composições de limpeza ou composições detergentes não contêm fosfato (por exemplo, sal de fosfato ou builder à base de fosfato).

[0097] Para uso na presente invenção, "composição para lavagem de louças" refere-se a todas as formas de composições para limpar louças, incluindo talheres, que incluem, mas não se limitam a, formas granulares e líquidas. Em alguns aspectos, a composição para lavagem de louças é uma composição para "lavagem de louças automática" que pode ser usada em lava-louças automáticas. Não se pretende que a presente invenção seja limitada a um tipo particular de composição para louças. De fato, a presente invenção pode ser usada na limpeza de utensílios de louças (por exemplo, louças, incluindo, mas não se limitando a pratos, copos, taças, vasilhas, etc.) e talheres (por exemplo, utensílios, que incluem, mas não se limitando a colheres, facas, garfos, utensílios para servir, etc.) de qualquer material, incluindo, mas não se limitando a cerâmicas, plásticos, metais, porcelana, vidro, acrílicos, etc. O termo "louças" é usado na presente invenção com relação a pratos e talheres.

[0098] Para uso na presente invenção, o termo "alveijamento" refere-se ao tratamento de um material (por exemplo, tecido, lavanderia, polpa, etc.) ou superfície por um período suficiente de tempo e/ou sob condições de pH e/ou temperatura adequadas para fazer um clareamento (*isto é*, branqueamento) e/ou limpeza do material. Exemplos de produtos químicos adequados para o alveijamento incluem, mas não se limitam a, por exemplo, ClO_2 , H_2O_2 , perácidos, NO_2 , etc.

[0099] Para uso na presente invenção, "desempenho de lavagem" de uma protease (por exemplo, uma variante de protease da invenção) refere-se à contribuição de uma variante de protease para lavagem, que fornece desempenho de limpeza adicional ao detergente em comparação ao detergente sem a adição da variante de protease à composição. O desempenho de lavagem é comparado sob condições de lavagem relevantes. Em alguns sistemas de teste, outros fatores relevantes, como, por exemplo, a composição detergente, a concentração

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

[00100] O termo "condições de lavagem relevantes" é usado na presente invenção para indicar as condições, particularmente, temperatura de lavagem, tempo, mecânica da lavagem, concentração da espuma de sabão, tipo de detergente e dureza da água, realmente usadas em aparelhos domésticos em um segmento de mercado de lavagem de louças à mão, lavagem de louças automática ou detergente para lavagem de roupas.

[00101] O termo "desempenho de lavagem aprimorado" é usado para indicar que um resultado final melhor na remoção de manchas é obtido sob condições de lavagem relevantes, ou que menos variante de protease, com base no peso, é necessária para se obter o mesmo resultado final em relação à protease original inicial ou selvagem correspondente.

[00102] Para uso na presente invenção, o termo "desinfetar" refere-se à remoção de contaminantes das superfícies, assim como a inibição ou morte de micróbios sobre as superfícies de itens. Não se pretende que a presente invenção seja limitada a uma superfície, um item, ou contaminante(s) ou micróbios particular(es) a ser(em) removido(s).

[00103] A forma "compacta" das composições de limpeza da presente invenção é mais bem refletida pela densidade e, em termos de composição, pela quantidade de sal de carga inorgânico. Os sais de carga inorgânicos são ingredientes convencionais de composições de detergentes sob a forma de pó. Em composições detergentes convencionais, os sais de carga estão presentes em quantidades substanciais,

tipicamente, cerca de 17 a cerca de 35% com base no peso da composição total. Em contrapartida, em composições compactas, o sal de carga está presente em quantidades que não excedem cerca de 15% da composição total. O sal de carga pode estar presente em quantidades que não excedem cerca de 10%, ou, com mais preferência, cerca de 5%, em peso da composição. Os sais de carga inorgânicos podem ser selecionados a partir dos sais metálicos alcalinos e alcalinos terrosos de sulfatos e cloretos. O sal de carga pode ser sulfato de sódio.

[00104] A posição de um resíduo de aminoácido em uma dada sequência de aminoácidos é tipicamente numerada na presente invenção com o uso da numeração da posição do resíduo de aminoácido correspondente da sequência de aminoácidos BPN' da subtilisina de *B. amiloliquefaciens* mostrada na SEQ ID n° 2. A sequência de aminoácidos BPN' da subtilisina de *B. amiloliquefaciens* da SEQ ID n° 2 serve, assim, como uma sequência de referência. Uma dada sequência de aminoácido, como, por exemplo, uma sequência de aminoácidos da variante de protease aqui descrita, pode ser alinhada com a sequência BPN' (SEQ ID n° 2) com o uso de um algoritmo de alinhamento descrito na presente invenção, e um resíduo de aminoácido na dada sequência de aminoácidos que se alinha (de preferência, e alinha otimamente) com um resíduo de aminoácido na sequência BPN' pode ser convenientemente numerado por referência ao resíduo de aminoácido correspondente na sequência BPN' de subtilisina.

[00105] Em geral, a nomenclatura usada na presente invenção e muitos dos procedimentos laboratoriais em cultura celular, genética molecular, biologia molecular, química de ácidos nucleicos, e química de proteínas descritos a seguir são bem conhecidos e comumente empregados pelos versados na técnica,. Os métodos para produção e manipulação de ácidos nucleicos recombinantes, síntese de ácidos nucleicos, métodos de cultura celular, e incorporação de transgenes

(por exemplo, transfecção, eletroporação) são conhecidos pelos versados na técnica e são descritos em vários textos padrão. A síntese de oligonucleotídeo e as etapas de purificação são feitas tipicamente de acordo com as especificações. As técnicas e procedimentos são geralmente feitos de acordo com métodos convencionais bem conhecidos na técnica e várias referências gerais que são fornecidas ao longo deste documento. Acredita-se que os procedimentos ali contidos são bem conhecidos dos versados na técnica e são fornecidos para a conveniência do leitor.

[00106] É apresentado um produto para cuidados de tecidos e da casa que pode compreender uma protease (incluindo uma variante de protease), incluindo uma ou mais variantes de protease da invenção e um material selecionado do grupo consistindo em um encapsulado que compreende um perfume, um agente de tonalização, um polímero de limpeza anfífilo e misturas dos mesmos, com o equilíbrio de quaisquer aspectos da composição supracitada sendo feito por um ou mais materiais auxiliares. Em um aspecto do produto para cuidados de tecidos e da casa supracitado, o dito produto para cuidados de tecidos e da casa pode compreender, com base no peso total do produto para cuidados de tecidos e da casa, de cerca de 0,005 por cento, em peso (0,0005% em peso) a cerca de 0,1% em peso, de cerca de 0,001% em peso a cerca de 0,05% em peso, ou mesmo de cerca de 0,002% em peso a cerca de 0,03% em peso da dita protease. Em um aspecto do produto para cuidados de tecidos e da casa supracitado, o dito produto para cuidados de tecidos e da casa pode compreender, com base no peso total do produto para cuidados de tecidos e da casa, cerca de 0,00003% em peso a cerca de 0,1% em peso, de cerca de 0,00008% em peso a cerca de 0,05% em peso, ou mesmo de cerca de 0,0001% em peso a cerca de 0,04% em peso de agente para tonalização de tecidos. Em um aspecto do produto para cuidados de tecidos e da casa

supracitado, o dito produto para cuidados de tecidos e da casa pode compreender, com base no peso total do produto para cuidados de tecidos e da casa, de cerca de 0,001% em peso a cerca de 5%, em peso, de cerca de 0,01% em peso a cerca de 2% em peso, ou mesmo de cerca de 0,03% em peso a cerca de 0,5%, em peso de cápsulas de perfume. Em um aspecto do produto para cuidados de tecidos e da casa supracitado, o dito produto para cuidados de tecidos e da casa pode compreender, com base no peso total do produto para cuidados de tecidos e da casa, de cerca de 0,1% em peso a cerca de 5%, em peso, de cerca de 0,25% em peso a cerca de 2,5% em peso, ou mesmo de cerca de 0,3% em peso a cerca de 1,5% em peso de polímero de limpeza anfifílico.

Polipeptídeos da invenção

[00107] A presente invenção apresenta novos polipeptídeos, que podem ser coletivamente chamados de "polipeptídeos da invenção". Os polipeptídeos da invenção incluem variantes de protease isoladas, recombinantes, substancialmente puras, ou que não tem ocorrência natural, incluindo, por exemplo, polipeptídeos variantes de protease subtilisina, que têm atividade enzimática (por exemplo, atividade proteolítica) e/ou propriedades adicionais discutidas em mais detalhes em outro local no presente documento (por exemplo, atividade de limpeza, estabilidade, etc.). Os polipeptídeos da invenção incluem proteases para água fria isoladas, recombinantes, substancialmente puras, ou que não tem ocorrência natural que tem atividades proteolíticas, atividades de limpeza, estabilidade, e outras propriedades discutidas em outro local no presente documento. Tais polipeptídeos, incluindo proteases para água fria, da invenção podem ter desempenho aprimorado em relação a proteases conhecidas (por exemplo, atividade proteolítica intensificada, desempenho ou atividade de limpeza intensificada, estabilidade intensificada, etc). Os

polipeptídeos da invenção são úteis em aplicações para limpeza e podem ser incorporados em composições de limpeza que são úteis em métodos de limpeza de um item ou uma superfície (por exemplo, da superfície de um item) em necessidade de limpeza. Os polipeptídeos da invenção que tem atividade proteolítica são úteis em produtos para cuidados de tecidos e da casa, incluindo, por exemplo, composições de limpeza para cuidados de tecido e da casa. Alguns polipeptídeos da invenção que têm atividade proteolítica são úteis em composições para cuidados pessoais. Os polipeptídeos da invenção que têm atividade proteolítica também são úteis em produtos para cuidados com não tecidos e com a casa (isto é, os produtos que são produtos para cuidados com não tecidos e com a casa são descritos aqui). Uma variante de protease da invenção pode ser uma variante de protease subtilisina. A invenção inclui variantes de protease da *espécie Bacillus* e variantes da protease subtilisina de espécies *Bacillus*.

[00108] Os polipeptídeos da invenção são apresentados em todo este relatório descritivo, incluindo, mas não se limitando aos exemplos da parte I e aos exemplos da parte II fornecidos abaixo. A invenção inclui uma variante de protease isolada, recombinante, substancialmente pura, ou que não tem ocorrência natural (por exemplo, uma variante de subtilisina) que tem atividade proteolítica, cujo polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos cerca de 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, ou 100% de identidade de sequência a uma sequência de aminoácidos da variante de protease específica apresentada em qualquer um dos exemplos da parte I e parte II abaixo. Em um aspecto, a invenção inclui um polipeptídeo de subtilisina isolado, recombinante, substancialmente puro, ou que não tem ocorrência natural que tem atividade proteolítica, sendo que o dito polipeptídeo é uma variante de protease da sequência BPN' da SEQ ID

n° 2 e o dito polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos cerca de 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade de sequência à SEQ. ID NO:2 e um conjunto de substituições de aminoácido apresentado em qualquer um dos exemplos da parte I. Em um aspecto, a invenção inclui um polipeptídeo de subtilisina isolado, recombinante, substancialmente puro, ou que não tem ocorrência natural que tem atividade proteolítica, sendo que o dito polipeptídeo é uma variante de protease da sequência GG36 da SEQ ID n° 755 e o dito polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos cerca de 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade de sequência à SEQ. ID NO:755 e um conjunto de substituições de aminoácido apresentado em qualquer um dos exemplos da parte II.

[00109] Em um primeiro aspecto, a invenção apresenta um polipeptídeo variante de protease isolado ou que não tem ocorrência natural de uma enzima protease original, a variante de protease tendo atividade proteolítica e compreendendo uma sequência de aminoácidos que compreende uma alteração em uma ou mais posições de aminoácido que correspondem às posições de aminoácido da SEQ ID n° 2 selecionadas do grupo que consiste nas posições 24, 53, 78, 97, 101, 128, e 217, em que a pelo menos uma alteração é independentemente (i) uma inserção de um ou mais resíduos de aminoácido à montante ou à jusante do resíduo de aminoácido que ocupa a posição, (ii) uma deleção do resíduo de aminoácido que ocupa a posição, ou (iii) uma substituição do resíduo de aminoácido que ocupa a posição por um resíduo de aminoácido diferente, sendo que cada posição de aminoácido é numerada por correspondência a uma posição de aminoácido na sequência de aminoácidos da BPN' da protease subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* apresentada na SEQ ID n° 2, conforme determi-

nado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante com a SEQ ID nº 2. Uma variante de uma enzima protease de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode ser chamada variante de protease. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode ser uma protease que não tem ocorrência natural. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode ser isolada ou purificada. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode ser uma variante de subtilisina. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode ter atividade proteolítica. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode ter atividade proteolítica intensificada em comparação à atividade proteolítica da sequência de aminoácidos BPN' apresentada na SEQ ID nº 2.

[00110] Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode ser uma variante de uma protease original que é uma protease subtilisina, e a protease subtilisina pode ser uma protease da espécie *Bacillus*. Uma protease de *Bacillus* original de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode ser selecionada a partir do grupo que consiste em BPN' de protease subtilisina de *B. amyloliquefaciens* (SEQ ID nº 2), *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. clausii*, *B. halodurans*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus*, *B. espécie TS-23*, *B. thuringiensis*, BPN'-v3 (SEQ ID NO4:), e BPN'-v36 (SEQ ID nº 6). Uma protease original de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID nº 2, SEQ ID nº 4, ou SEQ ID nº 6.

[00111] Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode ser uma variante de protease que tem uma forma madu-

ra. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode ser uma variante de protease que tem uma forma madura.

[00112] Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que compreende uma alteração em duas posições de aminoácido selecionadas do grupo que consiste nas posições 24, 53, 78, 97, 101, 128, e 217. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que compreende uma alteração em três posições de aminoácido selecionadas do grupo que consiste nas posições 24, 53, 78, 97, 101, 128, e 217. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que compreende uma alteração em quatro posições de aminoácido selecionadas do grupo que consiste nas posições 24, 53, 78, 97, 101, 128, e 217. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que compreende uma alteração em cinco posições de aminoácido selecionadas do grupo que consiste nas posições 24, 53, 78, 97, 101, 128, e 217. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que compreende uma alteração em seis posições de aminoácido selecionadas do grupo que consiste nas posições 24, 53, 78, 97, 101, 128, e 217. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que compreende uma alteração em cada uma das posições de aminoácido que correspondem às posições da SEQ ID nº 2 selecionadas do grupo que consiste nas posições 24, 53, 78, 97, 101, 128, e 217. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que compreende uma substituição de um resíduo de aminoácido por um resíduo de aminoácido diferente em uma posição selecionada do grupo que consiste nas posições 24, 53,

78, 97, 101, 128, e 217.

[00113] Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que compreende uma substituição de um resíduo de aminoácido por um resíduo de aminoácido diferente em cada uma de duas ou três posições selecionadas do grupo que consiste nas posições 24, 53, 78, 97, 101, 128, e 217. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que compreende uma substituição de um resíduo de aminoácido por um resíduo de aminoácido diferente em cada de quatro posições selecionadas do grupo que consiste nas posições 24, 53, 78, 97, 101, 128, e 217. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que compreende uma substituição de um resíduo de aminoácido por um resíduo de aminoácido diferente em cada uma de cinco posições selecionadas do grupo que consiste nas posições 24, 53, 78, 97, 101, 128, e 217. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que compreende uma substituição de um resíduo de aminoácido por um resíduo de aminoácido diferente em cada uma de seis ou sete posições selecionadas do grupo que consiste nas posições 24, 53, 78, 97, 101, 128, e 217. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que compreende uma substituição de um resíduo de aminoácido por um resíduo de aminoácido diferente em cada uma das posições 24, 53, 78, 101, 128, e 217, sendo que cada posição é numerado por correspondência a uma posição na SEQ ID nº 2.

[00114] Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que compreende pelo menos uma substituição de aminoácido selecionada do grupo que consiste em X024G/R, X053G, X078N, X097A, X101N,

X128A/S, e X217Q/L. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que compreende pelo menos duas substituições de aminoácido selecionadas do grupo que consiste em X024G/R, X053G, X078N, X097A, X101N, X128A/S, e X217Q/L. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que compreende pelo menos três substituições de aminoácido selecionadas do grupo que consiste em X024G/R, X053G, X078N, X097A, X101N, X128A/S, e X217Q/L. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que compreende pelo menos quatro substituições de aminoácido selecionadas do grupo que consiste em X024G/R, X053G, X078N, X097A, X101N, X128A/S, e X217Q/L. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que compreende pelo menos cinco substituições de aminoácido selecionadas do grupo que consiste em X024G/R, X053G, X078N, X097A, X101N, X128A/S, e X217Q/L. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que compreende pelo menos seis substituições de aminoácido selecionadas do grupo que consiste em X024G/R, X053G, X078N, X097A, X101N, X128A/S, e X217Q/L. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que compreende um conjunto de substituições selecionadas do grupo que consiste em: (a) X128A/S e/ou X217L/Q, (b) G128A/S e/ou Y217L/Q, e (c) G097A, G128A/S, e Y217L/Q. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que compreende as substituições de aminoácido X024G/R+X053G+X078N+X101N+X128A/S+X217Q/L, sendo que a variante tem atividade proteolítica; e sendo que, opcionalmente, a va-

riante tem atividade proteolítica intensificada ou atividade de limpeza intensificada em comparação à protease descrita na SEQ ID nº 2, SEQ ID nº 4, ou SEQ ID nº 6 ou um índice de desempenho em um teste proteolítico (por exemplo, teste AAPF) ou um teste de limpeza (por exemplo, SLT, grama, ou teste em amostra de tecido com ovo) que é maior que o da protease descrita na SEQ ID nº 2, SEQ ID nº 4, ou SEQ ID nº 6.

[00115] Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode compreender pelo menos uma substituição de aminoácido selecionada a partir do grupo de S024G, S053G, S078N, S101N, G128A/S, e Y217Q. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que compreende as substituições de aminoácido S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q.

[00116] Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 65%, 70%, 80%, ou 85% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID nº 2. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 90% de identidade de sequência à SEQ. ID NO:2. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade de sequência à SEQ. ID NO:2. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 95% de identidade de sequência à SEQ. ID NO:2.

[00117] Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode ter atividade proteolítica intensificada em comparação à atividade proteolítica da protease descrita na SEQ ID nº 2. Uma va-

riante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode ter atividade proteolítica intensificada em comparação à atividade proteolítica da protease descrita na SEQ ID nº 4. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode ter atividade proteolítica intensificada em comparação à atividade proteolítica da protease descrita na SEQ ID nº 6. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode ter atividade de limpeza intensificada em comparação com a atividade de limpeza da protease descrita na SEQ ID nº 2, SEQ ID nº 4, ou SEQ ID nº 6. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode ter um índice de desempenho em um teste proteolítico (por exemplo, teste AAPF) ou um teste de limpeza (por exemplo, SLT, grama, ou teste em amostra de tecido com ovo) que é maior que o da protease descrita na SEQ ID nº 2, SEQ ID nº 4, ou SEQ ID nº 6.

[00118] Em um segundo aspecto, a invenção apresenta uma polipeptídeo variante de protease isolado ou que não tem ocorrência natural de uma protease original, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que compreende três substituições de aminoácido selecionadas do grupo que consiste em X024G/R, X053G, X078N, X101N, X128A/S, e X217L/Q, sendo que a variante tem atividade proteolítica e cada posição de aminoácido da variante é numerada por correspondência a uma posição de aminoácido na sequência de aminoácidos da SEQ ID nº 2 conforme determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante com SEQ ID nº 2. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode ter atividade proteolítica intensificada ou atividade de limpeza intensificada em comparação à protease descrita na SEQ ID nº 2, SEQ ID nº 4, ou SEQ ID nº 6. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode ter um índice de desempenho em um teste proteolítico (por exemplo, teste AAPF) ou um teste de limpeza (por exemplo, SLT, grama, ou tes-

te em amostra de tecido de ovo) que é maior que o da protease descrita na SEQ ID nº 2, SEQ ID nº 4, ou SEQ ID nº 6.

[00119] Uma variante de acordo com o segundo aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que compreende três substituições de aminoácido selecionadas do grupo que consiste em X024G/R, X053G, X078N, X101N, X128A/S, e X217L/Q, sendo que a variante tem atividade proteolítica e cada posição de aminoácido da variante é numerada por correspondência a uma posição de aminoácido na sequência de aminoácidos da SEQ ID nº 2 conforme determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante com SEQ ID nº 2. Uma variante de acordo com o segundo aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que compreende quatro substituições de aminoácido selecionadas do grupo que consiste em X024G/R, X053G, X078N, X101N, X128A/S, e X217L/Q. Uma variante de acordo com o segundo aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que compreende cinco substituições de aminoácido selecionadas do grupo que consiste em X024G/R, X053G, X078N, X101N, X128A/S, e X217L/Q. Uma variante de acordo com o segundo aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que compreende seis substituições de aminoácido selecionadas do grupo que consiste em X024G/R, X053G, X078N, X101N, X128A/S, e X217L/Q. Uma variante de acordo com o segundo aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que compreende, adicionalmente, uma substituição de aminoácido X097A. Uma variante de acordo com o segundo aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que compreende as substituições de aminoácido X024G/R+X053G+X078N+X101N+X128A/S+X217L/Q ou X097A+X128A/S+X217L/Q.

[00120] Uma variante de acordo com o segundo aspecto da in-

venção pode compreender uma sequência de aminoácidos que compreende as substituições de aminoácido S024G/R+S053G+S078N+S101N+G128A/S+Y217L/Q ou G097A+G128A/S+Y217L/Q. Uma variante de acordo com o segundo aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que compreende as substituições de aminoácido S024G+S053G+S078N+S101N+G128S+Y217Q ou S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q.

[00121] A sequência de aminoácidos de uma variante de acordo com o segundo aspecto da invenção pode compreender, adicionalmente, a substituição N109G. A sequência de aminoácidos de uma variante de acordo com o segundo aspecto da invenção pode compreender, adicionalmente, a substituição N076D. A sequência de aminoácidos de uma variante de acordo com o segundo aspecto da invenção pode compreender, adicionalmente, a substituição S033T. A sequência de aminoácidos de uma variante de acordo com o segundo aspecto da invenção pode compreender, adicionalmente, a substituição N243V. A sequência de aminoácidos de uma variante de acordo com o segundo aspecto da invenção pode compreender, adicionalmente, a substituição S248A. A sequência de aminoácidos de uma variante de acordo com o segundo aspecto da invenção pode compreender, adicionalmente, a substituição A088T. A sequência de aminoácidos de uma variante de acordo com o segundo aspecto da invenção pode compreender, adicionalmente, a substituição S063G. A sequência de aminoácidos da variante de acordo com o segundo aspecto da invenção pode compreender, adicionalmente, dois ou mais substituições selecionadas do grupo que consiste em N109G, N076D, S033T, N243V, S248A, A088T, e S063G.

[00122] A sequência de aminoácidos de uma variante de acordo com o segundo aspecto da invenção pode compreender uma sequên-

cia de aminoácidos que compreende as substituições de aminoácido S024G+S053G+S078N+S101N+G128S+Y217Q ou S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q e pode compreender, ainda, um conjunto de substituições de aminoácido selecionadas do grupo que consiste em:

A088T+N109G+A116T+G131H+N243V+L257G, S033T+N076D, S009T+N109G+K141R+N243V, S162G+K256R, N109G+A116T, N109G+L257G, S162G+L257G, N061G+N109G+N243V, N109G+N243V+S248A, S033T+N076D+N109G+N218S+N243V+S248N+K256R, N109G+A116T+N243V+K256R, A088T+N109G+A116T+G131H+N243V, A088T+N109G, N109G+N243V, T158S+L257G, N061S+N109G+N243V, P040A+N109G+N243V+S248N+K256R, S009T+S018T+Y021N+N109G+K141R, A088T+N109G+A116T+T158S+N243V+K256R, A088T+N109G+A116T+T158S+N218S+L257G, N109G+K256R, N109G+N243V+K256R, S063G+K256R, S063G+N109G, S063G, S063G+N076D, S033T+N076D+N218S, e N076D+N218S.

[00123] Uma variante de acordo com o segundo aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que compreende as substituições de aminoácido S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q e pode compreender, ainda, um conjunto de substituições de aminoácido selecionadas do grupo que consiste em:

A088T+N109G+A116T+G131H+N243V+L257G, S033T+N076D, S009T+N109G+A128S+K141R+N243V, S162G+K256R, N109G+A116T, N109G+L257G, S162G+L257G, N061G+N109G+N243V, N109G+A128S+N243V+S248A, S033T+N076D+N109G+A128S+N218S+N243V+S248N+K256R,

N109G+A116T+N243V+K256R,
 A088T+N109G+A116T+G131H+N243V, A088T+N109G,
 N109G+N243V, T158S+L257G, N061S+N109G+N243V,
 P040A+N109G+A128S+N243V+S248N+K256R,
 S009T+S018T+Y021N+N109G+A128S+K141R,
 A088T+N109G+A116T+T158S+N243V+K256R,
 A088T+N109G+A116T+T158S+N218S+L257G, N109G+K256R,
 N109G+A128S+N243V+K256R, S063G+K256R, S063G+N109G,
 S063G+A128S, S063G+N076D, S033T+N076D+A128S+N218S, e
 N076D+N218S, sendo que a variante tem atividade proteolítica e cada
 posição de aminoácido da variante é numerada por correspondência a
 uma posição de aminoácido na sequência de aminoácidos da SEQ ID
 nº 2 conforme determinado pelo alinhamento da sequência de ami-
 noácidos da variante com SEQ ID nº 2. Especialmente, por exemplo,
 uma variante de acordo com o segundo aspecto da invenção que
 compreende uma sequência que compreende as substituições
 S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q, e que compreendem,
 adicionalmente, o conjunto de substituições
 S009T+N109G+A128S+K141R+N243V, tem uma serina (S) na po-
 sição 128 porque a alanina na posição 128 (isto é, substituição
 G128A) é substituída por S (substituição A128S).

[00124] A sequência de aminoácidos de uma variante de acordo
 com o segundo aspecto da invenção pode ter pelo menos 60%, 65%,
 ou 70% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos
 da SEQ ID nº 2, SEQ ID nº 4, ou SEQ ID nº 6. A sequência de ami-
 noácidos de uma variante de acordo com o segundo aspecto da in-
 venção pode ter pelo menos 80% ou 85% de identidade de sequência
 com a sequência de aminoácidos da SEQ ID nº 2, SEQ ID nº 4, ou
 SEQ ID nº 6. A sequência de aminoácidos de uma variante de acordo
 com o segundo aspecto da invenção pode ter pelo menos 90%, 91%,

92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID nº 2, SEQ ID nº 4, ou SEQ ID nº 6.

[00125] A protease original, de acordo com o segundo aspecto da invenção, pode ser uma protease subtilisina. A protease original de acordo com o segundo aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID nº 2, SEQ ID nº 4, ou SEQ ID nº 6. Uma variante de acordo com o segundo aspecto da invenção pode ser uma variante de protease que tem uma forma madura. Uma variante de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode ser uma variante de protease que tem uma forma madura.

[00126] A invenção também fornece um polipeptídeo isolado (por exemplo, variante de protease) de acordo com o segundo aspecto da invenção que compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID nº 6 e que compreende um conjunto de substituições de aminoácido selecionadas do grupo que consiste em:

A088T+N109G+A116T+G131H+N243V+L257G,
S033T+N076D,
S009T+N109G+A128S+K141R+N243V,
S162G+K256R,
N109G+A116T,
N109G+L257G,
S162G+L257G,
N061G+N109G+N243V,
N109G+A128S+N243V+S248A,

S033T+N076D+N109G+A128S+N218S+N243V+S248N+K2
56R,

N109G+A116T+N243V+K256R,
A088T+N109G+A116T+G131H+N243V,
A088T+N109G,
N109G+N243V,
T158S+L257G,
N061S+N109G+N243V,
P040A+N109G+A128S+N243V+S248N+K256R,
S009T+S018T+Y021N+N109G+A128S+K141R,
A088T+N109G+A116T+T158S+N243V+K256R,
A088T+N109G+A116T+T158S+N218S+L257G,
N109G+K256R,
N109G+A128S+N243V+K256R,
S063G+K256R,
S063G+N109G,
S063G+A128S,
S063G+N076D,
S033T+N076D+A128S+N218S, e
N076D+N218S,

[00127] sendo que a variante tem atividade proteolítica e cada posição de aminoácido da variante é numerada por correspondência a uma posição de aminoácido na sequência de aminoácidos da SEQ ID nº 2 conforme determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante com SEQ ID nº 2. Tal polipeptídeo pode ter atividade proteolítica intensificada ou atividade de limpeza intensificada em comparação à protease descrita na SEQ ID nº 2, SEQ ID nº 4, ou SEQ ID nº 6. Tal polipeptídeo pode ter um índice de desempenho em um teste proteolítico (por exemplo, teste AAPF) ou um teste de limpeza (por exemplo, SLT, grama, ou teste em amostra de tecido com ovo)

que é maior que o da protease descrita na SEQ ID nº 2, SEQ ID nº 4, ou SEQ ID nº 6. Uma variante de acordo com o segundo aspecto da invenção pode ter atividade proteolítica intensificada em comparação com a atividade proteolítica da protease BPN' que tem a sequência da SEQ ID nº 2. Uma variante de acordo com o segundo aspecto da invenção pode ter atividade proteolítica intensificada em comparação com a atividade proteolítica da protease que tem a sequência da SEQ ID nº 4 ou SEQ ID nº 6. A protease original de uma variante de acordo com o segundo aspecto da invenção pode ser uma protease subtilisina e, opcionalmente, a protease subtilisina pode ser uma *espécie Bacillus*. A protease subtilisina original de uma variante de acordo com o segundo aspecto da invenção pode ser selecionada a partir do grupo que consiste em protease subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* (SEQ ID nº 2), *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. clausii*, *B. halodurans*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus*, *B. espécie TS-23*, *B. thuringiensis*, BPN'-v3 (SEQ ID NO4:), e BPN'-v36 (SEQ ID nº 6). Uma protease original de acordo com o segundo aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID nº 2, SEQ ID nº 4, ou SEQ ID nº 6.

[00128] Uma variante de acordo com o segundo aspecto da invenção pode ser uma variante de protease que tem uma forma madura. Uma protease original de acordo com o segundo aspecto da invenção pode ser uma protease que tem uma forma madura.

[00129] Uma variante de acordo com o segundo aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%,

94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência à SEQ. ID NO:2, SEQ ID n° 6, ou SEQ ID n° 4.

[00130] Em um terceiro aspecto, a invenção apresenta um polipeptídeo isolado ou que não tem ocorrência natural que tem atividade da protease, sendo que o dito polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com uma sequência de polipeptídeo selecionada do grupo que consiste em:

- a) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+A088T+N109G+A116T+G131H+N243V+L257G;
- b) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+S033T+N076D;
- c) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128S+Y217Q+S009T+N109G+K141R+N243V;
- d) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+S162G+K256R;
- e) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+N109G+A116T;
- f) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+N109G+L257G;
- g) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+S162G+L257G;
- h) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+N061G+N109G+N243V;
- i) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128S+Y217Q+N109G+N243V+S248A;
- j) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128S+Y217Q+

S033T+N076D+N109G+

N218S+N243V+S248N+K256R;

k) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+
N109G+A116T+N243V+

K256R;

l) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+
A088T+N109G+A116T+

G131H+N243V;

m) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+
A088T+N109G;

n) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+
N109G+N243V;

o) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+
T158S+L257G;

p) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+
N061S+N109G+N243V;

q) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128S+Y217Q+
P040A+N109G+N243V+

S248N+K256R;

r) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128S+Y217Q+
S009T+S018T+Y021N+

N109G+K141R;

s) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+
A088T+N109G+A116T+

T158S+N243V+K256R;

t) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+
A088T+N109G+A116T+

T158S+N218S+L257G;

u) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+
N109G+K256R;

v) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128S+Y217Q+N109G+N243V+K256R;

w) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+S063G+K256R;

x) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+S063G+N109G;

y) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128S+Y217Q+S063G;

z) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+S063G+N076D;

aa) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128S+Y217Q+S033T+N076D+N218S;

bb) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+N076D+N218S; e

cc) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q, sendo que cada posição de aminoácido da variante é numerado por correspondência com uma posição de aminoácido da sequência da SEQ ID nº 2. Uma variante de acordo com o terceiro aspecto da invenção pode ter atividade proteolítica intensificada ou atividade de limpeza intensificada em comparação à protease descrita na SEQ ID nº 2, SEQ ID nº 4, ou SEQ ID nº 6. Uma variante de acordo com o terceiro aspecto da invenção pode ter um índice de desempenho em um teste proteolítico (por exemplo, teste AAPF) ou um teste de limpeza (por exemplo, SLT, grama, ou teste em amostra de tecido com ovo) que é maior que o da protease descrita na SEQ ID nº 2, SEQ ID nº 4, ou SEQ ID nº 6.

[00131] Um polipeptídeo acordo com o terceiro aspecto da invenção pode compreender ou consistir na sequência de aminoácidos descrita em qualquer um de a) a cc) acima ou um fragmento de qualquer um dos mesmos, que tem atividade proteolítica. Uma variante ou protease

original acordo com o terceiro aspecto da invenção pode estar sob uma forma madura.

[00132] Em um quarto aspecto, a invenção apresenta um polipeptídeo isolado ou que não tem ocorrência natural, que tem atividade da protease, selecionado do grupo que consiste em: (a) um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de polipeptídeo da SEQ ID n° 6; (b) um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo que hibridiza pelo menos sob condições de alta estrringência com (i) a sequência de polinucleotídeo da SEQ ID n° 5 ou (ii) uma sequência de polinucleotídeo complementar de (i); e (c) um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo que compreende uma sequência de nucleotídeo que tem pelo menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência a sequência de polinucleotídeo da SEQ ID n° 5. Um polipeptídeo de acordo com o quarto aspecto da invenção pode compreender ou consistir na sequência de aminoácidos da SEQ ID n° 6, ou um fragmento da mesma que tem atividade proteolítica. A variante de acordo com o quarto aspecto da invenção pode ter atividade proteolítica e/ou desempenho de limpeza ou atividade aumentados em comparação aos da BPN' madura (SEQ ID n° 2). A variante de acordo com o quarto aspecto da invenção pode ter atividade proteolítica e/ou desempenho de limpeza ou atividade aumentados em comparação aos de SEQ ID n° 4 ou SEQ ID n° 6. Uma variante ou protease original acordo com o quarto aspecto da invenção pode estar sob uma forma madura.

[00133] Em um quinto aspecto, a invenção apresenta uma variante de protease isolada ou que não tem ocorrência natural de uma protease original, em que: (a) a variante compreende uma sequência de aminoácidos que tem não mais que 25, 20, 15, ou 10 alterações em relação à protease original, sendo que (i) as alterações são independen-

temente selecionadas a partir de uma inserção, uma deleção, ou uma substituição, e (ii) as alterações incluem uma substituição de glicina nas posições 24 e 53, uma substituição de asparagina nas posições 78 e 101, uma substituição de alanina ou serina na posição 128, e uma substituição de glutamina na posição 217, (b) a protease original tem pelo menos 90% de identidade de sequência à SEQ. ID NO:2, (c) a sequência de aminoácidos da SEQ ID n° 2 é usada para determinar a numeração da posição; e (d) a variante tem atividade proteolítica aumentada em relação à protease original, sendo que cada posição de aminoácido é numerada por correspondência a uma posição de aminoácido da sequência da SEQ ID n° 2. A sequência de aminoácidos de uma variante de acordo com o quinto aspecto da invenção pode ter pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID n° 2, SEQ ID n° 4, ou SEQ ID n° 6.

[00134] A protease original de acordo com o quinto aspecto da invenção pode ter pelo menos 80%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade com a sequência da SEQ ID n° 2, SEQ ID n° 4, ou SEQ ID n° 6. A protease original de acordo com o quinto aspecto da invenção pode ser uma protease que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID n° 2. Uma variante ou protease original de acordo com o quinto aspecto da invenção pode estar sob uma forma madura.

[00135] A sequência de aminoácidos de uma variante de acordo com o quinto aspecto da invenção pode compreender, adicionalmente, a substituição N109G. A sequência de aminoácidos de uma variante de acordo com o quinto aspecto da invenção pode compreender, adicionalmente, a substituição N076D. A sequência de aminoácidos de uma variante de acordo com o quinto aspecto da invenção pode compreender, adicionalmente, a substituição S033T. A sequência de aminoácidos de uma variante de acordo com o quinto aspecto da in-

venção pode compreender, adicionalmente, a substituição N243V. A sequência de aminoácidos de uma variante de acordo com o quinto aspecto da invenção pode compreender, adicionalmente, a substituição S248A. A sequência de aminoácidos de uma variante de acordo com o quinto aspecto da invenção pode compreender, adicionalmente, a substituição A088T. A sequência de aminoácidos de uma variante de acordo com o quinto aspecto da invenção pode compreender, adicionalmente, a substituição S063G.

[00136] A sequência de aminoácidos de uma variante de acordo com o quinto aspecto da invenção pode compreender, adicionalmente, um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em: A088T+N109G+A116T+G131H+N243V+L257G, S033T+N076D, S009T+N109G+K141R+N243V, S162G+K256R, N109G+A116T, N109G+L257G, S162G+L257G, N061G+N109G+N243V, N109G+N243V+S248A, S033T+N076D+N109G+N218S+N243V+S248N+K256R, N109G+A116T+N243V+K256R, A088T+N109G+A116T+G131H+N243V, A088T+N109G, N109G+N243V, T158S+L257G, N061S+N109G+N243V, P040A+N109G+N243V+S248N+K256R, S009T+S018T+Y021N+N109G+K141R, A088T+N109G+A116T+T158S+N243V+K256R, A088T+N109G+A116T+T158S+N218S+L257G, N109G+K256R, N109G+N243V+K256R, S063G+K256R, S063G+N109G, S063G, S063G+N076D, S033T+N076D+N218S, e N076D+N218S.

[00137] A protease original de acordo com o quinto aspecto da invenção pode ser uma protease subtilisina. A protease original de acordo com o quinto aspecto da invenção pode ser a BPN' apresentada na SEQ ID nº 2. A variante de acordo com o quinto aspecto da invenção pode ter atividade proteolítica e/ou desempenho de limpeza ou ativi-

dade aumentados em comparação aos de SEQ ID n° 4 ou SEQ ID n° 6.

[00138] Em um sexto aspecto, a invenção apresenta uma variante de protease isolada ou que não tem ocorrência natural de uma protease original, sendo que (a) a variante compreende uma sequência de aminoácidos (i) que tem pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, ou 97% de identidade com a sequência da SEQ ID n° 2 e (ii) que compreende uma substituição de glicina nas posições 24 e 53, uma substituição de asparagina nas posições 78 e 101, uma substituição de alanina ou serina na posição 128, e uma substituição de glutamina na posição 217; (b) a protease original tem pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência à SEQ. ID NO:2; (c) cada posição de aminoácido da variante é numerado por correspondência com uma posição do aminoácido da sequência da SEQ ID n° 2; e (d) a variante tem atividade proteolítica aumentada em relação à protease original. A protease original de acordo com o sexto aspecto da invenção pode ser uma protease subtilisina. A protease original de acordo com o sexto aspecto da invenção pode ser uma protease que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID n° 2. A variante de acordo com o sexto aspecto da invenção pode ter atividade proteolítica e/ou atividade de limpeza aumentadas em comparação com a atividade proteolítica e/ou atividade de limpeza, respectivamente, da protease original.

[00139] A sequência de aminoácidos de uma variante de acordo com o sexto aspecto da invenção pode compreender, adicionalmente, a substituição N109G. A sequência de aminoácidos de uma variante de acordo com o sexto aspecto da invenção pode compreender, adicionalmente, a substituição N076D. A sequência de aminoácidos de uma variante de acordo com o sexto aspecto da invenção pode compreender, adicionalmente, a substituição S033T. A sequência de ami-

noácidos de uma variante de acordo com o sexto aspecto da invenção pode compreender, adicionalmente, a substituição N243V. A sequência de aminoácidos de uma variante de acordo com o sexto aspecto da invenção pode compreender, adicionalmente, a substituição S248A. A sequência de aminoácidos de uma variante de acordo com o sexto aspecto da invenção pode compreender, adicionalmente, a substituição A088T. A sequência de aminoácidos de uma variante de acordo com o sexto aspecto da invenção pode compreender, adicionalmente, a substituição S063G.

[00140] A sequência de aminoácidos de uma variante de acordo com o sexto aspecto da invenção pode compreender, adicionalmente, um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em: A088T+N109G+A116T+G131H+N243V+L257G, S033T+N076D, S009T+N109G+K141R+N243V, S162G+K256R, N109G+A116T, N109G+L257G, S162G+L257G, N061G+N109G+N243V, N109G+N243V+S248A, S033T+N076D+N109G+N218S+N243V+S248N+K256R, N109G+A116T+N243V+K256R, A088T+N109G+A116T+G131H+N243V, A088T+N109G, N109G+N243V, T158S+L257G, N061S+N109G+N243V, P040A+N109G+N243V+S248N+K256R, S009T+S018T+Y021N+N109G+K141R, A088T+N109G+A116T+T158S+N243V+K256R, A088T+N109G+A116T+T158S+N218S+L257G, N109G+K256R, N109G+N243V+K256R, S063G+K256R, S063G+N109G, S063G, S063G+N076D, S033T+N076D+N218S, e N076D+N218S.

[00141] A variante de acordo com o sexto aspecto da invenção pode ter atividade proteolítica e/ou desempenho de limpeza ou atividade aumentados em comparação àqueles da SEQ ID n° 2, SEQ ID n° 4, ou SEQ ID n° 6. Uma variante de acordo com o sexto aspecto da in-

venção pode ter um índice de desempenho em um teste proteolítico (por exemplo, teste AAPF) ou um teste de limpeza (por exemplo, SLT, grama, ou teste em amostra de tecido com ovo) que é maior que o da protease descrita na SEQ ID nº 2, SEQ ID nº 4, ou SEQ ID nº 6. Uma variante ou protease original acordo com o sexto aspecto da invenção pode estar sob uma forma madura.

[00142] Em um sétimo aspecto, a invenção apresenta uma variante de protease isolada ou que não tem ocorrência natural da protease subtilisina BPN' que tem a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID nº 2, a dita variante de protease sendo selecionada do grupo que consiste em:

[00143] (a) uma variante de protease que compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a sequência de aminoácidos da SEQ ID nº 2, a dita variante tendo atividade proteolítica aumentada e/ou atividade de limpeza aumentada em comparação com a protease da SEQ ID nº 2 e/ou SEQ ID nº 4, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2 e sendo que a dita variante compreende pelo menos um conjunto de substituição(ões) de aminoácido em relação a SEQ ID nº 2 selecionado a partir dos grupos (i) a (x):

(i) G097A-G128A-P210S-Y217Q-N218A e G097A-G128A-P210S-Y217Q;

(ii) S063T-S078N-G097A-S101A-G128A-S183T-Y217Q-T244N, N061A-S078N-G097A-G128A-Y217Q-S224A, S053G-S078N-G097A-G128A-P129T-Q185T-Y217Q, S063T-S078N-G097A-S101A-G128A-S183T-Y217Q, S063T-S078N-G097A-S101A-G128A-Y217Q, S063T-S078N-G097A-S101A-G128A-Y217Q-T244I, e S078N-G097A-G128A-P129T-Y217Q;

(iii) S063T-S078N-G097A-S101A-G128A-S183T-Y217Q,

S063T-S078N-G097A-S101A-G128A-S183T-Y217Q-T244N, S063T-S078N-G097A-S101A-G128A-Y217Q, e S063T-S078N-G097A-S101A-G128A-Y217Q-T244I;

(iv) G097A-I111V-M124V-Y217Q, G097A-I111V-Y167A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-G097A-S101N-G128S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128S-V203Y-Y217Q, e V068A-A092G-Y217Q;

(v) N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-G128S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-I111V-G128S-Y217Q;

(vi) N061P-G097A-G128S-Y217Q, N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-S101N-I111V-Y217Q, S024G-N025G-N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-G128S-Y217Q, e S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-I111V-G128S-Y217Q;

(vii) N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S038G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-N061P-S078N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, N061P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-G097A-S101N-G128A-

Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-N061P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-S053G-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-T055P-N061P-G097A-G128A-Y217Q, S053G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S053G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q-S249N, S053G-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S053G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S053G-T055P-N061P-S101N-G128A-Y217Q, S053G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, e T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q;

(viii) S024G-N025G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S053G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, e T055P-N061P-S078N-G128A-Y217Q;

(ix) N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N061P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q,

N025G-S053G-N061P-S078N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S053G-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-G097A-G128A-Y217Q; e

(x) S024G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S101N-G128A-Y217Q, N025G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S053G-T055P-N061P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A, S053G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A, N061P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-S101N-G128A-Y217Q, N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, T055P-N061P-S078N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S038G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G128A-Y217Q, N025G-S053G-N061P-S078N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G128A-Y217Q,

S024G-N025G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S053G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q-S249N, N025G-S053G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, T055P-N061P-G097A-A116S-G128A, S024G-N025G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, G097A-G128S-Y217Q, S024G-S053G-N061P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S053G-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-T055P-N061P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-S038G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S053G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S053G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, N025G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-S053G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S078N-G097A-G128A-Y217Q, e S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-G128A-S130G-Y217Q; e

[00144] (b) uma variante de protease que compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a sequência de aminoácidos da SEQ ID nº 6, a dita variante tendo atividade proteolítica aumentada e/ou atividade de limpeza aumentada em comparação com a SEQ ID nº 2, SEQ ID nº 4 e/ou SEQ ID nº 6, sendo que as posições de

aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID n° 2 e sendo que a dita variante compreende pelo menos um conjunto de substituição(ões) de aminoácido em relação a SEQ ID n° 6 selecionado a partir dos grupos (i) a (xv):

(i) pelo menos uma substituição em relação à SEQ ID n° 6 selecionada do grupo que consiste em A116V, G160S, I111L, I115V, N109S, N117M, P005G, Q059V, T164S, Y262M, A015Q, A015S, A098E, A098N, A098S, A098T, A098V, A098Y, A114S, A114T, A116G, A116L, A116S, A116T, A116W, A133G, A133H, A133T, A133V, A137G, A137I, A137L, A137S, A137T, A138S, A216E, A216F, A216V, D099S, D181E, F261A, F261Q, G024F, G024I, G024Q, G024Y, G097S, G160T, G211L, G211V, H017F, H017W, H039V, H226A, I031V, I111V, I268V, K170R, K265R, L016Q, L016T, L135M, L209T, L209V, L233M, L257T, L257V, L267A, L267V, N025A, N025I, N025Q, N025R, N025T, N025V, N101I, N101Q, N101S, N109A, N109G, N109H, N109L, N109M, N109Q, N109T, N117Q, N184A, N184L, N184T, N184W, N212G, N212L, N212V, N243P, N252G, N252M, P005T, P014S, P040G, P040L, P040Q, P129A, P129S, P172G, P172S, P194Q, P210A, P210S, Q185F, Q185G, Q185I, Q185M, Q185N, Q185S, Q275H, R186K, S009A, S009G, S009H, S009M, S018T, S130T, S132N, S145K, S159T, S161I, S161K, S161N, S161T, S162I, S162M, S162Y, S163G, S182F, S182G, S182V, S182W, S183F, S183L, S183M, S183T, S183V, S183W, S224A, S236T, S249V, T022A, T022G, T022Q, T022V, T208V, T242S, T253N, T253S, T254A, T254S, T255L, T255S, T255V, V004A, V004P, V004W, V084C, V139C, V165M, V203F, Y021K, Y021N, Y021T, Y021V, Y167F, Y171F, Y214F, Y262F, e Y262T;

(ii) pelo menos uma substituição em relação à SEQ ID n° 6 selecionada do grupo que consiste em A216E, L090I, A098R, A098W, A098Y, A116G, A116R, A116S, A133M, I107L, I115V, M124L,

N101I, N109H, N109S, N109T, N117R, P005G, Q185L, S089V, V095A, A015Y, A029G, A098D, A098E, A098G, A098N, A098S, A098T, A098V, A114S, A114T, A116E, A116L, A116T, A116V, A133H, A133L, A133S, A137G, A137I, A137L, A137S, A137V, A138S, A144S, A144V, A176S, A176T, A187T, A216F, A216P, A216Q, A216R, A216S, A216T, A216V, A216Y, D041E, D120A, D120E, D120Q, D120R, D120S, D181S, G020A, G020S, G024A, G097A, G097D, G097S, G131Q, G160S, G166I, G211L, G215N, H039N, H238N, I111L, I111V, I122A, L075I, L075Q, L135M, L209T, L209V, L233V, L235M, L235R, L257A, M119I, N025A, N025G, N025T, N061K, N101F, N101H, N101L, N101Q, N101R, N101S, N101T, N109A, N109G, N109K, N109L, N117E, N117H, N117K, N117S, N212G, N212S, N218F, N218G, N218H, N218L, N218S, N218W, N240Q, N252M, N252R, N252S, P005T, P040A, P040G, P040T, P129D, P129S, P194S, P210R, Q019R, Q019W, Q103L, Q103W, Q185A, Q185G, Q185M, Q185R, Q185T, Q206G, Q206Y, Q217A, Q217E, Q217R, Q217S, Q217T, S003Q, S009H, S018M, S033T, S130A, S130F, S130G, S130T, S130V, S145T, S159A, S161N, S161T, S162V, S162Y, S182L, S182W, S183F, S183L, S183V, S183W, S188K, S188W, S236Q, S236T, S248L, T022H, T022K, T208C, T253H, T255V, V044I, V121I, V139C, V143H, V143Q, V143T, V143W, V143Y, Y006K, Y021A, Y104W, A001F, A001G, A001H, A001K, A001L, A001Q, A001S, A001Y, A013V, A015G, A015K, A015R, A015S, A015T, A015W, A048S, A073N, A073S, A092S, A098K, A098P, A116D, A116W, A128S, A133P, A133T, A133V, A134G, A134S, A137H, A137N, A137T, A144D, A144K, A144L, A144M, A144N, A144R, A179G, A179S, A187V, A216G, A216L, A216W, A223S, A230C, A272K, A272L, A272P, A272S, A272T, A272W, A273G, A273S, A274G, A274M, A274T, D120K, D140E, D181A, D181E, D181G, D181H, D181T, D259E, D259N, D259Q, E054D,

E156D, E156T, E251L, E251T, E251V, F058Y, F189W, F261K, F261Q, F261R, G007A, G007S, G020F, G020H, G020N, G020Q, G020T, G020Y, G024F, G024Q, G024R, G024T, G024V, G024W, G024Y, G053T, G097K, G097M, G097R, G097T, G131A, G131H, G131P, G131R, G131T, G131V, G160H, G160T, G166C, G166Q, G166S, G166T, G211A, G211D, G211K, G211M, G211N, G211Q, G211R, G211V, G211W, G215S, G215T, G215W, H017T, H017W, H017Y, H039V, H226A, H226F, H226I, H226L, H226M, H226V, I035V, I079A, I079S, I108V, I205V, I234L, I234V, I268V, K012S, K043P, K136H, K136R, K141A, K141F, K141T, K141W, K170A, K170G, K170R, K213A, K213R, K213S, K237A, K237H, K237L, K237S, K237V, K256A, K256G, K256H, K256M, K256P, K256Q, K256R, L016A, L016Q, L016T, L016V, L042V, L075M, L075T, L082M, L082V, L135F, L196I, L209H, L209Q, L209R, L209S, L209W, L233A, L233M, L233Q, L235I, L235K, L250I, L257S, L257T, L257V, L267A, L267Q, L267T, L267V, M119C, M199V, N025C, N025E, N025F, N025I, N025K, N025L, N025M, N025Q, N025V, N025Y, N061F, N061P, N061S, N061T, N076G, N078S, N101A, N109M, N109Q, N109R, N117A, N117M, N117Q, N118D, N118G, N118H, N118Q, N118R, N118S, N184A, N184C, N184G, N184L, N184R, N184S, N184T, N184V, N184W, N212C, N212F, N212I, N212K, N212L, N212P, N212Q, N212R, N212V, N212W, N212Y, N218A, N218P, N218T, N240A, N240E, N240G, N240H, N240L, N240R, N240S, N240T, N243C, N243Q, N243T, N243V, N252A, N252G, N252K, N252Q, P014G, P014Q, P014R, P014S, P014T, P040F, P040L, P040Q, P040S, P040V, P086C, P086H, P086S, P129A, P129E, P129G, P129K, P129R, P172A, P172K, P172Q, P172S, P194A, P194G, P194H, P194L, P194M, P194Q, P194R, P194V, P194W, P194Y, P210A, P210G, P210L, P210S, P239K, P239R, Q002A, Q002S, Q010A, Q010N, Q010R, Q010T, Q019A, Q019C, Q019D, Q019G,

Q019S, Q019T, Q019V, Q059I, Q059V, Q103S, Q185F, Q185H, Q185I, Q185K, Q185N, Q185S, Q185Y, Q206H, Q206L, Q206P, Q206W, Q217F, Q217H, Q217I, Q217K, Q217L, Q217N, Q217V, Q271G, Q271R, Q271T, Q275F, Q275P, Q275R, R186A, R186I, R186K, S003A, S003F, S003G, S003H, S003K, S003R, S003T, S009T, S018N, S018T, S037G, S037T, S037V, S038G, S038Q, S063N, S063Q, S063T, S089M, S089N, S130K, S130L, S130R, S130W, S132N, S145G, S145K, S145M, S145R, S145V, S159C, S159H, S159L, S159Q, S159R, S159T, S159W, S161A, S161C, S161G, S161H, S161I, S161K, S161P, S161Q, S161R, S162F, S162G, S162I, S162L, S162M, S162N, S162P, S162R, S163G, S173A, S173G, S182F, S182G, S182K, S182N, S182Q, S182V, S183A, S183M, S183Q, S183R, S183T, S188A, S188F, S188G, S188P, S188R, S188T, S188V, S190C, S204A, S204G, S204I, S204L, S204Q, S204R, S204V, S207G, S224A, S224T, S236C, S236D, S236E, S236G, S236N, S248A, S248F, S248K, S248M, S248T, S249A, S249R, S249T, S249V, S249W, S249Y, S260G, S260H, S260K, S260N, T022A, T022G, T022Q, T022S, T022V, T022Y, T055A, T055K, T158A, T158S, T208L, T208S, T208V, T220S, T242D, T242N, T242S, T244E, T244G, T244I, T244R, T244V, T244W, T253A, T253G, T253N, T253S, T254S, T254V, T255H, T255I, T255K, T255L, T255Q, T255R, T255S, T255Y, V004A, V004N, V004P, V004W, V008A, V008M, V026I, V045S, V045W, V051I, V081Q, V081T, V084C, V093I, V095C, V143A, V143E, V143F, V143N, V143S, V147I, V147L, V147S, V147T, V148I, V149C, V149I, V165M, V180A, V180C, V180I, V180L, V180T, V192A, V192C, V192I, V192S, V192T, V192Y, V198L, V203A, V203F, V203K, V203L, V203M, V203N, V203Y, W241Y, Y006A, Y006G, Y006H, Y006L, Y006N, Y006P, Y006Q, Y006T, Y021E, Y021K, Y021L, Y021N, Y021Q, Y021R, Y021S, Y021T, Y104F, Y104I, Y104V, Y171F, Y214F, Y214L, Y214W, Y262F, e Y262S;

(iii) pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido em relação à SEQ ID nº 6 selecionado do grupo que consiste em A088T-L257G, A116T-A128S, N061S-N109G-A128S-N243V-S260P, S009T-N109G-A128S-K141R-N243V, S009T-S018T-Y021N-N109G-A128S-K141R, e S162G-K256R;

(iv) pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido em relação à SEQ ID nº 6 selecionado do grupo que consiste em A116T, A088T-N243V, G024E-A116T, K043Y, N076D-A116T, N218S-S248N, S033T-N243V, S033T-S063G, S248N-L257G, A001E-S249A, A088T-A116T, A088T-A128S, A088T-G131H, A088T-L257G, A088T-N109G, A088T-S248N, A088T-S249A, A116T-N243V, A116T-T158S, A128S, A128S-K256R, A128S-L257G, A128S-N243V, A128S-S248N, A128S-T158S, G024E-A088T, G024E-A128S, G024E-G131H, G024E-K256R, G024E-L257G, G024E-N218S, G024E-N243V, G024E-S162G, G024E-S249A, G024E-T158S, G131H, G131H-K256R, G131H-S249A, K043Y-A088T, K043Y-A116T, K256R, N076D-K256R, N109G, N109G-A116T, N109G-A128S, N109G-A128S-N243V-K256R, N109G-A128S-N243V-S248A, N109G-G131H, N109G-K256R, N109G-L257G, N109G-N218S, N109G-N243V, N109G-S248N, N218S-L257G, N243V, N243V-K256R, N243V-L257G, N243V-S248N, N243V-S249A, Q103H-A128S, Q103H-G131H, Q103H-K256R, Q103H-L257G, Q103H-N243V, Q103H-S248N, Q103H-S249A, Q103H-T158S, Q206D-N243V, S033T-A128S, S033T-K256R, S033T-N076D, S033T-N218S, S033T-S248N, S033T-T158S, S063G-A128S, S063G-K256R, S063G-N243V, S063G-S162G, S063G-T158S, S162G-K256R, S248N-K256R, S249A, T158S-N243V, e T158S-S249A;

(v) pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido em relação à SEQ ID nº 6 selecionado do grupo que consiste em A088T-L257G, G024E-K256R, G024E-L257G, N109G-A116T, N109G-L257G, N243V-K256R, S033T-N109G, S033T-T158S,

S063G-L257G, A001E-L257G, A088T-A128S, A088T-G169A, A088T-K256R, A088T-N109G, A088T-N218S, A088T-N243V, A088T-S248N, A088T-T158S, A116T, A116T-A128S, A116T-G131H, A116T-K256R, A116T-L257G, A116T-N218S, A116T-S162G, A116T-T158S, A128S, A128S-G169A, A128S-K256R, A128S-L257G, A128S-N218S, G024E, G024E-A128S, G024E-G131H, G024E-N109G, G024E-N243V, G024E-S033T, G024E-S063G, G024E-S248N, G024E-S249A, G024E-T158S, G131H, G131H-G169A, G131H-K256R, G131H-N218S, G131H-S249A, G169A, G169A-L257G, G169A-N243V, K043Y-A088T, K043Y-N109G, K256R, K256R-L257G, N061G-N109G-N243V, N076D-N109G, N109G, N109G-A128S, N109G-G131H, N109G-K256R, N109G-N218S, N109G-S162G, N109G-S248N, N109G-S249A, N109G-T158S, N218S, N218S-K256R, N218S-L257G, N218S-S248N, N243V, N243V-L257G, N243V-S248N, N243V-S249A, P040A-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, Q103H-K256R, Q103H-L257G, Q103H-N109G, S009T-S018T-Y021N-N109G-A128S-K141R, S033T-A088T, S033T-A116T, S033T-A128S, S033T-G131H, S033T-K043Y, S033T-K256R, S033T-L257G, S033T-N076D, S033T-N218S, S033T-N243V, S033T-Q103H, S033T-S063G, S033T-S162G, S033T-S248N, S033T-S249A, S063G, S063G-A088T, S063G-A116T, S063G-A128S, S063G-G131H, S063G-K256R, S063G-N109G, S063G-N218S, S063G-N243V, S063G-S248N, S063G-S249A, S063G-T158S, S162G-K256R, S162G-N218S, S162G-N243V, S162G-S248N, S162G-S249A, S248N, S249A, S249A-L257G, T158S, T158S-L257G, e T158S-N243V;

(vi) pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido em relação à SEQ ID nº 6 selecionado do grupo que consiste em T158S-L257G, K256R, L257G, S033T-N109G, S162G-K256R, S162G-L257G, G024E-K256R, G024E-L257G, G024E-S033T, N109G-A116T, N218S-L257G, S033T-A088T, S033T-A116T, S033T-

N243V, S033T-Q103H, S162G-N218S, S162G-N243V, T158S, T158S-N218S, T158S-N243V, A088T, A088T-G169A, A088T-K256R, A088T-L257G, A088T-S162G, A088T-T158S, A116T-K256R, A116T-L257G, A116T-N243V, A128S-L257G, A128S-N218S, A128S-N243V, A128S-S248N, G024E-A116T, G024E-A128S, G024E-G131H, G024E-N243V, G024E-S248N, G024E-S249A, G024E-T158S, G131H-N243V, G131H-T158S, G169A-N218S, G169A-N243V, G169A-S248N, K256R-L257G, N109G-A128S, N109G-G131H, N109G-N218S, N109G-N243V, N109G-S249A, N218S, N218S-K256R, N218S-N243V, N218S-S249A, N243V, N243V-K256R, N243V-L257G, N243V-S248N, Q103H-N109G, Q103H-N218S, S033T-A128S, S033T-L257G, S033T-N218S, S033T-S162G, S033T-S248N, S033T-T158S, S063G-K256R, S063G-L257G, S162G, S162G-G169A, S162G-S248N, S248N, S248N-K256R, S248N-L257G, S249A, T158S-S162G, e T158S-S248N;

(vii) pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido em relação à SEQ ID nº 6 selecionado do grupo que consiste em S033T-N076D-A128S-N218S, A001E-S033T-N109G-N218S, S033T-N218S, S033T-S063G-Q103H-N109Q-A128S-G131H-G169A-N243V, A128S-G169A, S033T-S063G-Q103H-N109Q-A128S-G131H-G169A-N243P, S018T-Y021N-S033T-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, S033T-A128S-G131H-N243P, P040E-N109G-A128S-G131H, S033T-A128S, S033T-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, N109G-G169A, S063G-N109G-A128S-G131H, G169A, N109G-A128S-G131H-N243V-S248N-K256R, S033T-A128S-G131H-N243V, A128S-N218S, A001E-G169A, A088T-G169A, G169A-L257G, N109G-N218S, S033T-N109G-A128S-N243P-S248N-K256R, G169A-K256R, N076D-G169A, A001E-G131H-G169A-N243V, G169A-S249A, S033T-N109G, G169A-S248N, K043Y-G169A, K043Y-N218S, N218S-L257G, N218S-N243V, S063G-G169A, A001E-A128S-G131H-N243V, A001E-S033T-N109G-N243V, A088T-N218S, G024E-N218S, G024E-S033T,

G169A-Q206D, N076D-N218S, S033T-L257G, S162G-G169A, A001E-N218S, A116T-N218S, G169A-N243V, N218S, P040A-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, S033T-N076D, A001E-S033T, A128S-G131H, N218S-S248N, S018T-Y021N-N109G-A128S, S033T-K043Y, S033T-N243V, S033T-Q206D, S063G-N218S, S162G-N218S, T158S-G169A, A116T-G169A, G131H-G169A, N061S-N109G-A128S-S260P, N109G-A128S-N243V-K256R, N109G-A128S-N243V-S248A, N109G-A128S-N243V-S248A-K256R, N109G-A128S-N243V-S248N-K256R-L257G, N218S-K256R, S009T-N109G-A128S-K141R, S009T-S018T-Y021N-N109G-A128S-K141R, S033T-A088T, S033T-S063G, S033T-S162G, T158S-N218S, A001E-N076D-N109G-A128S, N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, N109G-A128S-S248N-K256R, S009T-N109G-A128S-K141R-N243V, S018T-Y021N-N061S-N109G-A128S-S260P, S033T-A116T, S033T-S248N, S033T-S249A, S033T-T158S, G131H-N218S, N109A-A128S-N243V-K256R, N109G-A128S, N109G-A128S-S162G-N243V-S248N-K256R, N109G-A128S-T158S-N243V-S248N-K256R, N218S-S249A, Q206D-N218S, S018T-Y021N-N109G-A128S-N243V, S018T-Y021N-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, S033T-K256R, A116T-A128S, N061S-N109G-A128S-N243V-S260P, N109G-A128S-N243V-S248N, S009T-N109G-A128S-K141R-N243V-S248N-K256R, G024E-A128S, N061S-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R-S260P, N109S-A128S-N243V-K256R, S033T, S033T-G131H, A001E-A128S, A128S, A128S-L257G, A128S-Q206D, N109Q-A128S-N243V-K256R, S009T-A128S-K141R-N243V, S009T-S018T-Y021N-A128S-K141R-N243V, A088T-A128S, A128S-K256R, A128S-N243V, N061P-N109G-N243V, N061S-A128S-N243V-S260P, S018T-Y021N-A128S-N243V, A128S-N243V-S248N-K256R, A128S-S248N, A128S-S249A, N076D-A128S, S063G-A128S, A128S-S162G, A128S-T158S, S018T-Y021N-N061S-A128S-N243V-S260P, S033T-Q103H-A128S-G131H, N061S-N109G-N243V, K043Y-A128S, N061P-N109G-G131H-N243V, N109G-

L257G, A001E-G024E-S204E-Q206D, A001E-L257G, A088T-N109G, G024E-N109G, K043Y-N109G, N061G-N109G-N243V, N076D-N109G, N109G, N109G-A116T, N109G-K256R, N109G-N243V-K256R, N109G-N243V-S248A-K256R, N109G-Q206D, S063G-N109G, A001E-A116T, A001E-N109G, A001E-Q206D, A088T-A116T, A088T-N243V, A116T-L257G, G024E-A116T, G024E-L257G, G024E-N243V, G024E-Q206D, N109G-G131H, N109G-N243V, N109G-S162G, N109G-S248N, N109G-S248N-K256R, N109G-S249A, N109G-T158S, N243V-L257G, A001E-A088T, A001E-G024E, A001E-K256R, A001E-N076D, A001E-N243V, A088T, A088T-L257G, A088T-Q206D, A116T, A116T-K256R, A116T-N243V, G024E-A088T, G024E-K043Y, G024E-K256R, G024E-N076D, G024E-S162G, G024E-S248N, K043Y-A088T, K043Y-A116T, K043Y-L257G, K043Y-N243V, K043Y-Q206D, K256R-L257G, N076D-A116T, N076D-L257G, N076D-N243V, N076D-Q206D, N109G-N243V-S248N, N109G-N243V-S248N-K256R, N243V-K256R, Q206D, Q206D-L257G, Q206D-N243V, Q206D-S248N, S063G-K256R, S063G-L257G, T158S-L257G, A001E, A001E-K043Y, A001E-S162G, A001E-S248N, A001E-S249A, A001E-T158S, A088T-K256R, A088T-S162G, A088T-S248N, A088T-S249A, A116T-Q206D, A116T-S248N, A116T-S249A, G024E, G024E-G131H, G024E-S249A, G024E-T158S, G131H, G131H-K256R, G131H-L257G, K043Y-K256R, K043Y-N076D, K256R, L257G, N076D-A088T, N076D-K256R, N076D-S162G, N076D-S248N, N076D-S249A, N109G-N243P-S248A-K256R, N109G-N243P-S248N-K256R, N243V, Q206D-K256R, S033T-P040E-Q103H-N109G, S063G, S063G-A116T, S063G-Q206D, S162G-K256R, S162G-L257G, S162G-N243V, S162G-Q206D, S162G-S248N, S248N, S248N-L257G, S249A, S249A-L257G, T158S, T158S-N243V, e T158S-Q206D;

(viii) pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido em relação à SEQ ID nº 6 selecionado do grupo que

consiste em A088T-A116T-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-N243V-L257G, A088T-T158S-N218S-K256R, A088T-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-A153S-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-L257G, A114S-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-T158S-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-S248N-L257G, A088T-A116T-T158S, A088T-N109G-A116T-G131H-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-N243V-L257G, A088T-N109G-N243V-S248N, A088T-N109G-T158S-N243V-L257G, A088T-N109G-T158S-N243V-S248N-L257G, A116T-T158S-S248N-L257G, Y006H-A116T-G131H-S248N, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V, A088T-A116T-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N212D-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-V148A-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-K256R, A088T-N109G-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-T158S-K256R, A088T-N109G-T158S-N243V, A088T-T158S-N243V-K256R-L257G, A116T, A116T-N218S-N243V-L257G-N269S, A116T-T158S-K256R-L257G, N109G-A116T-K256R-L257G, N109G-A116T-N243V, N109G-A116T-T158S-N243V-K256R-L257G, N109G-G131H-L257G, N109G-G131H-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-K256R-L257G, S003P-A116T-T158S-S248N-K256R, T158S-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-N243V-K256R, A088T-A116T-G131H-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-

V147A-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-S248N-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S, A088T-A116T-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-L257G, A088T-G131H-N243V-L257G, A088T-G131H-T158S-S248N-L257G, A088T-L257G, A088T-N109G-A116T, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-W241R-S248N-K256R, A088T-N109G-K256R-L257G, A088T-N109G-L257G, A088T-N109G-N243V, A088T-N109G-N243V-K256R, A088T-N109G-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-S248N-K256R, A088T-N109G-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-T158S-N243V-K256R, A088T-N109G-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N243V-S248N-A274D, A088T-N109G-T158S-S248N-L257G, A088T-T158S-K256R, A088T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-T158S-N243V-L257G, A116T-G131H-N218S-N243V-S248N, A116T-G131H-S248N-L257G, A116T-S248N-K256R-L257G, A116T-T158S-N218S-N243V-K256R, A116T-T158S-N218S-S248N-L257G-Q271R, A116T-T158S-N243V-K256R-L257G, A116T-T158S-N243V-S248N-L257G, G131H-S248N, G131H-T158S-I234T-N243V-K256R, G131H-W241L-N243V-S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-A137V-T158S-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-A151S-N218S-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N, N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N, N109G-A116T-

S248N, N109G-A116T-T158S-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S-W241R-N243V, N109G-A116T-T158S-N243V-S248N-L257G, N109G-A116T-T158S-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-S248N-L257G, N109G-G131H-N218S-L257G, N109G-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G-A274T, N109G-K256R, N109G-N243V-L257G, N109G-T158S-N218S-K256R-L257G, N109G-T158S-N218S-L257G, N109G-T158S-S248N-K256R, P014L-A015L-L016C-H017T-S018L-Q019K-G020A-Y021T-T022L-G023E, S003F-A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-K256R-L257G, V004A-A088T-A116T-T158S-N218S, V004A-N109G-A116T-G131H-S248N-K256R-L257G, V004L-A116T-N218S-N243V-S248N-L257G, Y006H-N109G-N218S-N243V-S248N, A001T-A116T-T158S-N243V-L257G, A088T-A116T, A088T-A116T-G131H-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N243V-L257G, A088T-A116T-G131H-N243V-S248N, A088T-A116T-G131H-T158S-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-A273T, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-S248N, A088T-A116T-G131H-T158S-S248N-L257G, A088T-A116T-K256R, A088T-A116T-K256R-L257G, A088T-A116T-N218S-N243V-L257G, A088T-A116T-N243V-K256R, A088T-A116T-N243V-L257G, A088T-A116T-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-S248N-K256R, A088T-A116T-T158S-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R-N269S, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-

A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N243V-K256R, A088T-A116T-T158S-N243V-L257G, A088T-A116T-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-S248N-K256R, A088T-A116T-V143A-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-V147I-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-G131H-K256R-L257G, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N, A088T-G131H-N218S-S248N-L257G, A088T-G131H-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-K256R, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-S248N, A088T-G131H-T158S-N243V, A088T-G131H-T158S-N243V, A088T-G131H-T158S-N243V-S248N, A088T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-I107T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218T-N243V, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-

S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S, A088T-N109G-A116T-N218S-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-N218T-K256R, A088T-N109G-A116T-N218T-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N243V, A088T-N109G-A116T-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N243V-K256R-L257G-N269D, A088T-N109G-A116T-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-S248N, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N243V, A088T-N109G-G131H-N243V-L257G, A088T-N109G-G131H-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-L257G, A088T-N109G-L257G, A088T-N109G-N218S-K256R, A088T-N109G-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-

N109G-N243V-S248N-L257G-I268V, A088T-N109G-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-K256R, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-T158S-N243V-K256R-I268V, A088T-N109G-T158S-N243V-S248N-Q275R, A088T-N218S-N243V, A088T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N218S-S248N, A088T-N218S-S248N-L257G, A088T-N243V, A088T-N243V, A088T-N243V-K256R, A088T-N243V-L257G, A088T-S145T-T158S-S248N, A088T-T158S-L257G, A088T-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-T158S-N243V-K256R-L257G-Q271H, A088T-T158S-S248N, A088T-V143A-T158S-K256R, A116T-G131H-K256R, A116T-G131H-N218S, A116T-G131H-N243V, A116T-G131H-N243V-K256R, A116T-G131H-N243V-L257G, A116T-G131H-S248N-K256R, A116T-G131H-T158S-N218S-I234T-N243V-S248N-K256R, A116T-G131H-T158S-N243V-L257G, A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, A116T-G131H-V143F-T158S-N218S, A116T-L257G, A116T-N218S, A116T-N218S-L257G, A116T-N218S-N243V-L257G, A116T-N243V, A116T-N243V-K256R, A116T-N243V-S248N, A116T-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-S248N, A116T-T158S, A116T-T158S-N218S-N243V, A116T-T158S-N218S-S248N, A116T-T158S-N243V, A116T-T158S-N243V-K256R, A116T-T158S-N243V-L257G, A116T-T158S-N243V-S248N, A116T-T158S-S248N-K256R-L257G, A116T-V149I-T158S-N243V-S248N-K256R-Q271H, G131H-N218S-N243V-L257G, G131H-N243V, G131H-N243V-S248N-K256R, G131H-T158S, G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-N243V-K256R, N109G-A116T-G131H-N243V-L257G, N109G-A116T-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-S248N,

N109G-A116T-G131H-S248N-I268V, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-S248N, N109G-A116T-G131H-T158S-S248N-K256R, N109G-A116T-N218S, N109G-A116T-N218S-N243V-K256R, N109G-A116T-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-N218S-S248N-L257G, N109G-A116T-N243V-K256R, N109G-A116T-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-S248N-L257G, N109G-A116T-T158S-G211V-N243V-S248N-K256R, N109G-A116T-T158S-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S, N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-N243V, N109G-A116T-T158S-Q275R, N109G-G131H-A137V-T158S-N218S-S248N, N109G-G131H-N218S-K237N, N109G-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-G131H-N218S-S248N-K256R, N109G-G131H-N243V-K256R-L257G, N109G-G131H-S145F-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-G131H-S248N-K256R, N109G-G131H-S248N-L257G, N109G-G131H-T158S-K256R, N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, N109G-G131H-T158S-N243V, N109G-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-N243V-L257G, N109G-G131H-T158S-S248N-L257G, N109G-G131H-T158S-S248N-Q271R, N109G-N218S-L257G, N109G-N218S-N243V, N109G-N243V-K256R-L257G, N109G-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-T158S-I268V, N109G-T158S-K256R, N109G-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-T158S-N218S-S248N-L257G, N109G-T158S-N243V, N109G-T158S-N243V-K256R-L257G, N109G-T158S-N243V-S248N, N109S-A116T-S248N, N218S, N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, N218S-S248N-L257G, N243V, N243V-K256R, N243V-S248N-K256R, N243V-S248N-K256R-L257G, S105P-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, S248N, T158S-N243V-K256R, e T158S-

N243V-L257G;

(ix) pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido em relação a SEQ ID nº 6 selecionado do grupo que consiste em A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-L257G, A116T-N218S-N243V-L257G-N269S, A088T-A116T-K256R, A088T-G131H-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-A273T, A088T-A116T-N243V-L257G, A088T-A116T-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N243V-L257G, A088T-A116T-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-K256R-L257G, A088T-N109G-N218S-S248N-L257G, A088T-T158S-N218S-N243V-K256R-I268V, A088T-T158S-N218S-S248N-L257G, A116T-N218S-K256R-L257G, N109G-A116T, N109G-A116T-G131H-T158S-L257G, N109G-A116T-N243V, N109G-A116T-N243V-K256R, N109G-A116T-T158S-L257G, N109G-K256R, N109G-N243V-K256R-L257G, S003P-N109G-G131H-T158S-K256R, A088T-A116T, A088T-A116T-G131H-N218S-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-A116T-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-S248N-L257G, A088T-A116T-N218S-N243V-L257G, A088T-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R-Q275R, A088T-A116T-T158S-A216S-N218S-N243V-K256R-L257G,

A088T-A116T-T158S-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S-L257G,
A088T-A116T-T158S-N218S-N243V, A088T-A116T-T158S-N218S-
N243V-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G,
A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R-N269S, A088T-A116T-
T158S-N243V, A088T-A116T-T158S-N243V-K256R, A088T-A116T-
V147I-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-G131H-K256R-L257G,
A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-
S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-L257G, A088T-
G131H-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-I107T-N109G-A116T-
G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-I107T-N109G-G131H-
N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-A153S-N218S-
S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-K256R-L257G, A088T-
N109G-A116T-G131H-N218S-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-
G131H-N218S-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-
K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-L257G, A088T-
N109G-A116T-G131H-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-
S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S, A088T-
N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-
N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-
N109G-A116T-N218S-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-
L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V, A088T-N109G-A116T-
N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-N218T-K256R, A088T-
N109G-A116T-N218T-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N243V,
A088T-N109G-A116T-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-
N243V-K256R-L257G-N269D, A088T-N109G-A116T-T158S, A088T-
N109G-A116T-T158S, A088T-N109G-A116T-T158S-L257G, A088T-
N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-
A116T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-
T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-
S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-A138V-T158S-N218S-N243V-

S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-V149A-K256R-L257G, A088T-N109G-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-N243V, A088T-N109G-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-N243V-L257G, A088T-N109G-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-K256R, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-K256R-Q275R, A088T-N109G-T158S-N243V, A088T-N109G-T158S-N243V-K256R-I268V, A088T-N109G-T158S-N243V-L257G, A088T-N109G-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-N218S-N243V-L257G, A088T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N218S-S248N, A088T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-V143A-T158S-K256R, A088T-V147I-N218S-N243V-K256R-L257G, A114S-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, A116T-G131H-N243V-K256R, A116T-G131H-N243V-L257G, A116T-G131H-N243V-S248N-K256R, A116T-G131H-S248N-L257G, A116T-G131H-T158S-N218S-I234T-N243V-S248N-K256R, A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A116T-N218S-L257G, A116T-T158S-N218S-K256R-L257G, A116T-T158S-N218S-S248N, A116T-T158S-N218S-S248N-L257G-Q271R, A116T-T158S-N243V-S248N-L257G, A116T-T158S-S248N-L257G, G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, I107T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-A137V-T158S-S248N-K256R-

L257G, N109G-A116T-G131H-A151S-N218S-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-L257G, N109G-A116T-G131H-N243V-L257G, N109G-A116T-G131H-S248N-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-K256R-L257G, N109G-A116T-N218S-N243V-K256R, N109G-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-N218S-N243V-S248N-L257G, N109G-A116T-N243V-S248N-K256R, N109G-A116T-S248N-L257G, N109G-A116T-T158S-G211V-N243V-S248N-K256R, N109G-A116T-T158S-N218S, N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N, N109G-G131H-N218S-K237N, N109G-G131H-N218S-K256R-L257G, N109G-G131H-N218S-L257G, N109G-G131H-N218S-N243V-L257G, N109G-G131H-N243V-K256R-L257G, N109G-G131H-N243V-S248N-L257G, N109G-G131H-S248N-K256R, N109G-G131H-T158S-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-N218S-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-N243V, N109G-N218S, N109G-N218S-N243V-L257G, N109G-T158S-N218S-K256R-L257G, N109G-T158S-N218S-L257G, N109G-T158S-N218S-N243V-K256R, N109G-T158S-N243V-L257G, N243V-K256R-L257G, N243V-L257G, S003F-A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-K256R-L257G, T158S-N218S-L233S, T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, V004A-N109G-A116T-T158S-N218S-S248N-L257G, Y006H-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-A272G, A088T-A098S-N218S-K256R, A088T-A116T-G131H-K256R-L257G-L267M, A088T-A116T-G131H-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-A274T, A088T-A116T-G131H-N218S-K256R, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-N218S-

N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-N243V-K256R, A088T-A116T-G131H-N243V-L257G, A088T-A116T-G131H-N243V-S248N, A088T-A116T-G131H-N243V-S248N-A274V, A088T-A116T-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-K256R, A088T-A116T-N218S-K256R, A088T-A116T-N218S-N243V-K256R, A088T-A116T-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-N243V-K256R, A088T-A116T-N243V-L257G, A088T-A116T-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-S248N, A088T-A116T-S248N-K256R, A088T-A116T-S248N-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S, A088T-A116T-T158S-N218S-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-

N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-G131H, A088T-G131H-N218S-K256R-L257G, A088T-G131H-N218S-N243V-K256R, A088T-G131H-N218S-N243V-L257G, A088T-G131H-N218S-N243V-L257G, A088T-G131H-N218S-S248N, A088T-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-N218S-S248N-L257G, A088T-G131H-N218T-L257G, A088T-G131H-N243V-L257G, A088T-G131H-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-S248N, A088T-G131H-S248N-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-K256R, A088T-G131H-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-S248N, A088T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G-I268V, A088T-G131H-T158S-N243V, A088T-G131H-T158S-N243V-S248N, A088T-G131H-T158S-N243V-S248N, A088T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T, A088T-N109G-A116T-G131H-D140G-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G,

A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218T-N243V, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-K256R, A088T-N109G-A116T-N218S, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-L257G, A088T-N109G-A116T-

T158S-N218S-N243V, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-S248N, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-T158S-S248N, A088T-N109G-A116T-T158S-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-K256R, A088T-N109G-G131H-N218S-K256R, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N243V-L257G, A088T-N109G-G131H-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-S248N, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-W241R-S248N-K256R, A088T-

N109G-G131H-V148A-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-G154A-N155P-E156T-G157L-T158M-S159E-G160E-S161L, A088T-N109G-N218S-K256R, A088T-N109G-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-N243V-K256R, A088T-N109G-N243V-S248N, A088T-N109G-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-S248N, A088T-N109G-T158S-N218S, A088T-N109G-T158S-N218S-K256R, A088T-N109G-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N243V-K256R, A088T-N109G-T158S-N243V-K256R, A088T-N109G-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-S248N-L257G, A088T-N109G-T158S-S248N-L257G, A088T-N109G-V147A-N218S-N243V-K256R, A088T-N218S-L257G-I268V, A088T-N218S-N243V, A088T-N218S-N243V-S248N, A088T-N218S-N243V-S248N-N269S, A088T-N218S-S248N-K256R, A088T-N218S-S248N-L257G-Q271R, A088T-N243V, A088T-N243V, A088T-N243V-K256R, A088T-N243V-S248N-K256R, A088T-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-S248N, A088T-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-T158S-N243V-K256R-L257G-Q271H, A088T-T158S-N243V-S248N, A088T-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-T158S-S248N, A088T-V147A-K256R, A116T-G131H-K256R, A116T-G131H-N218S, A116T-G131H-N218S-K256R-L257G, A116T-G131H-N218S-L257G, A116T-G131H-N218S-N243V, A116T-G131H-N218S-S248N-K256R, A116T-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, A116T-G131H-N243V-S248N, A116T-G131H-N243V-S248N-

L257G, A116T-G131H-S248N-K256R, A116T-G131H-T158S-A231V-N243V-L257G, A116T-G131H-T158S-N218S-K256R, A116T-G131H-T158S-N218S-K256R-L257G, A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-G131H-T158S-N218S-S248N, A116T-G131H-T158S-N243V-L257G, A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, A116T-G131H-T158S-S248N-K256R, A116T-G131H-T158S-S248N-L257G, A116T-G131H-V143F-T158S-N218S, A116T-K256R, A116T-N218S, A116T-N218S-K256R, A116T-N218S-N243V-L257G, A116T-N218S-N243V-S248N-K256R, A116T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-N218S-N243V-S248N-L257G, A116T-N218S-S248N-L257G, A116T-N243V, A116T-N243V-K256R-L257G, A116T-N243V-S248N, A116T-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-S248N-K256R-L257G, A116T-T158S-K256R-L257G, A116T-T158S-N218S, A116T-T158S-N218S-K256R, A116T-T158S-N218S-N243V, A116T-T158S-N218S-N243V-S248N, A116T-T158S-N218S-S248N-K256R, A116T-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, A116T-T158S-N243V-K256R, A116T-T158S-N243V-L257G, A116T-T158S-N243V-S248N, A116T-T158S-S248N-K256R-L257G, G131H-K141R-T158S-N218S-K256R, G131H-N218S, G131H-N218S-K256R, G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, G131H-N218S-N243V-S248N, G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, G131H-N243V-S248N-K256R, G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, G131H-S248N, G131H-T158S-I234T-N243V-K256R, G131H-T158S-N218S-K256R-L257G, G131H-T158S-N218S-N243V, G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, G131H-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, G131H-T158S-N243V-K256R, G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, N109G, N109G-A116T-G131H-A144V-T158S-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R, N109G-A116T-G131H-

N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-N218S-S248N-L257G, N109G-A116T-G131H-N243V-K256R, N109G-A116T-G131H-N243V-S248N, N109G-A116T-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-S248N, N109G-A116T-G131H-S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-T158S-K256R, N109G-A116T-G131H-T158S-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-K256R, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N, N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N, N109G-A116T-G131H-T158S-S248N, N109G-A116T-G131H-T158S-S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-V149A-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, N109G-A116T-N218S, N109G-A116T-N218S-K256R, N109G-A116T-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-N218S-N243V-S248N-I268V, N109G-A116T-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-N243V-S248N, N109G-A116T-N243V-S248N-L257G, N109G-A116T-T158S, N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-N243V-L257G, N109G-A116T-T158S-N243V-S248N-L257G, N109G-A116T-T158S-Q275R, N109G-A116T-T158S-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-L257G, N109G-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, N109G-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-N243V-K256R, N109G-G131H-S145F-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-G131H-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-S248N-L257G, N109G-G131H-T158S-K256R,

N109G-G131H-T158S-N218S-L257G, N109G-G131H-T158S-N218S-N243V, N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G-A274T, N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, N109G-G131H-T158S-N243V-S248N, N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-S248N-L257G, N109G-N218S-K256R-L257G, N109G-N218S-L257G, N109G-N218S-N243V-K256R, N109G-N218S-N243V-S248N-S260F, N109G-N218S-S248N, N109G-N243V-K256R, N109G-N243V-L257G, N109G-N243V-S248N, N109G-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-S182F-S204F-S207L-N218S-S236F-S248N-L257G, N109G-S248N-K256R, N109G-T158S-K256R, N109G-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-T158S-N218S-S248N-L257G, N109G-T158S-N243V, N109G-T158S-N243V-K256R, N109G-T158S-N243V-S248N, N109G-T158S-N243V-S248N-K256R, N109G-T158S-S248N-K256R, N109G-T158S-S248N-L257G, N218S, N218S-N243V-S248N-K256R, N218S-S248N-L257G, N243V-K256R, N243V-S248N-K256R, N243V-S248N-K256R-L257G, N243V-S248N-L257G-Q271R, S003P-A116T-T158S-S248N-K256R, S248N, T158S-N218S, T158S-N218S-A272V, T158S-N218S-L257G, T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, T158S-N218S-N243V-L257G, T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, T158S-N243V-K256R, T158S-N243V-K256R-L257G, T158S-N243V-S248N-K256R, V004A-N109G-A116T-G131H-S248N-K256R-L257G, e Y006H-A116T-G131H-S248N;

(x) pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido em relação à SEQ ID nº 6 seleccionado do grupo que consiste em S018F-S162L, S018P-D120N, P014T-S037T, S009T-K141R, e S161P-S162L;

(xi) pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido em relação a SEQ ID nº 6 selecionado a partir do grupo que consiste em I031V-S038W, P014T-S037T, S018F-S162L, S018P-D120N, e S162L-D181H;

(xii) pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido em relação à SEQ ID nº 6 selecionado do grupo que consiste em Y21H-D259G, S183T-S249R, N61D-Q206R, Y262N-Q275R, K043R-N076S, A133V-D259N, e I079V-Q217H;

(xiii) pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido em relação à SEQ ID nº 6 selecionado do grupo que consiste em N61P-S63G-N109Q-A128S-S224A-N243V, A88T-N109G-A114S-A116T-A128S-N243V, A88T-N109G-A114S-A116T-A128S-S183L-S224A-N243V, N109G-A128S-S183V, N109G-A128S-N243V-K256R, N109M-A128S-S224A, A88T-N109S-A116T-A128S-S224A-N243V, N109Q-A128S-S224A-N243V, A88T-N109M-A116T-A128S-S224A-N243V, N109S-A128S-S224A-N243V, A88T-N109G-A116T-N243V, N101Q-N109Q-A128S-S224A-N243V, N109G-A116T-N243V-K256R, N109G-A128S-P129S-S130T-S224A-N243V, e A88T-N109Q-A116T-A128S-S224A-N243V;

(xiv) pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido em relação à SEQ ID nº 6 selecionado do grupo que consiste em S33T-T55P-N61P-S63G-A88T-N109G-A116T-A128S-G131H-S224A-N243V, S33T-N61G-S63G-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-S63G-N109G-A128S-N218S-N243V, N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-G169A-S224A-N243V-S249Q, S33T-N61G-A88T-N109G-A116T-A128S-N218S-N243V, S33T-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-A128S-N218S, A1G-N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V-S249Q, S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, N61P-S63G-N109Q-A128S-S224A-N243V, A88T-N109G-A114S-A116T-

A128S-N243V, A88T-N109G-A114S-A116T-A128S-S183L-S224A-N243V, N109G-A114S-A128S, N109G-A114S-A128S-S183L-S224A, N109G-A114S-A128S-S224A, N109G-A114S-A128S-S224A-N243V, A88T-N109G-A116T-A128S-S224A-N243V, N61G-A88T-N109G-A116T-A128S-S224A-N243V, N109G-A128S-S183V, N109G-A114S-A128S-N243V, N109G-A128S-N243V-S248A, N109G-A128S-S224A-N243V, N109G-A128S-N243V-K256R, N109G-A128S-S224A, N109G-A128S-S183L-S224A, N61G-N109G-A128S-S224A, N109M-A128S-S224A, A88T-N109S-A116T-A128S-S224A-N243V, N109M-A128S-S224A-N243V, S63G-A128S, A88T-N109G-A116T-N243V, N101Q-N109Q-A128S-S224A-N243V, N109G-A116T-N243V-K256R, N109G-A116T, S63G-N109G, A88T-N109G, N109G-K256R, N61G-N109G-N243V, S33T-N109G-A128S-G169A-N218S-N243V, S33T-N109G-A128S-N218S-S224A-N243V, N109G-A128S-P129S-S130T-S224A-N243V, e A88T-N109Q-A116T-A128S-S224A-N243V; e

(xv) pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido em relação a SEQ ID nº 6 selecionado do grupo que consiste em G24S-G53S-N78S-G97A-N101S-A128S, I31L-S33T-S63G-N109G-A128S-G169A-N218S-N243V, A1G-I31L-S33T-T55P-N61P-S63G-A88T-N109G-A116T-A128S-G131H-G169A-S224A-N243V-S249Q, S33T-N61G-S63G-N109G-A128S-G131H-G169A-N218S-N243V, S33T-S63G-N109G-A128S-G169A-N218S-N243V, S33T-T55P-N61P-S63G-A88T-N109G-A116T-A128S-G131H-S224A-N243V, S33T-T55P-N61P-S63G-A88T-N109G-A116T-A128S-G131H-S224A-N243V-S249Q, S33T-N61G-S63G-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-S63G-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-T55P-N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-G169A-S224A-N243V-S249Q, S33T-N61G-A88T-N109G-A116T-A128S-N218S-N243V, S33T-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-N76D-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-N76D-

N109G-A128S-N218S-N243V-S248N-K256R, S33T-N61G-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-N76D-A128S-N218S, S33T-A128S-N218S, A1G-N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V-S249Q, N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, N61P-S63G-N109Q-A128S-S224A-N243V, A88T-N109G-A114S-A116T-A128S-N243V, A88T-N109G-A114S-A116T-A128S-S183L-S224A-N243V, N109G-A114S-A128S, N109G-A114S-A128S-S183L-S224A, N109G-A114S-A128S-S224A, N109G-A114S-A128S-S224A-N243V, A88T-N109G-A116T-A128S-S224A-N243V, N61G-A88T-N109G-A116T-A128S-S224A-N243V, N109G-A128S-S183V, N109G-A114S-A128S-N243V, N109G-A128S-N243V-S248A, N109G-A128S-S224A-N243V, N109G-A128S-N243V-K256R, N109G-A128S-S224A, N109G-A128S-S183L-S224A, N61G-N109G-A128S-S224A, N76D-N109G-A128S-S224A, N109M-A128S-S224A, N109G-A128S-S183L, S33T-N76D, A88T-N109S-A116T-A128S-S224A-N243V, N109Q-A128S-S224A-N243V, N109S-A128S-S224A, A88T-N109M-A116T-A128S-S224A-N243V, N101Q-N109Q-A128S-P129S-S130T-S224A-N243V, S63G-N109Q-A128S-S224A-N243V, N109M-A128S-S224A-N243V, S63G-A128S, N109S-A128S-S224A-N243V, A88T-N109G-A116T-N243V, N61S-N109G-N243V, N101Q-N109Q-A128S-S224A-N243V, N109G-A116T-N243V-K256R, A88T-N109G-A116T-T158S-N243V-K256R, N109G-A116T, S63G-N109G, A88T-N109G, N109G-K256R, N61G-N109G-N243V, S33T-N61P-S63G-N109G-A128S-G131H-G169A-N218S-N243V, S33T-N109G-A128S-G169A-N218S-N243V, S33T-N109G-A128S-N218S-S224A-N243V, N109G-A128S-P129S-S130T-S224A-N243V, e A88T-N109Q-A116T-A128S-S224A-N243V.

[00145] Em um oitavo aspecto, a invenção apresenta uma variante de protease isolada ou que não tem ocorrência natural de uma protea-

se subtilisina BPN' que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID nº 2, a dita variante tendo atividade proteolítica e compreendendo pelo menos um conjunto de substituição(ões) de aminoácido selecionado do grupo que consiste em: S182E, N109I, N109D-Y217L-S248R, N109D-S188R-Y217L, S87D-Y217L-S248R, S87R-N109D-Y217L-S248R, S87R-N109D-S188D-Y217L-S248R, G128A-Y217Q, I111V-M124V, M124V-Y217Q, N62Q-G97A, S89Y-M124V, V68A, V68A-A92G, V68A-G97A, V68A-I111V, V68A-S89Y, V68A-V227T, V68A-Y217Q, W106F-Y217Q, G97A-G128A-Y217Q, G97A-L126A-Y217Q, G97A-M124V-L126A-Y217Q, G97A-N123G-Y217Q, L96T-G97A-Y217Q, M124V-L126A-Y217Q, N62Q-G128A-Y217Q, N62Q-G97A-Y217Q, G97N-G128A-Y217M, G97G-G128S-Y217E, G97A-G128A-Y217Q, G97M-G128S-Y217E, G97A-G128S-Y217Q, G97D-G128S-Y217Q, G97M-G128G-Y217M, G97G-G128S-Y217Q, G97S-G128S-Y217Q, G97G-G128A-Y217Q, G97S-G128A-Y217E, G97A-G128S-Y217L, G97A-G128A-Y217N, G97Q-G128S-Y217L, G97A-G128A-Y217M, G97A-G128A-Y217S, G97D-G128A-Y217Q, G97M-G128S-Y217Q, G97Q-G128G-Y217D-S87Y, G97S-G128A-Y217N, G97A-G128S-Y217T, G97D-G128S-Y217E, G97D-G128A-Y217L, G97G-G128S-Y217E-S78P-A272T, G97T-G128S-Y217D, G97D-G128A-Y217I, G97Q-G128S-Y217Q, G97G-G128A-Y217D, G97Q-G128A-Y217N, G97S-G128A-Y217M, G97S-G128S-Y217N, G97S-G128S-Y217M, G97E-G128S-Y217M, G97S-G128P-Y217Q, G97T-G128S-Y217Q, G97D-G128S-Y217Q-A73T, G97E-G128S-Y217N, G97G-G128A-Y217I, G97Q-G128A-Y217D, G97Q-G128S-Y217M, G97R-G128T-Y217Q-S162P, G97S-G128S-Y217D, G97T-G128P-Y217I, G97Q-G128G-Y217E, G97C-G128G-Y217N, G97D-G128S-Y217H, G97M-G128S-Y217L, G97M-G128S-Y217N, G97S-G128S-Y217E, G97M-G128S-Y217I, G97A-G128P-Y217A, G97R-G128S-Y217D, G97A-G128A-Y217Q-S145D, G97A-G128A-Y217Q-P239R, G97A-

G128A-Y217Q-N61E-P129E-S162K-K213L-N240K, G97A-G128A-Y217Q-N61E, G97A-G128A-Y217Q-P40E-A144K-K213L, G97A-G128A-Y217Q-P129E, G97A-G128A-Y217Q-N61E-P129E-S159K, G97A-G128A-Y217Q-K213L, G97A-G128A-Y217Q-S87D, G97A-G128A-Y217Q-Q206E, G97A-G128A-Y217Q-S24R-P40E-S145D-S159K-K213L, G97A-G128A-Y217Q-K265N, G97A-G128A-Y217Q-S24R, G97A-G128A-Y217Q-P40E, G97A-G128A-Y217Q-Q275E, G97A-G128A-Y217Q-P129E-S145D-N240K, G97A-G128A-Y217Q-A144K, G97A-G128A-Y217Q-S159K, G97A-G128A-Y217Q-S162K, G97A-G128A-Y217Q-N240K, G97A-G128A-Y217Q-S53G, G97A-G128A-Y217Q-S78N, G97A-G128A-Y217Q-S53G-S78N, G97A-G128A-Y217Q-S53G-I111V, G97A-G128A-Y217Q-S53G-N117S, G97A-G128A-Y217Q-S53G-S132N, G97A-G128A-Y217Q-Y104N-S132N, G97A-G128A-Y217Q-S53G-S78N-I111V, G97A-G128A-Y217Q-S53G-S78N-N117S, G97A-G128A-Y217Q-S53G-S78N-S132N, G97A-G128A-Y217Q-S53G-Y104N-S132N, G97A-G128A-Y217Q-S78N-Y104N-S132N, Y217L-V068C-A069G, Y217L-I079F-A098G, Y217L-P086T-S101D-Q103S-V147I, Y217L-A088T-P129S-G146D, Y217L-V093I-G128D-P129R, Y217L-Z096.01D-A098R, Y217L-Z096.01H-A098G, Y217L-G097S-Z097.01S-A098G-A273T, Y217L-A098S-D099G-G100D, Y217L-Z098.01N, Y217L-D099G-Z099.01N, Y217L-D099G-Z099.01S, Y217L-D099V-S101D, Y217L-Z099.01S, Y217L-G100D, Y217L-S101D-Q103H, Y217L-S101G-A151V, Y217L-S101H-G102S, Y217L-S101H-Q103D, Y217L-G102R-Q103C-Y104C-V192I, Y217L-Q103D, Y217L-V121I-I122S-N123C, Y217L-V121L-N123C, Y217L-I122S-N123S, Y217L-M124I, Y217L-M124V, Y217L-L126F-P129Z-S182N, Y217L-L126Y, Y217L-G127S-P129D, Y217L-Z127.01N-G128S-P129S, Y217L-G128H-P129Y, Y217L-G128S-P129D, Y217L-G128S-P129D-S248R, Y217L-G128S-P129G, Y217L-P129G-G131Z, Y217L-P129G-S130H-S132Z, Y217L-P129H-G131Z,

Y217L-P129L, Y217L-P129S-S130H-S132Z, Y217L-P129Z, Y217L-P129Z-S130G, Y217L-P129Z-S130G-G131H-S132H, Y217L-P129Z-S130H, Y217L-S130V-G131D-S132I, S87T-A88L-S89G-G97A-G128A-Y217Q, N61P-S63H-G97A-G128A-Y217Q, S87G-A88V-S89A-G97A-G128A-Y217Q, P86S-S87G-A88V-G97A-G128A-Y217Q, Q59S-N61P-G97A-G128A-Y217Q, S24G-N25G-G97A-G128A-Y217Q, N61P-N62S-G97A-G128A-Y217Q, G97A-G128A-P129Q-S130G-G131S-Y217Q, L75S-N76Y-G97A-G128A-Y217Q, G97A-G128A-V203Y-Y217Q, T55P-G97A-G128A-Y217Q, A88V-L90I-G97A-G128A-Y217Q, G97A-G128A-G211R-N212S-K213V-Y217Q, G23A-S24G-N25G-G97A-G128A-Y217Q, T22N-S24A-G97A-G128A-Y217Q, S24R-G97A-G128A-Y217Q, G97A-A98S-G128A-Y217Q, G97A-G128A-T158G-S159G-Y217Q, Q59E-N61P-G97A-G128A-Y217Q, G97A-A98E-G128A-Y217Q, G97A-G128A-Y217Q-P86S-S87G-A88V-A116N-N117S-N118G, G97A-G128A-Y217Q-S63T-P86S-S87G-A88V, G97A-G128A-Y217Q-P86S-S87G-A88V-P239R, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-N61P-N62S-P194L-A232T, G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-A133V-L267V, G97A-G128A-Y217Q-A134T-L267V, G97A-G128A-Y217Q-S24R-P40E-P129E-S159K-K265R, G97A-G128A-Y217Q-A134T-G211T, G97A-G128A-Y217Q-S24R-P129E, G97A-G128A-Y217Q-I111V-S161P, G97A-G128A-Y217Q-T55P-P129Q, G97A-G128A-Y217Q-I115V-L267V, G97A-G128A-Y217Q-P86S-S87G-A88V-A116S-N117G-N118R, G97A-G128A-Y217Q-V203Y-L267V, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S78N-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-P52S-T55P-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P-A116S-N117G-N118R, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-P129Q-S130G-G131S, G97A-G128A-Y217Q-P86S-S87G-A88V-T242R, G97A-G128A-Y217Q-P40E-T55P-N269K, G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G-A116N-N117S-N118G, G97A-G128A-Y217Q-V8L-N25Y-P129Q-S130G-G131S, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-

S78N-S87T-A88L-S89G-S101N, G97A-G128A-Y217Q-G211T-L267V, G97A-G128A-Y217Q-S24R-A116N-N117S-N118G, G97A-G128A-Y217Q-S24R-A128S-P129G, G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-N240K, G97A-G128A-Y217Q-N25Y-P129Q-S130G-G131S, G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-A134T, G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-L267V, G97A-G128A-Y217Q-S87G-A88V-S89A-A116N-N117S-N118G, G97A-G128A-Y217Q-N61P-P129Q-S130G-G131S, G97A-G128A-Y217Q-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N, G97A-G128A-Y217Q-T55P-P129V-P194S, G97A-G128A-Y217Q-T55P-P129V, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-T55P-S78N-S101N, G97A-G128A-Y217Q-T55P-S78N-I115V, G97A-G128A-Y217Q-N25Y-S87G-A88V-S89A, G97A-G128A-Y217Q-A134T-N240K, G97A-G128A-Y217Q-S24R-Q59S-N61P, G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G-P239R, G97A-G128A-Y217Q-T55P-A116S-N117G-N118R, G97A-G128A-Y217Q-A134T-S161P, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-N61P-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-N25Y-Q59S-N61P, G97A-G128A-Y217Q-N25Y-P129Q-S130G-G131S-A137T, G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G-N61P-S63H, G97A-G128A-Y217Q-T55P-N61P-S78N-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-P129Q-N240K, G97A-G128A-Y217Q-T55P-A134T, G97A-G128A-Y217Q-N25Y-N61P-S63H, G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-P129S, G97A-G128A-Y217Q-T55P-L75H-N76G, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-T55P-I115V, G97A-G128A-Y217Q-T55P-A116N-N117S-N118G, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-A116N-N117S-N118G, G97A-G128A-Y217Q-S24R-P129Q-S130G-G131S, G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G-G211R-N212S-K213V, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-T55P-N61P-S78N-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-T55P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N, G97A-G128A-Y217Q-I115V-A273S, G97A-G128A-Y217Q-N25Y-T55P, G97A-

G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P-N240K, G97A-G128A-Y217Q-S161P-L267V, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N, G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-S101N, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-N61P-S101N, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-N240K, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-T55P-S101N, G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H-A128S-P129Q, G97A-G128A-Y217Q-S89Y-P129Q-S130G-G131S, G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-I115V-N240K, G97A-G128A-Y217Q-S53G-N61P-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-S161P-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-N240K, G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-P239R, G97A-G128A-Y217Q-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-I115V-A134T, G97A-G128A-Y217Q-Y6Q-P129Q-S130G-G131S, G97A-G128A-Y217Q-T55P-S78N-S89Y, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-T55P-S78N-A88V-S101N, G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H-S78N-I111V-A134T, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-S78N-S101N, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S78N-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-S53G-N61P-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-S53G-T55P-S78N-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N, G97A-G128A-Y217Q-N240K-A273S, G97A-G128A-Y217Q-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N, G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P-S87T-A88L-S89G, G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H-S78N-S161P, G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H-S78N-I111V, G97A-G128A-Y217Q-T55P-A128S-P129Q, G97A-G128A-Y217Q-N61P-S78N-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-N61E-A144K, G97A-G128A-Y217Q-A134T-

P239R, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S78N-S87T-A88L-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-T55P-N240K, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S87T-A88L-S89G-S101N, G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-P239R, G97A-G128S-Y217Q, G97A-G128A-Y217Q-S53G-N61P-S101N, G97A-G128A-Y217Q-I111V-P129Q-G211T, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P-S87G-A88V-S89A, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N, G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-S162K, G97A-G128A-Y217Q-T55P-P129Q-S130G-G131S, G97A-G128A-Y217Q-T55P-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-S87G-A88V-S89A-P129Q-S130G-G131S, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G, G97A-G128A-Y217Q-I111V-P129Q-S130G-G131S, G97A-G128A-Y217Q-I111V-A273S, G97A-G128A-Y217Q-N61P-S87T-A88L-S89G, G97A-G128A-Y217Q-T22N-S24A-N61P-S63H, G97A-G128A-Y217Q, G97A-G128A-Y217Q-S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-P129S-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-S159K-L267V, G97A-G128A-Y217Q-P40E-S53Y-S78Y-P86S-S87G-A88V, G97A-G128A-Y217Q-S24R-S145D, G97A-G128A-Y217Q-I111V-S159K, G97A-G128A-Y217Q-T55P-P129L, G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-T55P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S78N-S101N, G97A-G128A-Y217Q-S53G-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-S89Y, G97A-G128A-Y217Q-S24R-P129V, G97A-G128A-Y217Q-S87G-A88V-S89A-A116N-N117S-N118G-P172H, G97A-G128A-Y217Q-I111V-A134T, G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P-P129Q-S130G-G131S, G97A-G128A-Y217Q-P5S-S87G-A88V-S89A-A116G-N117R, Y217Q-N61P-A97G-G102A-A128G-P129S,

G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-N61P-S78N, G97A-G128A-Y217Q-S145D-S159K-N240K-Q275E, G97A-G128A-Y217Q-T55P-A128S-P129D, G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G-A128S-P129D, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-I111V-P239R, G97A-G128A-Y217Q-S87G-A88V-S89A-S162K, G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-I115V, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-T55P-S78N, G97A-G128A-Y217Q-T55P-A92G, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S87T-A88L-S89G-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-T22N-S24A-T55P, G97A-G128A-Y217Q-S53G-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-S78N-S87T-A88L-S89G, G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-S159K, G97A-Y217Q-N61P-N62Q-G100N-A128G, G97A-G128A-Y217Q-S24R-S78N-S182P-L267V, G97A-G128A-Y217Q-P239R-A273S, G97A-G128A-Y217Q-S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-T242R, G97A-G128A-Y217Q-S3F-S87T-A88L-S89G-G211T, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-L75H-N76G, G97A-G128A-Y217Q-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G, G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-A144K, G97A-G128A-Y217Q-S78N-S87T-A88L-S89G-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P-A116N-N117S-N118G, G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-I111V, G97A-G128A-Y217Q-S24R-S145D-P239R-Q275E, G97A-G128A-Y217Q-S145D-A273S, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-K141E-T242R, G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-A116N-N117S-N118G-P129Q-S130G-G131S, G97A-G128A-Y217Q-S89Y-G211T, G97A-G128A-Y217Q-S87G-A88V-S89A-A116N-N117S-N118G-A144T, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-P129V, G97A-Y217Q-N61P-A128G-P129S-S130P, G97A-G128A-Y217Q-T55P-N61P-S87T-A88L-S89G-G110C-S130P,

G97A-Y217Q-N123G-A128G, G97A-G128A-Y217Q-N61P-N62Q-G100N-G102A-M124I, S78N-G97A-G128A-Y217Q, G97A-S101N-G128A-Y217Q, G97A-G128A-A137V-Y217Q, N61P-G97A-G128A-Y217Q, G97A-G128A-S130P-Y217Q, G97A-Q103N-G128A-Y217Q, S63T-G97A-G128A-Y217Q, G97A-G102A-G128A-Y217Q, G97A-N109D-G128A-Y217Q-S248R, S87R-G97A-G128A-Y217Q, G97A-G128A-S188D-Y217Q, S87D-G97A-G128A-Y217Q-S248R, G97A-G128A-S188D-S248R-Y217Q, G97A-G128A-S248D-Y217Q, S78N-G97A-G128A-Y217Q-L267V, S78N-G97A-G128A-Y217Q-S161P, S78N-G97A-G128A-Y217Q-I115V, S78N-G97A-G128A-Y217Q-A273S, S78N-G97A-G128A-Y217Q-G211T, S78N-G97A-G128A-Y217Q, S78N-G97A-G128A-Y217Q-I111V, S78N-G97A-G128A-Y217Q-V147L, S78N-G97A-G128A-Y217Q-I108V, S78N-G97A-G128A-Y217Q-S89Y, S78N-G97A-G128A-Y217Q-A138T, G97A-G128A-Y217Q-A134T-K213L, G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G-P129V, G97A-G128A-Y217Q-S24R-P239R, e G97A-G128A-Y217Q-S24R-S87T-A88L-S89G, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência à sequência de aminoácidos da SEQ ID nº 2.

[00146] Uma variante de acordo com o oitavo aspecto da invenção pode ter atividade proteolítica aumentada e/ou atividade de limpeza aumentada em comparação à protease que tem a sequência da SEQ ID nº 2 e/ou SEQ ID nº 4 e pode estar sob uma forma madura. Uma variante de acordo com o oitavo aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade à SEQ ID nº 2 ou à SEQ ID nº 4, sendo que a variante tem atividade proteolítica e tem, opcionalmente, atividade proteolítica intensificada e/ou atividade de limpeza intensificada em comparação à protease que tem a sequência da SEQ ID nº 2 ou SEQ ID nº 4.

[00147] Uma variante de acordo com o oitavo aspecto da invenção pode compreender três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 substituições de aminoácido em posições selecionadas a partir do grupo que consiste nas posições 24, 25, 40, 52, 53, 55, 58, 59, 61, 62, 63, 68, 78, 86, 87, 88, 89, 92, 96, 97, 100, 101, 103, 104, 106, 111, 114, 115, 116, 117, 118, 123, 124, 125, 126, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 144, 145, 159, 161, 162, 167, 194, 203, 206, 213, 217, 227, 232, 239, 240, 242, 265, 267, e 275. Uma variante de acordo com o oitavo aspecto pode compreender um total de três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 substituições de aminoácido selecionadas a partir dos grupos (a) e (b): (a) substituições de aminoácido carregados selecionadas do grupo que consiste em N61E, A144K, P129E, P239R, P40E, Q103E, Q206E, Q7275E, S145D, S159K, S162K, S24R, S63H, S87D e T242R; e (b) substituições de aminoácidos neutros selecionadas do grupo que consiste em A114G, A116N, A133V, A134T, A232T, A88V, A92G, F58G, G100T, G128A, G131S, G97A, I111V, I115V, K213L, K265N, L126A, L267V, L96T, M124V, N117S, N118G, N123G, N240K, N25G, N61P, N62Q, N62R, N62S, P129Q, P129V, P194L, P239V, P52L, P86S, Q59S, S101N, S125A, S130G, S132N, S161P, S24G, S53G, S78N, S87G, S89Y, T55P, V203Y, V227T, V68A, W106F, Y104N, Y167A, e Y217Q. Uma variante de acordo com o oitavo aspecto pode compreender uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade de sequência à SEQ. ID NO:2.

[00148] Em um nono aspecto, a invenção apresenta uma variante de protease isolada ou que não tem ocorrência natural selecionada a partir do grupo:

[00149] (a) uma variante de protease que tem atividade proteolítica, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem

pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade à SEQ ID nº 2, e que compreende pelo menos um conjunto de substituição(ões) de aminoácido em relação à SEQ ID nº 2 selecionado a partir dos grupos (i) a (vii):

(i) Q059V-S078N-G097A-I108V-G128A-V147Q-G211A-Y217Q-N252Q, S078N-G097A-I108V-G128A-V147Q-G211A-Y217Q, S078N-G097A-I108V-G128A-V147Q/-G211A-Y217Q-N252Q, S078N-G097A-I108V-G128A-V147Q-Y217Q-N252Q, e S078N-S087E-G097A-M124I-G128A-Y217Q-S224A;

(ii) Q059V-S078N-G097A-I108V-G128A-V147Q-G211A-Y217Q-N252Q, S078N-G097A-I108V-G128A-V147Q-G211A-Y217Q, S078N-G097A-I108V-G128A-V147Q-G211A-Y217Q-N252Q, S078N-G097A-I108V-G128A-V147Q-Y217Q-N252Q, e S078N-S087E-G097A-M124I-G128A-Y217Q-S224A;

(iii) G097A-M124V-Y167A-Y217Q, V068A-Y167A-Y217Q, G097A-I111V-M124V-Y167A, I111V-M124V-Y167A-Y217Q, V068A-I111V-Y167A-Y217Q, G097A-I111V-M124V-Y167A-Y217Q, e P052L-V068A-I111V;

(iv) G097A-N123A-Y217Q, G097A-N123V-Y217Q, N061P-G102A-G128S-Y217Q, N061P-S101N-G102A-G128S-Y217Q, Y217Q, S078N-G097A-I111V-N123Q-Y217Q, e G102A-N123Q-Y217Q;

(v) G097A-N123A-Y217Q, G097A-N123V-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100D-Y217Q, N061P-S101N-G102A-G128S-Y217Q, Y217Q, N061P-G102A-G128S-Y217Q, S078N-G097A-I111V-N123Q-Y217Q, e G102A-N123Q-Y217Q;

(vi) N061P-N062Q-G097A-G100N-Y217Q, N061P-G097A-M124I-Y217Q, G102A-N123Q-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-N123Q-Y217Q, S053G-N061P-G097A-S101N-N123Q-Y217Q, N061P-G097A-S101N-N123Q-Y217Q, N061P-N062Q-

G097A-G100Q-P210S-Y217Q, S053G-N061P-G102A-P129S-P210S-Y217Q, G097A-I111V-M124V-P210S-Y217Q, G097A-N123Q-P210S-Y217Q, N061P-G097A-N123Q-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-M124I-Y217Q, S053G-N061P-G097A-S101N-M124I-Y217Q, S053G-N061P-G097A-M124I-Y217Q, N061P-S078N-G097A-I111V-M124I-Y217Q, N061P-G097A-M124V-Y217Q, N061P-N062Q-G100N-G102A-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100Q-S101N-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-N062Q-G097A-G100N-S101N-Y217Q, S078N-G097A-I111V-N123Q-Y217Q, S053G-N061P-N062Q-G097A-G100N-S101N-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100N-S101N-Y217Q, N061P-N062Q-S078N-G097A-G100N-I111V-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100D-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100Q-Y217Q, N061P-S101N-G102A-G128S-Y217Q, N061P-G102A-G128S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S101N-G102A-P129S-Y217Q, S053G-N061P-S101N-G102A-P129S-Y217Q, N061P-S078N-G102A-I111V-P129S-Y217Q, G097A-N123V-Y217Q, S053G-N061P-G102A-P129S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-N062Q-G097A-S101N-I111V-Y217Q, S053G-N061P-N062Q-G097A-S101N-I111V-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-S101N-I111V-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-I111V-Y217Q, N062Q-S078N-G097A-I111V-Y217Q, N062Q-G097A-I111V-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-I111V-M124V-Y217Q, S053G-N061P-G097A-S101N-I111V-M124V-Y217Q, N061P-G097A-S101N-I111V-M124V-Y217Q, G097A-N123Q-Y217Q, N061P-G097A-I111V-M124V-Y217Q, S078N-G097A-I111V-M124V-Y217Q, G097A-I111V-M124I-Y217Q, S053G-S078N-G097A-I111V-G128S-Y217Q, S078N-G097A-G128S-Y217Q, S053G-N061P-G097A-G128S-Y217Q, G097A-N123A-Y217Q. e Y217Q; e

(vii) S101N-G128A-Y217Q, S024G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A, S024G-N025G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A, S024G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-

N025G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S053G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q-S249N, N025G-S053G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-N061P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-T055P-N061P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-S038G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S053G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-G128A-S130G-Y217Q, e S024G-S053G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q; e

[00150] (b) uma variante de protease que tem atividade proteolítica, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a sequência de aminoácidos da SEQ ID n° 6 e que compreende pelo menos um conjunto de substituição(ões) de aminoácido em relação à SEQ ID n° 6 selecionado a partir dos grupos (i) a (xii):

(i) A001C, A001D, A001E, A001F, A001H, A001K, A001L, A001M, A001N, A001P, A001Q, A001R, A001S, A001T, A001V, A013C, A013S, A015C, A015D, A015E, A015L, A015R, A048C, A048E, A048S, A073N, A073T, A074G, A074S, A085C, A085G, A085S, A085T, A085V, A088M, A088S, A092S, A098G, A114G, A133E, A133P, A133R, A137E, A137H, A137R, A142C, A144D, A144G, A144H, A144K, A144L, A144N, A144R, A152S, A153G, A153S, A153V, A176C, A179G, A187C, A187F, A187G, A187L, A187N, A187P, A187Q, A187S, A187T, A187V, A187W, A200G, A216C, A216H, A216R, A216W, A223S, A228S, A230G, A230S, A230T, A230V, A231V, A232C, A232V, A272E, A272G,

A272K, A272P, A272R, A273D, A273G, A273H, A273L, A273P, A273Q, A273R, A273T, A273V, A274H, A274M, A274R, D036E, D036N, D036Q, D036S, D041C, D060G, D099A, D099H, D099Q, D120E, D181A, D181G, D181H, D181T, D197T, D259A, D259G, D259H, D259N, D259P, D259Q, D259S, D259T, E156A, E156C, E156G, E156H, E156L, E156Q, E156S, E156V, E195G, E251C, E251I, E251L, E251Q, E251T, F058Y, F189A, F189G, F189H, F189L, F189R, F189S, F189T, F189W, F189Y, F261C, F261D, F261E, F261K, F261P, G020C, G020E, G020F, G020H, G020L, G020N, G020Q, G020R, G020T, G020Y, G024A, G024D, G024P, G046D, G053A, G053D, G053E, G053F, G053L, G053M, G053Q, G053R, G053S, G053Y, G097K, G097M, G097R, G131C, G131D, G131R, G146A, G157A, G157N, G157P, G157S, G157T, G160A, G160L, G160R, G160V, G166C, G166I, G166L, G166Q, G166V, G166W, G169A, G178A, G211E, G211K, G215C, G215D, G215E, G215H, G215L, G215S, G215T, G215W, G258A, G258D, G258P, G258S, H017I, H039S, H226L, H238N, H238Y, I011L, I011T, I011V, I031C, I031F, I031L, I079E, I079F, I079K, I079L, I079M, I079Q, I079R, I107L, I111M, I175L, I205A, I205C, I205V, I268L, I268M, K012A, K012C, K012E, K012F, K012G, K012H, K012L, K012N, K012S, K012T, K012W, K027A, K027N, K027S, K027T, K043A, K043C, K043D, K043E, K043F, K043G, K043H, K043I, K043L, K043M, K043N, K043P, K043Q, K043R, K043T, K043V, K043W, K043Y, K136G, K136H, K141A, K141G, K141H, K141L, K141M, K141N, K141Q, K141R, K141T, K141V, K141W, K170A, K170C, K170G, K170Q, K170S, K213A, K213G, K213H, K213I, K213L, K213N, K213Q, K213R, K213S, K213T, K213V, K237A, K237H, K237I, K237L, K237N, K237S, K237T, K237V, K256A, K256C, K256D, K256E, K256G, K256H, K256M, K256P, K256Q, K256S, K256T, K256V, K256W, K265G, K265H, K265N, K265S, K265Y, L016E, L042C, L042F, L042M, L042V,

L075G, L075H, L075I, L075T, L082A, L082E, L082F, L082H, L082R, L082S, L082T, L090M, L135F, L196M, L209A, L209C, L209E, L209G, L209H, L209R, L209S, L233E, L233G, L233S, L235M, L235R, L235V, L235W, L257C, L257D, L257E, L257G, L257P, L257R, L257W, L267E, L267F, M050L, M050Y, M119C, M119I, M124L, M222A, M222F, M222L, M222S, M222T, N025C, N025E, N025P, N056D, N056S, N061A, N061C, N061D, N061G, N061I, N061K, N061L, N061Q, N061R, N062A, N062C, N062H, N062L, N062Q, N062R, N062S, N062T, N062V, N062Y, N076A, N076D, N076E, N076L, N076M, N076P, N076Q, N076S, N076T, N076V, N078D, N078E, N078F, N078G, N078H, N078K, N078P, N078Q, N078R, N101D, N101F, N101R, N117G, N117R, N117S, N118A, N118D, N118H, N118Q, N118R, N118S, N118T, N184C, N184E, N184P, N184R, N212C, N212D, N212E, N212R, N212W, N218C, N218D, N218E, N218F, N218G, N218M, N218P, N218R, N218T, N218V, N218W, N240A, N240G, N240Q, N240S, N240W, N243C, N243G, N243S, N252D, N252E, N252V, N269C, N269H, P005A, P005D, P005M, P005Q, P005V, P005W, P014A, P014D, P014F, P014K, P014M, P014R, P014V, P040F, P040R, P040W, P057A, P057W, P129E, P129R, P129V, P172E, P172K, P172R, P194E, P194H, P194R, P194W, P201A, P201G, P201T, P210E, P210L, P239A, P239G, P239H, P239K, P239N, P239R, P239T, Q002D, Q002E, Q002G, Q002I, Q002K, Q002L, Q002P, Q002R, Q002V, Q010D, Q010R, Q010W, Q019C, Q019D, Q019E, Q019H, Q019L, Q019P, Q019R, Q059A, Q059C, Q059D, Q059E, Q059L, Q059R, Q059S, Q059T, Q059W, Q103W, Q185D, Q185E, Q185K, Q185R, Q185W, Q206D, Q206G, Q206H, Q206L, Q206V, Q206W, Q217A, Q217C, Q217E, Q217F, Q217G, Q217H, Q217K, Q217L, Q217R, Q217V, Q245A, Q245D, Q245E, Q245H, Q245M, Q245R, Q271A, Q271C, Q271D, Q271E, Q271F, Q271G, Q271L, Q271P, Q271R, Q271T, Q271W, Q271Y,

Q275A, Q275F, Q275G, Q275I, Q275L, Q275P, Q275R, R186A, R186H, R186I, R186L, R186M, R186V, R186W, S003D, S003E, S003F, S003K, S003R, S009C, S009E, S009K, S018C, S018D, S018R, S037A, S037D, S037E, S037G, S037H, S037K, S037L, S037P, S037R, S037Y, S038D, S038M, S038P, S038R, S038Y, S049C, S049T, S063A, S063C, S063D, S063F, S063L, S063M, S063R, S063Y, S087C, S087D, S087K, S087L, S087M, S087N, S087R, S087Y, S089A, S089C, S089D, S089E, S089F, S089G, S089H, S089I, S089K, S089P, S089R, S089V, S089Y, S105T, S125A, S130C, S130D, S130E, S130K, S130R, S130W, S145D, S145G, S145L, S145R, S145T, S159C, S159D, S159L, S159P, S159W, S161C, S161E, S161R, S162C, S162E, S162W, S163A, S173T, S173V, S182C, S182E, S182R, S183C, S183D, S183P, S183R, S188C, S188D, S188E, S188F, S188K, S188L, S188P, S188R, S188W, S190A, S190C, S190G, S190T, S191G, S204E, S204G, S204R, S204Y, S207G, S224G, S224T, S236C, S236D, S236E, S236G, S248C, S248D, S248E, S248H, S248R, S249E, S249L, S249R, S260A, S260C, S260E, S260G, S260K, S260Q, S260R, S260V, S260Y, T022L, T022P, T055C, T055D, T055E, T055I, T055K, T055M, T055R, T055S, T055V, T055W, T055Y, T071A, T158A, T158D, T158E, T158G, T158L, T158P, T158Q, T158R, T158V, T158Y, T164A, T164G, T164K, T164Q, T164R, T208S, T220A, T242D, T242G, T244D, T244E, T244R, T253E, T253R, T253Y, T254G, T255C, T255D, T255E, T255K, T255R, V004D, V004E, V004T, V026A, V028I, V028L, V030I, V044A, V044C, V044P, V044T, V045C, V045D, V045E, V045G, V045I, V045N, V045R, V045T, V051H, V072L, V081A, V081G, V081H, V081R, V081S, V084I, V084M, V095A, V095C, V143A, V143C, V143E, V143F, V143G, V143H, V143Q, V143T, V143W, V147A, V147Q, V147S, V148I, V148L, V149C, V149I, V149L, V165C, V165L, V180A, V180C, V180M, V180S, V192C, V192F,

V192G, V192I, V192Q, V192Y, V203A, V203C, V203D, V203E, V203G, V203K, V203M, V203R, V203S, V270C, V270G, V270L, V270P, W241F, W241L, Y006A, Y006C, Y006D, Y006E, Y006M, Y006N, Y006R, Y006S, Y021C, Y091W, Y104T, Y104V, Y104W, Y214H, Y214Q, Y262C, Y262D, Y262E, Y262H, Y262I, Y262R, e Y262V;

(ii) A001C, A001E, A001P, A015C, A015E, A048C, A048E, A073T, A085C, A085G, A088I, A088M, A114G, A128H, A137R, A142C, A187C, A187F, A187L, A187N, A187P, A187W, A216C, A216H, A230G, A230S, A273D, A273H, A273P, A273Q, A273R, A273T, A274H, D036N, D036Q, D036S, D041C, D041N, D099A, D099H, D099N, D099Q, D099S, D197T, D259H, E156C, E156G, E156H, E156L, E156Q, F058G, F189A, F189G, F189H, F189L, F189R, F189S, F189T, F261C, F261D, F261E, G046D, G053E, G053L, G053M, G053Q, G053R, G131C, G131D, G146A, G157N, G157P, G157T, G160V, G178A, G215C, G215L, G258A, G258P, H039A, H039S, H067T, H238Y, I011L, I031F, I079E, I111M, I175L, I268M, K012A, K012C, K012E, K012F, K012G, K012H, K012L, K012N, K012W, K027N, K027S, K027T, K043C, K043D, K043G, K043L, K043R, K043W, K136E, K136G, K141G, K141L, K141M, K141N, K141R, K170C, K170Q, K213V, K256D, K265G, K265N, K265Q, K265S, K265Y, L042C, L042F, L075G, L075V, L082A, L082E, L082F, L082H, L082R, L082S, L090M, L090T, L126W, L233E, L233G, L233S, L235V, L257D, L257E, L257G, L257P, L257R, L257W, M050L, M222A, M222F, M222L, M222S, M222T, N025R, N056S, N062C, N062H, N062L, N062Q, N062R, N062T, N062Y, N076D, N076P, N078D, N078E, N078F, N078R, N078V, N117G, N118L, N184P, N269C, N269H, N269Q, P005V, P005W, P014K, P057A, P057W, P086F, P129V, P201T, P225G, P225S, P239A, P239G, P239H, P239N, P239T, Q002D, Q002I, Q002K, Q002L, Q002P, Q002R,

Q002V, Q010W, Q019L, Q019P, Q059C, Q059D, Q059E, Q059W, Q185W, Q217C, Q245A, Q245H, Q271C, Q271D, Q271E, Q271L, Q271W, Q275A, Q275G, R186M, S009C, S009L, S018C, S018D, S037E, S037H, S037K, S037L, S037P, S038P, S038Y, S049C, S049N, S063C, S063D, S063F, S063L, S063Y, S087C, S087K, S087L, S087N, S087R, S087Y, S089D, S089E, S089F, S089G, S089P, S089W, S105T, S125A, S130C, S145D, S159D, S159P, S163A, S173V, S182P, S183P, S190A, S190G, S191G, S204E, S224G, S248E, S248H, S249E, S260V, S260Y, T022P, T055E, T055M, T055R, T055W, T158D, T158E, T164A, T164G, T164K, T164Q, T164R, T220A, T242G, T242P, T253E, T255C, T255G, V004D, V004T, V044A, V044L, V044P, V044T, V045C, V045G, V045I, V045K, V045L, V045N, V045R, V045T, V045V, V051H, V081A, V081G, V081H, V081R, V084S, V143G, V147A, V148L, V165C, V180S, V203D, V203G, V203S, V270C, V270G, V270P, V270S, W241L, Y104T, Y214H, Y214Q, Y262D, Y262E, Y262G, Y262H, Y262L, Y262N, Y263G, e Y263W;

(iii) A001E, A001E-A088T, A001E-A116T, A001E-A128S, A001E-A128S-G131H-N243V, A001E-G024E, A001E-G131H, A001E-G131H-G169A-N243V, A001E-G169A, A001E-K043Y, A001E-K256R, A001E-L257G, A001E-N076D, A001E-N076D-N109G-A128S, A001E-N109G, A001E-N218S, A001E-N243V, A001E-Q103H, A001E-Q206D, A001E-S033T, A001E-S033T-N109G-N218S, A001E-S033T-N109G-N243V, A001E-S063G, A001E-S162G, A001E-S248N, A001E-S249A, A001E-T158S, A088T-A128S, A088T-G169A, A088T-N218S, A088T-Q206D, A116T-G169A, A116T-N218S, A116T-Q206D, A128S, A128S-G131H, A128S-G169A, A128S-N218S, A128S-N243V, A128S-Q206D, G024E, G024E-A088T, G024E-A128S, G024E-G131H, G024E-K043Y, G024E-N076D, G024E-N218S, G024E-Q103H, G024E-Q206D, G024E-S033T, G024E-S063G, G024E-S162G, G024E-S248N,

G024E-S249A, G131H-G169A, G131H-N218S, G131H-N243V, G131H-Q206D, G169A, G169A-K256R, G169A-L257G, G169A-N218S, G169A-N243V, G169A-Q206D, G169A-S248N, G169A-S249A, K043Y, K043Y-A116T, K043Y-A128S, K043Y-G131H, K043Y-G169A, K043Y-L257G, K043Y-N076D, K043Y-N109G, K043Y-N218S, K043Y-Q103H, K043Y-Q206D, K043Y-S063G, K043Y-S162G, K043Y-S248N, K043Y-S249A, K043Y-T158S, N076D, N076D-A088T, N076D-A116T, N076D-A128S, N076D-G131H, N076D-G169A, N076D-N218S, N076D-N243V, N076D-Q103H, N076D-Q206D, N076D-S162G, N076D-S248N, N076D-S249A, N109G-G169A, N109G-Q206D, N109G-S248N, N218S, N218S-K256R, N218S-L257G, N218S-S248N, N218S-S249A, P040E-N109G-A128S-G131H, Q103H, Q103H-G169A, Q103H-Q206D, Q206D, Q206D-K256R, Q206D-L257G, Q206D-N218S, Q206D-N243V, Q206D-S248N, Q206D-S249A, S018T-Y021N-S033T-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, S033T, S033T-A088T, S033T-A116T, S033T-A128S, S033T-A128S-G131H-N243P, S033T-G131H, S033T-G169A, S033T-K043Y, S033T-K256R, S033T-L257G, S033T-N076D, S033T-N076D-A128S-N218S, S033T-N076D-N109G-A128S-N218S-N243V-S248N-K256R, S033T-N109G, S033T-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, S033T-N218S, S033T-P040E-Q103H-N109G, S033T-Q103H-A128S-G131H, S033T-Q206D, S033T-S063G, S033T-S063G-Q103H-N109Q-A128S-G131H-G169A-N243P, S033T-S063G-Q103H-N109Q-A128S-G131H-G169A-N243V, S033T-S162G, S033T-S248N, S033T-S249A, S063G-A116T, S063G-G131H, S063G-G169A, S063G-N109G-A128S-G131H, S063G-N218S, S063G-N243V, S063G-Q206D, S063G-S249A, S162G-G169A, S162G-N218S, S162G-Q206D, S162G-S249A, S248N-K256R, S248N-S249A, S249A-K256R, S249A-L257G, T158S-G169A, T158S-K256R, T158S-Q206D, e T158S-S162G;

(iv) A001E, A001E-A088T, A001E-A116T, A001E-A128S-

G131H-N243V, A001E-G024E, A001E-G131H-G169A-N243V, A001E-G169A, A001E-K043Y, A001E-L257G, A001E-N076D, A001E-N076D-N109G-A128S, A001E-N109G, A001E-Q103H, A001E-Q206D, A001E-S033T-N109G-N218S, A001E-S033T-N109G-N243V, A001E-S248N, A001E-T158S, A088T-G169A, A088T-Q206D, A116T-G169A, A116T-N218S, A116T-Q206D, A128S-G131H, A128S-N243V-S248N-K256R, A128S-Q206D, G024E-K043Y, G024E-N076D, G024E-Q206D, G131H-G169A, G131H-N218S, G131H-N243V-K256R, G131H-Q206D, G131H-S248N, G169A-K256R, G169A-N218S, G169A-N243V, G169A-Q206D, G169A-S249A, K043Y-G169A, K043Y-N076D, K043Y-N218S, K043Y-Q206D, N061P-N109G-G131H-N243V, N061P-N109G-N243V, N061S-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R-S260P, N061S-N109G-N243V, N076D, N076D-G131H, N076D-L257G, N076D-N109G, N076D-Q103H, N076D-Q206D, N076D-S249A, N109G-A128S-N243V-S248N, N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, N109G-A128S-S248N-K256R, N109G-G169A, N109G-N243P-S248A-K256R, N109G-N243P-S248N-K256R, N109G-N243V-K256R, N109G-N243V-S248A-K256R, N109G-N243V-S248N, N109G-N243V-S248N-K256R, N109G-S248N-K256R, N218S-S249A, N243V-S248N-K256R, P040E-N109G-A128S-G131H, Q103H-Q206D, Q206D, Q206D-K256R, Q206D-L257G, Q206D-N218S, Q206D-S248N, Q206D-S249A, S009T-N109G-A128S-K141R-N243V-S248N-K256R, S009T-S018T-Y021N-A128S-K141R-N243V, S018T-Y021N-A128S-N243V, S018T-Y021N-N061S-A128S-N243V-S260P, S018T-Y021N-N061S-N109G-A128S-S260P, S018T-Y021N-S033T-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, S033T, S033T-A128S-G131H-N243P, S033T-A128S-G131H-N243V, S033T-G169A, S033T-N076D-A128S-N218S, S033T-N076D-N109G-A128S-N218S-N243V-S248N-K256R, S033T-N109G-A128S-N243P-S248N-K256R, S033T-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, S033T-P040E-Q103H-N109G, S033T-Q103H-A128S-G131H,

S033T-S063G-Q103H-N109Q-A128S-G131H-G169A-N243P, S033T-S063G-Q103H-N109Q-A128S-G131H-G169A-N243V, S063G-G131H, S063G-G169A, S063G-N109G-A128S-G131H, S063G-Q206D, S162G-Q206D, T158S-Q206D, e T158S-S162G;

(v) A001E-A088T, A001E-A128S, A001E-A128S-G131H-N243V, A001E-G024E, A001E-G024E-S204E-Q206D, A001E-G131H-G169A-N243V, A001E-K043Y, A001E-N076D, A001E-N076D-N109G-A128S, A001E-N218S, A001E-N243V, A001E-Q103H, A001E-Q206D, A001E-S033T, A001E-S033T-N109G-N218S, A001E-S162G, A116T-Q206D, A128S-N243V-S248N-K256R, A128S-Q206D, G024E-Q206D, G131H-Q206D, K043Y-G131H, K043Y-Q103H, K043Y-Q206D, K043Y-S162G, N061S-N109G-A128S-N243V-S260P, N076D-A128S, N076D-Q206D, N076D-S162G, N076D-S248N, N109G-A128S-S248N-K256R, N109G-A128S-T158S-N243V-S248N-K256R, N109G-N243P-S248N-K256R, N109G-Q206D, N243V-S248N-K256R, P040E-N109G-A128S-G131H, Q103H-Q206D, Q206D-K256R, Q206D-N243V, Q206D-S248N, Q206D-S249A, S018T-Y021N-N061S-A128S-N243V-S260P, S018T-Y021N-N061S-N109G-A128S-S260P, S033T-A128S-G131H-N243P, S033T-N076D-A128S-N218S, S033T-N076D-N109G-A128S-N218S-N243V-S248N-K256R, S033T-P040E-Q103H-N109G, S033T-S063G-Q103H-N109Q-A128S-G131H-G169A-N243P, S063G-Q206D, S162G-Q206D, e T158S-Q206D;

(vi) A001E, A001E-A128S, A001E-G024E, A001E-G131H, A001E-G169A, A001E-K043Y, A001E-K256R, A001E-L257G, A001E-N076D, A001E-N109G, A001E-N218S, A001E-N243V, A001E-Q103H, A001E-Q206D, A001E-S033T, A001E-S063G, A001E-S162G, A001E-S248N, A001E-S249A, A001E-T158S, A088T-A116T, A088T-G131H, A088T-N109G, A088T-N218S, A088T-Q206D, A116T-A128S, A116T-G131H, A116T-Q206D, A116T-S248N, A128S, A128S-G131H, A128S-Q206D, G024E, G024E-N076D, G024E-N109G, G024E-

Q206D, G131H, G131H-L257G, G131H-Q206D, G169A-K256R, G169A-Q206D, K043Y, K043Y-A088T, K043Y-A116T, K043Y-A128S, K043Y-G131H, K043Y-G169A, K043Y-K256R, K043Y-L257G, K043Y-N076D, K043Y-N109G, K043Y-N218S, K043Y-N243V, K043Y-Q103H, K043Y-S063G, K043Y-S162G, K043Y-S248N, K043Y-S249A, K043Y-T158S, N076D-A088T, N076D-A116T, N076D-A128S, N076D-G131H, N076D-G169A, N076D-N109G, N076D-N218S, N076D-N243V, N076D-Q103H, N076D-Q206D, N076D-S248N, N076D-T158S, N109G, N109G-G169A, N109G-Q206D, N109G-S162G, N109G-T158S, N218S-S248N, Q103H, Q103H-A128S, Q103H-G131H, Q103H-Q206D, Q103H-S248N, Q103H-S249A, Q103H-T158S, Q206D, Q206D-K256R, Q206D-L257G, Q206D-N218S, Q206D-N243V, Q206D-S248N, Q206D-S249A, S033T, S033T-K256R, S033T-S063G, S033T-S249A, S063G-A088T, S063G-G131H, S063G-G169A, S063G-N076D, S063G-N109G, S063G-N218S, S063G-Q103H, S063G-Q206D, S162G-Q206D, S162G-S249A, S248N-S249A, S249A-K256R, T158S-Q206D, e T158S-S249A;

(vii) G131H-S162G, G131H-S248N, G131H-T158S, K043Y-G131H, K043Y-S162G, Q103H-A128S, Q103H-N218S, S033T-Q103H, S063G-A088T, S063G-G131H, S063G-S248N, e T158S-S162G;

(viii) A015S-A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-S248N, A088T-A098S-G131H-S248N-K256R-L257G, A088T-A098S-N218S-K256R, A088T-A116T-G131H-G146C, A088T-A116T-G131H-K256R, A088T-A116T-G131H-K256R-L257G-L267M, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-N243V,

A088T-A116T-G131H-S248N, A088T-A116T-G131H-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-K256R-L257G, A088T-A116T-N218S, A088T-A116T-N218S-I268V, A088T-A116T-N218S-K256R, A088T-A116T-N218S-L257G, A088T-A116T-N218S-N243V-Q271R, A088T-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R-Q275R, A088T-A116T-N218S-S248N, A088T-A116T-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-T158S, A088T-A116T-T158S-K256R, A088T-A116T-T158S-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-E251K-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-S248N, A088T-A116T-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-A116T-T158S-N243V, A088T-A116T-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-S248N-L257G, A088T-A138E-N218S-N243V-K256R, A088T-G131H, A088T-G131H, A088T-G131H-K141E-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-G131H-K256R, A088T-G131H-N218S-K237R-K256R-L257G, A088T-G131H-N218S-K256R, A088T-G131H-N218S-K256R, A088T-G131H-N218S-K256R-L257G, A088T-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-

G131H-N218S-N243V-L257G, A088T-G131H-N218S-N243V-L257G, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-G131H-N218S-S248N, A088T-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-G131H-N243V, A088T-G131H-N243V-K256R, A088T-G131H-N243V-K256R-L257G, A088T-G131H-N243V-S248N, A088T-G131H-N243V-S248N, A088T-G131H-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-S248N, A088T-G131H-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-N218S-I234T-S248N-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-V149L-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-I107T-N109G-G131H-N218S-A223G-S248N-K256R, A088T-I107T-N109G-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-I108T-N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-K213N-N243V-S248N-K256R, A088T-K256R-L257G, A088T-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-A232S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-D140G-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-D140G-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-K141E-N218S, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-

N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-N269D, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-Q275R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-L257G-I268V, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243F-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-I268V, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-V149A-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-W241L-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-K256R, A088T-N109G-A116T-M124I-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-S248N, A088T-N109G-A116T-T158S-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-S248N,

A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-V148A-N218S-N243V, A088T-N109G-D140G-N243V, A088T-N109G-G131H-A138V-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-D140G-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-K141E-T158S-N218S-K256R, A088T-N109G-G131H-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G-Q275R, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N-K256R-Q271R, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-N243V-S248N, A088T-N109G-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S, A088T-N109G-G131H-T158S-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-L233S-N243V-S248N, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-V149A-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-V149L-T158S-K256R-L257G, A088T-N109G-N218S-K256R-L257G, A088T-N109G-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-N218S-S248N-T255K-K256R-L257G, A088T-N109G-N243V-K256R, A088T-N109G-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S, A088T-

N109G-T158S-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S, A088T-N109G-T158S-N218S-K256R-L257G-Q271K, A088T-N109G-T158S-N218S-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-S248N, A088T-N109G-T158S-S248N, A088T-N109G-T158S-S248N-K256R, A088T-N109G-W241R-S248N-K256R, A088T-N218S-N243V-K256R, A088T-N218S-N243V-L257G, A088T-N218S-N243V-S248N, A088T-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N218S-S248N, A088T-N218S-S248N-L257G, A088T-N218S-S248N-L257G-Q271R, A088T-S248N-K256R-L257G, A088T-T158S-K256R, A088T-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-T158S-N218S-L257G, A088T-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-T158S-N218S-Q245K-S248N-K256R, A088T-T158S-N218S-S248N, A088T-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-T158S-N218S-S248N-L257G-Q275K, A088T-T158S-N243V, A088T-T158S-N243V-K256R, A088T-T158S-N243V-S248N, A088T-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-T158S-S248N-L257G, A088T-T158S-V203I-N218S-K256R-L257G, A088T-V147I-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-Y104H-A116T-G131H-N218S-N243V, A116T-D140G-T158S-N218S-N243V-S248N, A116T-G131H-K141E-N218S-N243V-S248N-L257G, A116T-G131H-L257G, A116T-G131H-N218S-N243V, A116T-G131H-N218S-N243V-K256R, A116T-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, A116T-G131H-N218S-N243V-

S248N-K256R, A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-G131H-N218S-S248N, A116T-G131H-N218S-S248N-K256R, A116T-G131H-N218S-W241R-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-G131H-N243V-S248N-K256R, A116T-G131H-T158S-N218S-L257G, A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A116T-G131H-T158S-N218S-S248N, A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G-N269D, A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-Q271R, A116T-G131H-T158S-N243V-K256R, A116T-G131H-T158S-N243V-S248N, A116T-G131H-V139I-N218S-N243V-S248N, A116T-G131H-V150A-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-G157E-T158S-N243V-S248N-K256R, A116T-K141E-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-K256R, A116T-N218S-N243V-S248N, A116T-N218T-N243V-S248N, A116T-N243V-K256R-L257G, A116T-S248N-K256R, A116T-T158S-N218S, A116T-T158S-N218S-K256R, A116T-T158S-N218S-K256R-L257G, A116T-T158S-N218S-N243V-L257G, A116T-T158S-N218S-N243V-S248N, A116T-T158S-N218S-S248N-L257G, G024S-G053S-N078S-G097A-N101S, G053S-A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-G169S-N218S-S248N-K256R-L257G, G065D-A088T-G131H-N243V-S248N, G131H-K141R-T158S-N218S-K256R, G131H-K256R, G131H-N218S-K256R-L257G, G131H-N218S-L257G, G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, G131H-N218S-S248N, G131H-N218S-S248N-K256R, G131H-N243V-S248N, G131H-N243V-S248N-L257G, G131H-T158S-N218S, G131H-T158S-N218S-N240H-N243V-S248N-K256R-L257G, G131H-T158S-N218S-N243V, G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, G131H-T158S-N218S-S248N-I268V, G131H-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G-N269S, G131H-T158S-N243V-L257G, G131H-T158S-N243V-S248N, G131H-T158S-S248N, I107T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, I107T-N109G-G131H-N218S-L257G, K256R, K256R-L257G, L090I-N109G-T158S-N243V, L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-

N243V, N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-S248N-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-W241R-N243V-K256R, N109G-A116T-G131H-S248N-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-K256R, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-K256R-L257G-Q271R, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-I234T-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-K141E-T158S-N218S-N243V-L257G, N109G-A116T-N218S-N243V-S248N, N109G-A116T-N218S-W241R-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S-K237R-N243V-S248N, N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N, N109G-G131H-K141E-L257G, N109G-G131H-N218S-N243V, N109G-G131H-N218S-N243V-S248N, N109G-G131H-S248N, N109G-G131H-T158S, N109G-G131H-T158S-L257G, N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-S248N-K256R, N109G-N218S-K256R-L257G, N109G-N218S-N243V-S248N-K256R, N109G-N218S-S248N-L257G, N109G-S248N, N109G-T158S-N218S, N109G-T158S-N218S-N243V, N109G-T158S-N218S-N243V-L257G, N109G-T158S-N218S-S248N-K256R, N109G-T158S-N243V-L257G, N109G-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, N218S-K256R, N218S-N243V-K256R, N218S-N243V-S248N, N218S-S248N, N218S-S248N-K256R, N218S-S248N-K256R-L257G, N243V-L257G, S003P-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N, S003P-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-K256R, S003P-N109G-G131H-T158S-L257G, S003P-S248N-L257G, S105H-W106G-I107L-I108S-N109A-

G110A-I111S-E112N-W113G-A114P, S248N-L257G, T158S, T158S-K256R, T158S-N218S, T158S-N218S-K256R, T158S-N218S-L233S-S248N, T158S-N218S-L257G, T158S-N218S-N243V-K256R, T158S-N218S-N243V-S248N, T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, T158S-N218S-S248N-L257G, T158S-N243V-S248N-K256R, T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, T158S-N243V-S248N-L257G, T158S-S248N, T158S-S248N-K256R-L257G, V004A-A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, V004L-A088T-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, Y006H-N218S-N243V-S248N, e Y104H-N109G-G131H-N243V-S248N;

(ix) A088T-A098S-G131H-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-K256R, A088T-A116T-G131H-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-S248N, A088T-A116T-G131H-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-V150A-N218S-S248N-L257G, A088T-A116T-K256R-L257G, A088T-A116T-K256R-L257G, A088T-A116T-L257G, A088T-A116T-N218S, A088T-A116T-N218S, A088T-A116T-N218S-N243V-Q271R, A088T-A116T-N218S-N243V-S248N, A088T-A116T-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-T158S, A088T-A116T-T158S, A088T-A116T-T158S-K256R, A088T-A116T-T158S-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-S248N, A088T-A116T-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-

T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-A138E-N218S-N243V-K256R, A088T-G131D-T158S-N243V-S248N, A088T-G131H, A088T-G131H-L257G, A088T-G131H-N218S-K237R-K256R-L257G, A088T-G131H-N218S-K256R, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-G131H-N243V-K256R, A088T-G131H-N243V-L257G, A088T-G131H-N243V-S248N, A088T-G131H-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-N218S-I234T-S248N-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-S248N, A088T-G131H-T158S-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-V149L-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-I108T-N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-K213N-N243V-S248N-K256R, A088T-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-D140G-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-K141E-N218S, A088T-N109G-A116T-G131H-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-Q275R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-L257G-I268V, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-V149A-T158S-N218S-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-W241L-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-M124I-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-S248N-

K256R, A088T-N109G-A116T-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N212D-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-S248N, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-T158S-S248N-L257G-Q271P, A088T-N109G-A116T-V148A-N218S-N243V, A088T-N109G-A137E-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-D140G-N243V, A088T-N109G-G131H-A152S-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-D140G-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S, A088T-N109G-G131H-N218S-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N, A088T-N109G-G131H-N243V-S248N, A088T-N109G-G131H-T158S-L233S-N243V-S248N, A088T-N109G-G131H-T158S-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-W241R-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-S248N-K256R, A088T-N109G-L257G, A088T-N109G-N218S-K256R-L257G, A088T-N109G-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-N218S-S248N-T255K-K256R-L257G, A088T-N109G-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-S248N, A088T-N109G-T158S-N218S-S248N, A088T-

N109G-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-T158S-N243V-S248N-Q275R, A088T-N109G-T158S-S248N, A088T-N109G-T158S-S248N-K256R, A088T-N109G-W241R-S248N-K256R, A088T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N218S-S248N-L257G, A088T-N243V-L257G, A088T-S248N, A088T-S248N-K256R-L257G, A088T-S248N-L257G, A088T-S248N-L257G-I268V, A088T-T158S-K256R, A088T-T158S-N218S-K256R, A088T-T158S-N218S-L257G, A088T-T158S-N218S-L257G, A088T-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-T158S-N218S-Q245K-S248N-K256R, A088T-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-T158S-N218S-S248N-L257G-Q275K, A088T-T158S-N243V-K256R, A088T-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-T158S-N243V-L257G, A088T-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-T158S-S248N, A088T-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-T158S-S248N-L257G, A088T-T158S-V203I-N218S-K256R-L257G, A088T-Y104H-A116T-G131H-N218S-N243V, A088T-Y104H-N109G-A116T-A153S-N218S-N243V-S248N-L257G-N269D, A088T-Y104H-N109G-G131H-A137E-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A098S-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-D140G-T158S-N218S-N243V-S248N, A116T-G131H-K141E-N218S-N243V-S248N-L257G, A116T-G131H-N218S-W241R-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-G131H-N243V, A116T-G131H-T158S-K256R-L257G, A116T-G131H-T158S-N218S-N243V, A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A116T-G131H-T158S-N243V-S248N, A116T-G131H-V139I-N218S-N243V-S248N, A116T-G157E-T158S-N243V-S248N-K256R, A116T-N218S-S248N, A116T-N218S-S248N-K256R, A116T-N243V-K256R, A116T-S248N-K256R, A116T-T158S, A116T-T158S-L257G-Q271R, A116T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, G053S-A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-G169S-N218S-S248N-K256R-L257G, G065D-A088T-G131H-N243V-

S248N, G131H-N218S-L257G, G131H-N218S-S248N, G131H-N243V-K256R, G131H-S248N-K256R, G131H-T158S, G131H-T158S-K256R, G131H-T158S-N243V-L257G, K256R, K256R-L257G, L090I-N109G-T158S-N243V, L257G, N109G-A116T-G131H, N109G-A116T-G131H-N243V, N109G-A116T-G131H-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, N109G-A116T-I234T-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-N218S-N243V-L257G, N109G-A116T-N218S-W241R-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-S248N-K256R, N109G-A116T-T158S-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S-K237R-N243V-S248N, N109G-A116T-T158S-N218S-S248N-K256R, N109G-A116T-T158S-N243V, N109G-A116T-T158S-S248N, N109G-A116T-T158S-S248N-K256R, N109G-G131H-A137V-T158S-N218S-S248N, N109G-G131H-K141E-L257G, N109G-G131H-T158S, N109G-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, N109G-G131H-T158S-S248N-Q271R, N109G-N218S-S248N-K256R, N109G-N243V-S248N-L257G, N109G-S248N, N109G-T158S-K256R-L257G, N109G-T158S-N218S-N243V-L257G, N109G-T158S-N243V-K256R-L257G, N109G-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, N243V, P014L-A015L-L016C-H017T-S018L-Q019K-G020A-Y021T-T022L-G023E, S003P-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-K256R, S003P-N109G-G131H-T158S-L257G, S003P-S248N-L257G, S105H-W106G-I107L-I108S-N109A-G110A-I111S-E112N-W113G-A114P, T158S-N218S-N243V-K256R, T158S-N218S-N243V-S248N, T158S-N218S-S248N-K256R, T158S-N243V-S248N, T158S-S248N, T158S-S248N-K256R, T158S-S248N-K256R-L257G, V004A-A088T-A116T-T158S-N218S, V004A-A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, V004M-A116T-V148A-T158S-N243V-S248N-K256R, Y006H-N109G-N218S-N243V-S248N, Y104H-A116T-T158S-S248N, Y104H-N109G-G131H-N243V-

S248N, e Y104H-N218S-L257G;

(x) A045S-S236G, A045S-S236Y, A134T-S260G, G024A-S037W, I031V-S038W, I115T-S183T, I115V-N184Y, N025K-P129K, N025K-P129R, N025K-S037P, N061D-S260I, Q010L-S037P, Q010R-S037T, Q019L-S260N, Q019L-S260P, S037P-T254S, S161P-T253A, e S162L-D181H;

(xi) A045S-S236G, A045S-S236Y, A133V-S260N, A134T-S260G, G024A-S037W, I031V-S038W, I115T-S183T, I115V-N184Y, N025K-P129R, N025K-S037P, N061D-S260I, Q010R-S037T, Q019L-S260N, Q019L-S260P, e S162L-D181H; e

(xii) A045S-S236G, A045S-S236Y, I115T-S183T, N025K-S037P, N061S-S260P, Q010L-S037P, Q010R-S037T, Q019L-S260N, S037P-T254S, e S161P-S260P; sendo que cada posição de aminoácido da variante é numerada por correspondência a uma posição de aminoácido na sequência de aminoácidos da SEQ ID nº 2.

[00151] Uma variante de acordo com o nono aspecto da invenção pode ter atividade proteolítica intensificada e/ou atividade de limpeza intensificada em comparação à protease descrita na SEQ ID nº 2, SEQ ID nº 4, ou SEQ ID nº 6, respectivamente. Uma variante de acordo com o nono aspecto da invenção pode ter um índice de desempenho em um teste proteolítico (por exemplo, teste AAPF) ou um teste de limpeza (por exemplo, SLT, grama, ou teste em amostra de tecido com ovo) que é maior que o da protease descrita na SEQ ID nº 2, SEQ ID nº 4, ou SEQ ID nº 6. Uma variante de acordo com o nono aspecto da invenção pode ser uma variante de protease da protease subtilisina BPN' (SEQ ID nº 2).

[00152] Em um vigésimo primeiro aspecto, a invenção apresenta uma protease para água fria isolada ou que não tem ocorrência natural que é uma variante de uma protease original, a dita protease para água fria compreendendo um total de três, quatro, cinco, seis, sete, oi-

to, nove, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 mutações selecionadas a partir dos grupos (a) e (b) abaixo, sendo que pelo menos uma mutação é selecionada a partir do grupo (a):

(a) 1, 9, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 33, 43, 76, 102, 109, 137, 141, 158, 169, 204, 210, 218, 243, 248, 249, 256, 257, 260, e 269; e

(b) 24, 25, 40, 52, 53, 55, 58, 59, 61, 62, 63, 68, 78, 86, 87, 88, 89, 92, 96, 97, 100, 101, 103, 104, 106, 111, 114, 115, 116, 117, 118, 123, 124, 125, 126, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 144, 145, 159, 161, 162, 167, 194, 203, 206, 213, 217, 227, 232, 239, 240, 242, 265, 267, e 275, sendo que as posições de aminoácido são numeradas por correspondência com a SEQ ID nº 2. Uma protease original de acordo com o vigésimo primeiro aspecto da invenção pode compreender uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade com a sequência de aminoácidos da SEQ ID nº 2 e a variante de acordo com o vigésimo primeiro aspecto da invenção pode compreender um total de três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 mutações selecionadas a partir dos grupos (a) e (b) abaixo, sendo que pelo menos uma mutação é selecionada a partir do grupo (a):

(a) A1E/T, S9/T, P14L, A15L, L16C, H17T, S18L/T, Q19K, G20A, Y21N/T, T22L, G23E, S33T, K43Y, N76D, G102A, N109A/S/G, A137V, K141R, T158S, G169A, S204E, P210S, N218S, N243P/V, S248N/A, S249A, K256R, L257G, S260P, e N269D; e

(b) S24G/R/E, N25G, P40A/E, P52L, S53G, T55P, F58G, Q59S, N61E/P/G/S, N62Q/R/S, S63G/H, V68A, S78N, P86S, S87D/G, A88T/V, S89Y, A92G, L96T, G97A, G100N/Q/T, S101N, Q103E/H, Y104N, W106F, I111V, A114G, I115V, A116N/T, N117S, N118G, N123A/G/Q/V, M124I/V, S125A, L126A, G128A/S, P129E/Q/S/V,

S130G, G131S/H, S132N, A133V, A134T, A144K, S145D, S159K, S161P, S162G/K, Y167A, P194L, V203Y, Q206D/E, K213L, Y217Q/L/D, V227T, A232T, P239R/V, N240K, T242R, K265N, L267V, e Q275E. Uma protease variante e original acordo com o segundo aspecto da invenção pode estar sob uma forma madura.

[00153] Uma variante de acordo com o vigésimo primeiro aspecto da invenção pode ter uma carga líquida total de -1, 0 ou +1 em relação a BPN' selvagem.

[00154] No primeiro, segundo, quarto, quinto, sexto, sétimo, oitavo, nono, ou vigésimo primeiro aspectos da invenção, a variante pode ser uma variante de protease subtilisina que tem desempenho de lavagem ou desempenho de limpeza aprimorados em um detergente em comparação ao da protease subtilisina original, que pode ser uma protease subtilisina. No terceiro aspecto da invenção, o polipeptídeo pode ter desempenho de lavagem ou desempenho de limpeza aprimorados em um detergente em comparação ao da protease da SEQ ID n° 2, SEQ ID n° 4 ou SEQ ID n° 6. Exemplos de detergentes para tais aspectos são mostrados nos exemplos da parte I e nos exemplos da parte II.

[00155] Uma variante de protease de acordo com o primeiro, segundo, terceiro, quarto, quinto, sexto, sétimo, oitavo, nono, ou vigésimo primeiro aspectos da invenção pode ser uma protease para água fria. Em um aspecto, uma variante de protease de acordo com o primeiro, segundo, terceiro, quarto, quinto, sexto, sétimo, oitavo, nono, ou vigésimo primeiro aspectos da invenção pode ser uma protease para água fria que tem: (i) um índice de desempenho (PI) maior que 1, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de pelo menos 1 a cerca de 10, de pelo menos 1 a cerca de 8, ou de pelo menos 1 a cerca de 5 em SLT a pH 8 e 16°C (60°F) quando comparada a uma enzima que tem a sequência

de aminoácidos da SEQ ID nº 4, conforme definido no método de teste apresentado no exemplo 1 da parte I; ou (ii) um índice de desempenho de pelo menos 1, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de pelo menos 1 a cerca de 10, de pelo menos 1 a cerca de 8, ou de pelo menos 1 a cerca de 5 em SLT a pH 8 e 16°C (60°F) quando comparada a uma enzima que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID nº 6, conforme definido no método de teste apresentado no exemplo 1 da parte I.

[00156] Conforme observado acima, os polipeptídeos da variante de protease da invenção possuem atividades enzimáticas (por exemplo, atividades proteolíticas) e, desta forma, são úteis em aplicações para limpeza, incluindo, mas não se limitando aos métodos para limpeza de louças, utensílios de mesa, tecidos, e itens que possuem superfícies duras (por exemplo, a superfície dura de uma tabela, tampo da mesa, parede, item de mobília, piso, teto, etc.). Exemplos de composições de limpeza que compreendem um ou mais polipeptídeos da variante de protease da invenção são descritos *abaixo*. A atividade enzimática (por exemplo, atividade da protease) de um polipeptídeo da variante de protease da invenção pode ser facilmente determinada com o uso de procedimentos bem conhecidos dos versados na técnica. Os exemplos apresentados *abaixo* descrevem métodos para avaliar a atividade enzimática, desempenho de limpeza, e/ou desempenho de lavagem. O desempenho de variantes de protease da invenção na remoção de manchas (por exemplo, uma mancha proteinácea), limpeza de superfícies duras, ou limpeza de roupas, louças ou utensílios de mesa pode ser facilmente determinado com o uso de procedimentos bem conhecidos na técnica e/ou usando os procedimentos descritos nos exemplos da parte I e/ou exemplos da parte II.

[00157] Um polipeptídeo da invenção pode ser submetido a várias

alterações, como, por exemplo, uma ou mais inserções, deleções, e/ou substituições de aminoácido, conservativas ou não conservativas, incluindo quando estas alterações não alteram substancialmente a atividade enzimática do polipeptídeo. De maneira similar, um ácido nucleico da invenção também pode ser submetido a várias alterações, como, por exemplo, uma ou mais substituições de um ou mais ácidos nucleicos em um ou mais códons para que um códon particular codifique um aminoácido igual ou diferente, resultando em uma variação silenciosa (por exemplo, uma mutação em uma sequência de nucleotídeo resulta em uma mutação silenciosa na sequência de aminoácido, por exemplo, quando o aminoácido codificado não é alterado pela mutação de ácido nucleico) ou variação não silenciosa, uma ou mais deleções de um ou mais ácidos nucleicos (ou códons) na sequência, um ou mais adições ou inserções de um ou mais ácidos nucleicos (ou códons) na sequência, e/ou clivagem de um ou mais truncamentos de um ou mais ácidos nucleicos (ou códons) na sequência. Muitas destas alterações na sequência de ácido nucleico podem não alterar substancialmente a atividade enzimática da variante de protease resultante codificada em comparação com a variante de protease codificada pela sequência de ácido nucleico original. Um ácido nucleico da invenção também pode ser modificado para incluir um ou mais códons que fornecem expressão ótima em um sistema de expressão (por exemplo, sistema de expressão bacteriano), enquanto, se desejado, os ditos um ou mais códons ainda codificam os mesmos aminoácido(s).

[00158] A presente invenção inclui um gênero de polipeptídeos que compreende polipeptídeos da variante de protease que possuem a atividade enzimática desejada (por exemplo, atividade da protease ou atividade de desempenho de limpeza) que compreende sequências que possuem as substituições de aminoácido aqui descritas e que compreendem também uma ou mais substituições de aminoácido adi-

cionais, como, por exemplo, substituições conservativas e não conservativas, sendo que o polipeptídeo exibe, mantém ou mantém aproximadamente a atividade enzimática desejada (por exemplo, atividade da protease ou atividade de subtilisina, conforme refletido na atividade de limpeza ou desempenho da variante de protease). As substituições de aminoácido de acordo com a invenção podem incluir, mas não se limitam a, uma ou mais substituições não conservativas e/ou uma ou mais substituições de aminoácido conservativas. Uma substituição conservativa de um resíduo de aminoácido envolve tipicamente a troca de um elemento dentro de uma classe funcional de resíduos de aminoácido por um resíduo que pertence à mesma classe funcional (resíduos de aminoácido idênticos são considerados funcionalmente homólogos ou conservados ao calcular o percentual de homologia funcional). Uma substituição de aminoácido conservativa envolve tipicamente a substituição de um aminoácido em uma sequência de aminoácidos por um aminoácido funcionalmente similar. Por exemplo, alanina, glicina, serina, e treonina são funcionalmente similares e assim podem servir como substituições de aminoácido conservativas umas para as outras. Ácido aspártico e ácido glutâmico podem servir como substituições conservativas um para o outro. Asparagina e glutamina podem servir como substituições conservativas uma para a outra. Arginina, lisina, e histidina podem servir como substituições conservativas uma para a outra. Isoleucina, leucina, metionina, e valina pode servir como substituições conservativas uma para a outra. Fenilalanina, tirosina, e triptofano podem servir como substituições conservativas um para o outro.

[00159] Outros grupos de substituição de aminoácido conservativa podem ser previstos. Por exemplo, os aminoácidos podem ser agrupadas por função ou estrutura química ou composição similar (por exemplo, ácidos, básicos, alifáticos, aromáticos, ou contendo enxofre). Por

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

[00160] As substituições mais conservativas existem dentro das classes de resíduo de aminoácido descritas acima, que podem, também ou alternativamente, ser adequadas. Os grupos de conservação para substituições que são mais conservativas incluem: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, e asparagina-glutamina. Desta forma, por exemplo, a invenção inclui um polipeptídeo de variante de protease isolada ou recombinante (por exemplo, variante de subtilisina) que tem atividade proteolítica, o dito polipeptídeo de variante de protease compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos cerca de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 99,5% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID nº 2. Não se espera que uma substituição conservativa de um aminoácido por outro em uma variante de protease da invenção altere significativamente a atividade enzimática ou a atividade de desempenho de limpeza da variante de protease. A atividade enzimática ou atividade de desempenho de limpeza da pro-

tease resultante pode ser facilmente determinada usando testes padrão e os testes aqui descritos.

[00161] As variações substituídas de modo conservativo de uma sequência de polipeptídeo da invenção (por exemplo, variantes de protease da invenção) incluem substituições de uma pequena porcentagem, algumas vezes menos que cerca de 25%, 20%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, ou 6% dos aminoácidos da sequência de polipeptídeo, ou menos que cerca de 5%, 4%, 3%, 2%, ou 1%, dos aminoácidos da sequência de polipeptídeo, por um aminoácido conservativo.

[00162] Conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento e nos exemplos aqui fornecidos, os polipeptídeos da invenção podem ter capacidades de limpeza que podem ser comparadas a proteases conhecidas, inclusive subtilisinas conhecidas. Os exemplos de proteases de subtilisina conhecidas incluem, mas não se limitam a, subtilisina de *B. lentus* GG36, BPN' de subtilisina de *B. amyloliquefaciens*, BPN'-Y217L, de subtilisina de *B. amyloliquefaciens* e *B. clausii* PB92.

[00163] Vários polipeptídeos da invenção, incluindo variantes de protease, como, por exemplo, as variantes de protease subtilisina descritas e apresentadas ao longo do relatório descritivo, incluindo, mas não se limitando a, aos exemplos. Os exemplos da parte I descrevem as variantes de protease da invenção, incluindo, por exemplo, mas não se limitando a, variantes de protease de BPN'. Os exemplos da parte II descrevem variantes de protease da invenção adicionais, incluindo, por exemplo, mas não se limitando a variantes de protease GG36.

[00164] A presente invenção fornece variantes de protease, incluindo variantes de serina protease, que possuem uma ou mais substituições em comparação a uma serina protease de referência. Em um aspecto, a presente invenção apresenta proteases para água fria.

Além disso, a presente invenção apresenta composições que compreendem uma ou mais destas variantes de protease, por exemplo, variantes de serina protease. Uma composição pode compreender pelo menos uma variante de protease da invenção e um ingrediente auxiliar, conforme descrito em outro local no presente documento. Em um aspecto, a presente invenção apresenta composições de limpeza que compreende pelo menos uma destas variantes de protease, por exemplo, variantes de serina protease. Uma composição de limpeza pode ser uma composição detergente. A tendência na limpeza é usar temperaturas de lavagem inferiores para economizar energia. As enzimas possuem menor atividade a temperaturas mais baixas resultando em desempenho de limpeza reduzido. Existe uma necessidade na técnica por enzimas com desempenho aprimorado em condições de lavagem em água fria em relação às enzimas atualmente conhecidas na técnica. A presente invenção aborda esta necessidade.

[00165] A presente invenção apresenta composições de limpeza que compreendem pelo menos uma variante de serina protease aqui descrita, como, por exemplo, uma variante de protease subtilisina. A variante de protease subtilisina pode ser uma variante de protease BPN'. Conforme discutido em mais detalhes *acima*, a invenção inclui uma composição que compreende uma variante de protease BPN' e uma variante de protease GG36. Algumas variantes de protease, incluindo, mas não se limitando a, por exemplo, variantes de subtilisina da invenção, são proteases para água fria. A composição de limpeza pode ser um detergente para lavagem de roupas. O detergente para lavagem de roupas pode ser um detergente que tem um pH entre 3 e 11 (por exemplo, entre pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 7.5, pH 8, pH 9, pH 10, pH 10.5, etc.) um detergente para água fria, um detergente para baixo pH (por exemplo, pH 3 a 6), detergente para pH neutro (por exemplo, pH 6,5 a 7,5), um detergente para pH alcalino (por exemplo,

pH 9 a 11) ou um detergente compacto. Um detergente pode incluir fosfato ou não ter fosfato. A composição de limpeza pode ser um detergente para lavar louças. Em um aspecto, o detergente para lavar louças é um detergente sem fosfato, enquanto em outro aspecto, o detergente para lavar louças é um detergente contendo fosfato. Em um aspecto, a composição de limpeza da invenção compreende, adicionalmente, pelo menos uma enzima adicional, que pode ser, opcionalmente, selecionada a partir do grupo que compreende uma metaloprotease neutra, lipase, cutinase, amilase, carboidrase, celulase, pectinase, mananase, arabinase, galactanase, xilanase, peridrolase, oxidase, e peroxidase. Também são fornecidos ácidos nucleicos isolados que codificam uma variante de serina protease da invenção, vetores de expressão que compreendem uma ou mais destes ácidos nucleicos da invenção, e células hospedeiras que compreendem pelo menos um deste vetor de expressão da invenção.

[00166] Por todo o relatório descritivo, para facilidade de referência, um "conjunto de substituições de aminoácido" ou "conjunto de substituições" pode se referir a um conjunto de várias substituições de aminoácido (isto é, G097A+G128A+Y217Q) ou conjunto de uma única substituição de aminoácido (isto é, Y217Q). Desta forma, uma variante BPN' que compreende a sequência BPN' (SEQ ID nº 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em G097A-G128A-Y217Q e Y217Q indica que a variante de BPN' compreende uma sequência de aminoácidos que compreende BPN'-G097A-G128A-Y217Q ou BPN'-Y217Q.

[00167] A sequência de aminoácidos da variante de protease subtilisina BPN'-v3 madura, que é apresentada na SEQ ID nº 4, pode ser representada como BPN'-G097A-G128A-Y217Q, que significa a sequência de aminoácidos BPN' da SEQ ID nº 2 com as três substituições G097A, G128A, e Y217Q. Neste formato, cada traço (-) é equi-

valente a usar um sinal de mais (+). Desta forma, BPN'-G097A-G128A-Y217Q pode ser alternativamente escrita como BPN'+G097A+G128A+Y217Q. A sequência de aminoácidos da variante de protease subtilisina BPN'-v36 madura, que é apresentada na SEQ ID nº 6, pode ser escrita como BPN'-S24G-S53G-S78N-S101N-G128A-Y217Q ou BPN'+S24G+S53G+S78N+S101N+G128A+Y217Q. As variantes de BPN' da invenção podem ser mostrados com o uso destes formatos.

[00168] Além disso, a presente invenção apresenta variantes de subtilisina, sendo que cada uma destas variantes é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende a sequência de aminoácidos de BPN'-v3 (SEQ ID nº 4) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em S87T-A88L-S89G, N61P-S63H, S87G-A88V-S89A, P86S-S87G-A88V, Q59S-N61P, S24G-N25G, N61P-N62S, P129Q-S130G-G131S, L75S-N76Y, V203Y, T55P, A88V-L90I, G211R-N212S-K213V, G23A-S24G-N25G, T22N-S24A, S24R, A98S, T158G-S159G, Q59E-N61P, e A98E, e sendo que as posições do aminoácido são numeradas por correspondência à sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* apresentada como SEQ ID nº 2.

[00169] Observe que a sequência de aminoácidos de BPN'-v3, que é apresentada como SEQ ID nº 4, pode ser escrita como BPN'-G97A-G128A-Y217Q. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica, sendo que a dita variante compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID nº 4 tendo uma substituição de aminoácido A128S na SEQ ID nº 4. Desta forma, a invenção inclui a sequência de aminoácidos BPN'-G97A-G128A-Y217Q. Por todo este relatório descritivo, as variantes de polipeptídeo da invenção podem ser descritas como uma variante de um polipeptídeo de referência compreendendo uma ou mais substituições de aminoácido específicas

em uma ou mais posições especificadas na sequência de polipeptídeo de referência, respectivamente.

[00170] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina, sendo que cada uma destas variantes é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende a sequência de aminoácidos de BPN'-v3 (SEQ ID nº 4) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em P86S-S87G-A88V-A116N-N117S-N118G, S24G-N25G-N61P-S101N, S24G-N25G-S53G-T55P-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, N61P-S78N-S101N-V203Y, T55P-N61P-S78N-S101N-V203Y, S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N, V203Y-L267V, S24G-N25G-T55P-S101N, A134T-L267V, S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G, S24G-N25G-S53G-N61P-S101N-V203Y, N25Y-Q59S-N61P, I111V-S161P, I115V-L267V, T55P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, N25Y-P129Q-S130G-G131S-A137T, N61P-S63H-A128S-P129Q, S53G-N61P-S101N-V203Y, S24G-N25G-S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N, N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N, N25Y-N61P-S63H, Q59S-N61P-V203Y, V8L-N25Y-P129Q-S130G-G131S, P86S-S87G-A88V-P239R, S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S101N-V203Y, S24G-N25G-P129Q-S130G-G131S, N240K, G23A-S24G-N25G-G211R-N212S-K213V, N61P-S63H-S78N-I111V-A134T, S63T-P86S-S87G-A88V, G23A-S24G-N25G-A116N-N117S-N118G, S78N-S87T-A88L-S89G-S101N, S24G-N25G-A116N-N117S-N118G, T55P-N240K, T55P-P129V-P194S, N25Y-S87G-A88V-S89A, S24G-N25G-S87T-A88L-S89G-S101N, P129Q-S130G-G131S-V203Y, Q59S-N61P-N240K, S24R-P40E-P129E-S159K-K265R, P52S-T55P-V203Y, S24R-P129E, S24G-N25G-S53G-N61P-S78N, S24G-N25G-T55P-S78N-S101N, P86S-S87G-A88V-A116S-N117G-N118R, N61P-S87T-A88L-S89G, S24G-N25G-S53G-T55P-S78N-S87T-A88L-S89G, G23A-S24G-N25G-N61P-S63H, S24R-Q59S-N61P, N61P-P129Q-

S130G-G131S, S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N, S24G-N25G-S53G-T55P-S101N-V203Y, N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, S24G-N25G-S53G-T55P-S78N-S101N, S24G-N25G-S53G-S101N-V203Y, S24G-N25G-S78N-S101N-V203Y, P129Q-S130G-G131S-A133V-L267V, S87T-A88L-S89G-S101N, G23A-S24G-N25G-P239R, S87G-A88V-S89A-A116N-N117S-N118G, Q59S-N61P-A116S-N117G-N118R, Q59S-N61P-S87T-A88L-S89G, S24G-N25G-S53G-S87T-A88L-S89G-V203Y, A134T-G211T, T55P-A128S-P129Q, T55P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N, P86S-S87G-A88V-T242R, S161P-V203Y, S24G-N25G-T55P-N61P-S78N-S101N-V203Y, G211T-L267V, P40E-T55P-N269K, S24R-A128S-P129G, S24G-N25G-N61P-N62S-P194L-A232T, T55P-A116S-N117G-N118R, S24G-N25G-S53G-S78N-S101N-V203Y, P129Q-S130G-G131S-N240K, S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G, N25Y-P129Q-S130G-G131S, T55P-I115V, N25Y-T55P, G23A-S24G-N25G-A128S-P129D, S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-P129S-V203Y, T55P-A134T, N61P-S63H-S78N-I111V, N61P-A97G-G102A-A128G-P129S, S53G-N61P-S101N, Q59S-N61P-S87G-A88V-S89A, S53G-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, S87T-A88L-S89G-P129S, S53G-T55P-S78N-S101N-V203Y, T55P-P129Q-S130G-G131S, Q59S-N61P-P129Q-S130G-G131S, A134T-P239R, T55P-V203Y, T55P-S78N-S89Y, T22N-S24A-N61P-S63H, S161P-L267V, T55P-L75H-N76G, A134T-S161P, S87T-A88L-S89G-A134T, T55P-A116N-N117S-N118G, A128S, T55P-S78N-I115V, Y6Q-P129Q-S130G-G131S, S24R-P129Q-S130G-G131S, S24G-N25G-S53G-S78N-S101N, T55P-P129V, N61P-N62Q-G100N-A128G, T55P-P129Q, S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, S87T-A88L-S89G-N240K, A134T-N240K, S87T-A88L-S89G-P239R, P129Q-S130G-G131S-L267V, P129Q-N240K, S78N-S87T-A88L-S89G-V203Y, I111V-A273S, S24G-N25G-T55P-S78N-A88V-S101N, S24G-N25G-T55P-S78N,

S24G-N25G-S53G-S78N-S87T-A88L-S101N-V203Y, S24G-N25G-S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-V203Y, S24G-N25G-S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, S87G-A88V-S89A-P129Q-S130G-G131S, N61P-S63H-S78N-S161P, T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, I111V-P129Q-S130G-G131S, T22N-S24A-T55P, I115V-N240K, S87G-A88V-S89A-A116N-N117S-N118G-P172H, S24G-N25G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N, S24G-N25G-I115V-A134T, T55P-A128S-P129D, I111V-S159K, N240K-A273S, S159K-L267V, I111V-P129Q-G211T, I115V-A273S, S89Y, S24R-A116N-N117S-N118G, N61E-A144K, P129Q-S130G-G131S-P239R, S87T-A88L-S89G-I115V, T55P-A92G, S145D-S159K-N240K-Q275E, S89Y-P129Q-S130G-G131S, P129Q-S130G-G131S-S162K, I111V-A134T, P40E-S53Y-S78Y-P86S-S87G-A88V, S24G-N25G-L75H-N76G, N61P-A128G-P129S-S130P, S24R-S145D, S24R-S145D-P239R-Q275E, S24R-S78N-S182P-L267V, S53G-N61P-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, P5S-S87G-A88V-S89A-A116G-N117R, S53G-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, Q59S-N61P-A116N-N117S-N118G, P239R-A273S, S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, S24R-P129V, I111V-P239R, S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, T55P-P129L, S87T-A88L-S89G-I111V, S145D-A273S, P129Q-S130G-G131S-T242R, S3F-S87T-A88L-S89G-G211T, S87G-A88V-S89A-S162K, S89Y-G211T, S87T-A88L-S89G-A144K, P129Q-S130G-G131S-S159K, A116N-N117S-N118G-P129Q-S130G-G131S, S24G-N25G-P129V, S24G-N25G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, N123G-A128G, N61P-N62Q-G100N-G102A-M124I, S24G-N25G-K141E-T242R, S87G-A88V-S89A-A116N-N117S-N118G-A144T, T55P-N61P-S87T-A88L-S89G-G110C-S130P, L75S-N76Y-A116S-N117G-N118R, S145D-S159K-K213L-P239R-N240K, S24R-S87T-A88L-S89G, G23A-S24G-N25G-P129V, A134T-K213L, S89Y-A273S, S24R-P239R, N123G-A128G-P129S, S89Y-P239R, S24G-N25G-A92G, N61P-S63H-

I115V-A228V, A97G-A128G-Q217L, L75S-N76Y-P129V, S24R-P129L, S87G-A88V-S89A-P129Q-S182Y-S204Y-P239Q, S24R-A92G, S24R-A116S-N117G-N118R, G23A-S24G-N25G-A116G-N117R, S24G-N25G-P129L, S87T-A88L-S89G-S101G, G23A-S24G-N25G-P129L, S53G-N61P-G102A-V203Y, T55P-V147P, Y6Q-L75S-N76Y, N61P-S63H-V147P, S24R-V147P, S24G-N25G-V68C-A69G, S24G-N25G-N61P-L75S-N76Y-S101N-V203Y, L75S-N76Y-S78N-S101N-V203Y, L75S-N76Y-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-S130P, S24G-N25G-S53G-S101N-S130P-V203Y, G47E-M50I-L75S-N76Y-S162K, S53G-T55P-S87T-A88L-S89G-S101N-S130P-V203Y, S24G-N25G-L75S-N76Y-A128T-P129T-S130G-G131Q-S132C-A133G-A134T, P129Q-S130G-G131S-V147P, S53G-T55P-N61P-L75S-N76Y-S87T-A88L-S89G-G102A-S130P-V203Y, e S53G-T55P-N61P-L75S-N76Y-S101N-S130P-V203Y, e sendo que as posições de aminoácido são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* descrita como SEQ ID n° 2.

[00171] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina, sendo que a variante é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende a sequência de aminoácidos de BPN'-v3 (SEQ ID n° 4) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em P40E-S78N-S87D-Y217L, P40E-Y217L, T22V-S78N-Q206E-K213N-Y217L, T22V-S78N-K213N-Y217L, S87D-Y217L, S78N-Y217L, K213N-Y217L, Q206E-Y217L, e T22V-Y217L, e sendo que as posições de aminoácido são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* da SEQ ID n° 2.

[00172] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina, sendo que cada uma de tais variantes é uma forma madura que tem atividade proteolítica e a variante compreende a sequência de aminoácidos de BPN'-v3 (SEQ ID n° 4) compreendendo pelo menos

um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em S87D-N76D-S78N, P40E-S78N-S87D, P40E-S87D, S78N-P40E, S87D-N76D, P40E, S78N-S87D, S87D, e S78N, e sendo que as posições de aminoácido são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* da SEQ ID n° 2. Em um aspecto, as substituições conferem estabilidade enzimática aprimorada.

[00173] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina, sendo que cada uma destas variantes é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende a sequência de aminoácidos de BPN'-v3 (SEQ ID n° 4) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em S101N, A137V, N61P, S130P, Q103N, S63T, G102A, N109D-S248R, S87R, S188D, S87D-S248R, S188D-S248R, S248D, N109D-S188D-S248R, N109D, S87R-S248R, N109D-S188R, N76D, S87D-N109D-S188D-S248R, S87R-N109D-S188D-S248R, S87R-S188R-S248R, A187D, N109D-S248D, S87R-N109R-S188R-S248R, F189D, G100N, S87R-N109D-S188D, S87D-N109D-S188D, S87R-S188D-S248D, N62D, e S87D-N109D-S188D-S248D, e sendo que as posições de aminoácido são numeradas por correspondência às posições da sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* da SEQ ID n° 2.

[00174] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina, variantes de subtilisina, sendo que cada uma destas variantes é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende a sequência de aminoácidos de BPN'-v3 (SEQ ID n° 4) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir de S78N-L267V, S78N-S161P, S78N-I115V, S78N-A273S, S78N-G211T, S78N, S78N-I111V, S78N-V147L, S78N-I108V, S78N-S89Y, S78N-A138T, S78N-P172V, S78N-Q59G, P129T-V147Q-

S159D-S161P-S183T-Q185T-G211A-S224A, Q059V-I108V-V147Q-G211A-N252Q, S78N-Y167A, S78N-A92G, S78N-P129L, N061A-S087E-M124I-S161P-S224A, S78N-N62Q, S78N-V68A, S063T-S101A-L126V-S183T-T244N, S78N-M124T, P040L-S053G-Q059V-N061A-N062Q-S063T-S087E-G100N, N062Q-G100N-S125A-S159D-N240S, V68A-G102A-G211A-S125A, e S053G-V068A-G102A-P129T-Q185T, e sendo que as posições de aminoácido são numeradas por correspondência às posições de resíduos de aminoácido da sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* descrita como SEQ ID nº 2.

[00175] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina, sendo que cada uma de tais variantes é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em G97A-G128S-Y217Q-S24G-N25G-N61P-S101N, G97A-G128S-Y217Q-S53G-N61P-S101N-V203Y, G97A-G128S-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-N61P-S101N-V203Y, P52L-V68A-G97A-I111V, I111V-M124V-Y167A-Y217Q, Y104N-G128A-Y217Q, M124V-Y167A-Y217Q, I111V-M124V-Y217Q, P52L-V68A-G97A, G97A-I111V-M124V, V68A-A92G-G97A, G97A-I111V-M124V-Y167A-Y217Q, P52L-V68A-I111V-Y217Q, P52L-V68A-I111V, V68A-A92G-I111V, P52L-V68A-G97A-I111V-Y217Q, V68A-G97A-I111V, G97A-I111V-Y217Q, G97A-I111V-M124V-Y167A, S89Y-I111V-M124V, V68A-S89Y-I111V, V68A-A92G-Y217Q, I111V-Y167A-Y217Q, G97A-I111V-Y167A-Y217Q, G97A-I111V-M124V-Y217Q, V68A-I111V-Y167A-Y217Q, I111V-G128A-Y217Q, G97A-M124V-Y217Q, V68A-Y167A-Y217Q, I111V-M124V-Y167A, N62Q-G97A-I111V, G97A-M124V-Y167A-Y217Q, G97A-L126A-Y217Q, V68A-I111V-Y217Q, S89Y-M124V-Y217Q, e L96T-G97A-Y217Q, e sendo

que as posições são numeradas por correspondência às posições de resíduos de aminoácido da sequência de aminoácidos de subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* descrita como SEQ ID n° 2. Algumas destas variantes compreendem a sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID n° 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo.

[00176] A presente invenção fornece, adicionalmente, variantes de subtilisina, sendo que cada uma destas variantes é uma forma madura que tem atividade proteolítica e compreende uma sequência de aminoácidos de BPN' compreendendo pelo menos uma, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, ou mais substituições selecionadas a partir de S182E, N109I, N117H, K237D, L257Q, P225N, S105H, S236I, L235H, S249E, N76E, S145N, N243D, R247N, E195N, A98K, S182N, S161H, G83H, G131D, T71C, K136Q, P40D, A187H, L250K, S9I, N76M, S132D, Q19F, E112H, S249P, S53D, V68E, D41I, K43H, V4H, A13Y, N62P, L196E, e V44D, e sendo que as posições são numeradas por correspondência às posições de resíduos de aminoácido da sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* descrita como SEQ ID n° 2.

[00177] A presente invenção fornece, adicionalmente composições para lavagem de louça que compreendem a(s) variante(s) de subtilisina, e composições de limpeza de tecidos que compreendem a(s) variante(s) de subtilisina. Em alguns aspectos preferenciais, as composições de limpeza de louça e tecido compreendem adicionalmente pelo menos uma enzima adicional. Em alguns aspectos preferenciais, a enzima adicional é selecionada a partir de: uma protease (por exemplo, uma metaloprotease neutra, uma serina protease selvagem, ou uma segunda serina protease variante), uma lipase, uma cutinase, uma amilase, uma carboidrase, uma celulase, uma pectinase, uma mananase, uma arabinase, uma galactanase, uma xilanase, uma peridrola-

se, uma oxidase, e uma peroxidase. Além disso, a presente invenção apresenta métodos para lavagem de louça, compreendendo as etapas de: fornecer i) a composição para lavagem de louças compreendendo a variante de subtilisina, e ii) louças em necessidade de limpeza; e colocar as louças em contato com a composição para lavagem de louças sob condições eficazes para proporcionar limpeza das louças. De maneira similar, a presente invenção apresenta métodos para limpeza de tecido, compreendendo as etapas de: fornecer i) a composição para limpeza de tecido compreendendo a variante de subtilisina, e ii) roupas que precisam de limpeza; e colocar a roupa em contato com a composição para limpeza de tecido sob condições eficazes para proporcionar limpeza da roupa. Em aspectos ainda adicionais, a presente invenção apresenta um ácido nucleico isolado que codifica a variante, um vetor de expressão que compreende o ácido nucleico isolado em combinação funcional com um promotor, e/ou células hospedeiras que compreendem o vetor de expressão.

[00178] A presente invenção fornece, adicionalmente, composições de limpeza que compreendem as variantes de subtilisina aqui fornecidas. Em um aspecto, as composições de limpeza compreendem um detergente líquido, em gel, em tablete, pó e/ou grânulo. Em alguns aspectos adicionais, as composições de limpeza são selecionadas a partir de detergentes para lavanderia e detergentes para louças. Em alguns aspectos preferenciais, as composições de limpeza compreendem detergentes para lavanderia. Em alguns aspectos particularmente preferenciais, as composições de limpeza são detergentes para tarefas pesadas. Em alguns aspectos adicionais, as composições de limpeza compreendem detergentes para louças selecionados a partir de detergentes lavagem de louças à mão e para lavagem de louças automática. Em alguns adicionalmente preferenciais, as composições de limpeza aqui fornecidas compreendem adicionalmente, pelo menos um

agente de alvejamento. Em alguns aspectos adicionais, as composições de limpeza aqui fornecidas são isentas de fosfato, enquanto que em alguns aspectos alternativos, as composições de limpeza aqui fornecidas são detergentes contendo fosfato. Em aspectos ainda adicionais, as composições de limpeza aqui fornecidas são detergentes para água fria. Em alguns aspectos adicionais, as composições de limpeza aqui fornecidas compreendem adicionalmente pelo menos uma enzima adicional. Em um aspecto, as composições de limpeza compreendem pelo menos uma enzima adicional selecionada do grupo que consiste em uma hemicelulase, celulase, peroxidase, protease, metaloprotease, xilanase, lipase, fosfolipase, esterase, peridrolase, cutinase, pectinase, pectato liase, mananase, queratinase, redutase, oxidase, fenoxidase, lipoxigenase, ligninase, pululanase, tanase, pentosanase, malanase, β -glucanase, arabinosidase, hialuronidase, condroitinase, lacase, e amilase; ou misturas de qualquer um dos mesmos.

[00179] A presente invenção fornece, adicionalmente, métodos para limpeza, que compreendem fornecer um item a ser limpo e uma composição que compreende pelo menos uma composição de limpeza aqui fornecida, e colocá-lo em contato com a composição, sob condições eficazes para proporcionar limpeza do item. Em um aspecto, os métodos compreendem adicionalmente a etapa de enxaguar o item após colocar o item em contato com a composição de limpeza. Em alguns aspectos preferenciais, o item a ser limpo compreende louça. Em alguns aspectos alternativos, o item a ser limpo compreende tecido.

[00180] Em alguns aspectos adicionais, qualquer uma das mutações, deleções, inserções acima ou combinações das mesmas pode ser aplicada à enzima da SEQ ID n° 2 contendo a mutação Y217L ou à enzima da SEQ ID n° 2 contendo as mutações G97A-G128A-Y217Q.

[00181] Em um aspecto, a presente invenção apresenta uma pro-

tease para água fria adequada derivada de uma subtilisina, particularmente, a subtilisina BPN' (SEQ ID nº 2) (isto é, uma variante de subtilisina BPN'). Em um aspecto, uma protease para água fria compreende uma, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze ou mais das seguintes substituições de aminoácido em relação à SEQ ID nº 2: Q002W, P005K, P005L, P005Y, G007T, V008G, V008K, V008P, I011G, I011H, I011S, K012L, A013M, L016W, G023S, V026H, V026W, V026Y, K027P, V028Q, V028S, V028T, A029C, A029D, A029S, A029T, A029V, V030D, V030E, V030G, V030T, I031E, I031G, I031H, I031K, I031N, I031Q, I031S, I031Y, S033F, S033H, D036L, S037P, D041A, D041C, D041M, D041N, D041S, L042S, L042Y, V044H, V044Q, V044T, G046F, G046L, G046M, G046V, G047T, G047W, S049I, S049V, M050D, M050I, M050R, V051A, V051G, V051S, P052C, P052I, P052L, P052M, P052V, P052W, P052Y, E054R, N056G, N056I, N056K, N056M, N056Q, N056R, N056V, N056Y, P057I, P057K, P057L, P057R, P057T, P057V, F058T, Q059P, Q059W, N061P, N062D, N062M, N062Q, S063C, S063Q, S063T, G065Q, V068A, V068G, V068M, V068S, A069C, A069D, A069F, A069H, A069M, A069N, A069P, A069Q, A069R, A069T, T071D, T071E, T071G, T071K, T071M, V072D, V072G, V072K, V072Q, V072S, V072T, A073E, A073I, A073K, A073M, A073Q, A073S, A073V, A074E, A074F, A074H, A074I, A074L, A074M, A074Q, A074R, A074V, A074W, A074Y, L075A, N076A, N077G, N077L, N077P, N077Q, N077R, N077S, N077T, S078W, G080H, V081D, V081F, V081H, V081N, V081Q, V081R, V081W, L082G, L082N, L082W, A085I, A085T, A085V, P086A, P086G, P086M, P086Q, P086R, P086T, P086W, P086Y, S087F, S087I, S087L, S087M, S087Q, S087V, S087W, A088D, A088E, A088K, A088P, A088Q, S089D, S089Q, S089V, L090D, L090E, L090F, L090H, L090P, L090S, L090T, Y091L, Y091Q, Y091T, A092C, A092I, A092M, A092N, A092P, A092V,

V093D, V093F, V093L, V093T, K094C, K094R, K094S, V095I, L096F, L096H, L096I, L096M, L096N, L096Q, L096S, L096T, L096V, L096W, L096Y, G097A, G097C, G097D, G097E, G097F, G097L, G097M, G097P, G097Q, G097S, G097V, G097W, G097Y, D099C, D099E, D099I, D099M, D099P, D099V, D099Y, G100D, G100E, G100H, G100I, G100K, G100M, G100Q, G100T, G100V, G100Y, S101A, S101E, S101G, S101N, S101P, S101Q, S101T, S101V, G102A, G102S, Q103E, Q103G, Q103H, Q103K, Q103N, Y104L, Y104M, Y104N, Y104T, Y104V, S105D, S105I, S105R, S105V, W106A, W106C, W106E, W106F, W106G, W106I, W106L, W106M, W106S, W106T, W106V, I107R, I107S, I107T, I108S, I108T, G110S, G110T, I111A, I111C, I111F, I111L, I111M, I111T, I111V, E112I, E112L, E112T, W113H, A114I, A114V, I115A, I115E, I115F, I115H, I115M, I115N, I115P, I115Q, I115R, I115S, I115T, I115V, I115Y, N117K, N117V, N117W, N118I, N118L, N118V, M119F, M119N, D120Y, I122R, I122S, I122T, N123A, N123C, N123G, N123S, M124A, M124H, M124N, M124Q, M124S, M124T, M124V, S125A, L126A, L126Q, L126S, L126T, L126Y, G128E, G128N, G128T, P129V, S130P, S132I, S132N, S132P, S132Q, S132V, A134I, A134L, A134M, L135I, L135T, L135V, L135W, L135Y, K136D, K136F, K136I, K136V, K136Y, A137P, A138D, A138E, A138F, A138H, A138Q, A138Y, A142G, A142I, A142T, A142V, V143W, A144P, G146L, G146T, G146Y, V147D, V147P, V147W, V147Y, V148N, V148Y, V149E, A151T, A153T, A153V, S159K, T164W, V165T, Y167A, Y167D, Y167E, Y167M, Y167P, Y167S, Y167T, P168L, P168T, G169C, K170E, K170N, K170P, K170Q, K170S, K170T, K170Y, Y171C, Y171D, Y171L, Y171N, Y171W, P172E, P172G, P172I, P172L, P172V, P172Y, S173H, S173W, S173Y, V174A, V174I, V174L, V174S, I175A, I175F, I175R, I175T, I175V, A176V, V177W, V180F, V180H, V180Q, S182W, N184A, N184L, N184V, Q185D, Q185E, Q185I, Q185S, Q185T, R186C,

R186D, R186E, R186F, R186G, R186I, R186L, R186N, R186P, R186Q, R186S, R186T, R186V, R186W, R186Y, A187D, A187E, A187Q, S190G, S190N, Y192D, Y192E, Y192L, Y192Q, G193H, G193Q, G193T, G193V, P194E, P194I, P194L, P194M, P194N, P194T, P194V, E195C, E195K, E195W, L196I, L196M, L196T, L196V, D197I, D197M, M199F, M199Q, A200C, A200H, A200N, A200T, A200V, A200Y, P201L, P201T, P201V, V203G, I205L, I205T, T208C, T208L, T208M, T208P, T208V, L209C, L209W, P210C, P210D, P210E, P210F, P210G, P210Q, P210R, P210S, P210V, G211A, G211D, G211E, G211P, G211T, G211V, G211W, N212E, N212T, K213Q, K213T, Y214A, Y214D, Y214N, Y214P, Y214S, G215D, G215Q, G215V, A216E, Y217E, Y217L, Y217M, N218P, A223W, S224D, S224N, S224Q, H226E, H226T, V227G, V227L, V227S, A230H, A230N, A231W, A231Y, A232N, I234W, L235N, S236W, H238A, H238G, H238I, P239H, P239S, W241G, W241Q, R247H, R247L, R247W, R247Y, L250E, L250T, N252Q, T253Y, T254D, T254Q, T254R, T255L, T255P, K256G, K256R, G258P, Y263D, Y263K, Y263R, K265P, I268S, I268T, I268W, V270F, A273K, A273P, A273R, A273V, A273W, A274W, S182E, e N109I, sendo que as posições da sequência variante são numeradas por correspondência às posições da SEQ ID nº 2.

[00182] Em outro aspecto, a invenção fornece proteases para água fria adequadas, incluindo variantes de subtilisina, particularmente a variante de BPN' madura (SEQ ID nº 2), compreendendo um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze ou mais dos seguintes conjuntos de mutações em relação à SEQ ID nº 2: N109D-Y217L-S248R, N109D-S188R-Y217L, S87D-Y217L-S248R, S87R-N109D-Y217L-S248R, S87R-N109D-S188D-Y217L-S248R, G128A-Y217Q, I111V-M124V, M124V-Y217Q, N62Q-G97A, S89Y-M124V, V68A, V68A-A92G, V68A-G97A, V68A-I111V, V68A-S89Y, V68A-

V227T, V68A-Y217Q, W106F-Y217Q, G97A-G128A-Y217Q, G97A-L126A-Y217Q, G97A-M124V-L126A-Y217Q, G97A-N123G-Y217Q, L96T-G97A-Y217Q, M124V-L126A-Y217Q, N62Q-G128A-Y217Q, N62Q-G97A-Y217Q, G97N-G128A-Y217M, G97G-G128S-Y217E, G97A-G128A-Y217Q, G97M-G128S-Y217E, G97A-G128S-Y217Q, G97D-G128S-Y217Q, G97M-G128G-Y217M, G97G-G128S-Y217Q, G97S-G128S-Y217Q, G97G-G128A-Y217Q, G97S-G128A-Y217E, G97A-G128S-Y217L, G97A-G128A-Y217N, G97Q-G128S-Y217L, G97A-G128A-Y217M, G97A-G128A-Y217S, G97D-G128A-Y217Q, G97M-G128S-Y217Q, G97Q-G128G-Y217D-S87Y, G97S-G128A-Y217N, G97A-G128S-Y217T, G97D-G128S-Y217E, G97D-G128A-Y217L, G97G-G128S-Y217E-S78P-A272T, G97T-G128S-Y217D, G97D-G128A-Y217I, G97Q-G128S-Y217Q, G97G-G128A-Y217D, G97Q-G128A-Y217N, G97S-G128A-Y217M, G97S-G128S-Y217N, G97S-G128S-Y217M, G97E-G128S-Y217M, G97S-G128P-Y217Q, G97T-G128S-Y217Q, G97D-G128S-Y217Q-A73T, G97E-G128S-Y217N, G97G-G128A-Y217I, G97Q-G128A-Y217D, G97Q-G128S-Y217M, G97R-G128T-Y217Q-S162P, G97S-G128S-Y217D, G97T-G128P-Y217I, G97Q-G128G-Y217E, G97C-G128G-Y217N, G97D-G128S-Y217H, G97M-G128S-Y217L, G97M-G128S-Y217N, G97S-G128S-Y217E, G97M-G128S-Y217I, G97A-G128P-Y217A, G97R-G128S-Y217D, G97A-G128A-Y217Q-S145D, G97A-G128A-Y217Q-P239R, G97A-G128A-Y217Q-N61E-P129E-S162K-K213L-N240K, G97A-G128A-Y217Q-N61E, G97A-G128A-Y217Q-P40E-A144K-K213L, G97A-G128A-Y217Q-P129E, G97A-G128A-Y217Q-N61E-P129E-S159K, G97A-G128A-Y217Q-K213L, G97A-G128A-Y217Q-S87D, G97A-G128A-Y217Q-Q206E, G97A-G128A-Y217Q-S24R-P40E-S145D-S159K-K213L, G97A-G128A-Y217Q-K265N, G97A-G128A-Y217Q-S24R, G97A-G128A-Y217Q-P40E, G97A-G128A-Y217Q-Q275E, G97A-G128A-Y217Q-P129E-S145D-N240K, G97A-

G128A-Y217Q-A144K, G97A-G128A-Y217Q-S159K, G97A-G128A-Y217Q-S162K, G97A-G128A-Y217Q-N240K, G97A-G128A-Y217Q-S53G, G97A-G128A-Y217Q-S78N, G97A-G128A-Y217Q-S53G-S78N, G97A-G128A-Y217Q-S53G-I111V, G97A-G128A-Y217Q-S53G-N117S, G97A-G128A-Y217Q-S53G-S132N, G97A-G128A-Y217Q-Y104N-S132N, G97A-G128A-Y217Q-S53G-S78N-I111V, G97A-G128A-Y217Q-S53G-S78N-N117S, G97A-G128A-Y217Q-S53G-S78N-S132N, G97A-G128A-Y217Q-S53G-Y104N-S132N, G97A-G128A-Y217Q-S78N-Y104N-S132N, Y217L-V068C-A069G, Y217L-I079F-A098G, Y217L-P086T-S101D-Q103S-V147I, Y217L-A088T-P129S-G146D, Y217L-V093I-G128D-P129R, Y217L-Z096.01D-A098R, Y217L-Z096.01H-A098G, Y217L-G097S-Z097.01S-A098G-A273T, Y217L-A098S-D099G-G100D, Y217L-Z098.01N, Y217L-D099G-Z099.01N, Y217L-D099G-Z099.01S, Y217L-D099V-S101D, Y217L-Z099.01S, Y217L-G100D, Y217L-S101D-Q103H, Y217L-S101G-A151V, Y217L-S101H-G102S, Y217L-S101H-Q103D, Y217L-G102R-Q103C-Y104C-V192I, Y217L-Q103D, Y217L-V121I-I122S-N123C, Y217L-V121L-N123C, Y217L-I122S-N123S, Y217L-M124I, Y217L-M124V, Y217L-L126F-P129Z-S182N, Y217L-L126Y, Y217L-G127S-P129D, Y217L-Z127.01N-G128S-P129S, Y217L-G128H-P129Y, Y217L-G128S-P129D, Y217L-G128S-P129D-S248R, Y217L-G128S-P129G, Y217L-P129G-G131Z, Y217L-P129G-S130H-S132Z, Y217L-P129H-G131Z, Y217L-P129L, Y217L-P129S-S130H-S132Z, Y217L-P129Z, Y217L-P129Z-S130G, Y217L-P129Z-S130G-G131H-S132H, Y217L-P129Z-S130H, Y217L-S130V-G131D-S132I, G97A-G128A-Y217Q-A134T-K213L, G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G-P129V, G97A-G128A-Y217Q-S24R-P239R, e G97A-G128A-Y217Q-S24R-S87T-A88L-S89G, sendo que as posições da sequência variante são numeradas por correspondência às posições da SEQ ID nº 2.

[00183] Em outro aspecto, a invenção fornece proteases para água fria adequadas, incluindo variantes de subtilisina, particularmente, variantes de BPN' madura (SEQ ID n° 2) compreendendo um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze ou mais dos seguintes conjuntos de mutações em relação à SEQ ID n° 2: S87T-A88L-S89G-G97A-G128A-Y217Q, N61P-S63H-G97A-G128A-Y217Q, S87G-A88V-S89A-G97A-G128A-Y217Q, P86S-S87G-A88V-G97A-G128A-Y217Q, Q59S-N61P-G97A-G128A-Y217Q, S24G-N25G-G97A-G128A-Y217Q, N61P-N62S-G97A-G128A-Y217Q, G97A-G128A-P129Q-S130G-G131S-Y217Q, L75S-N76Y-G97A-G128A-Y217Q, G97A-G128A-V203Y-Y217Q, T55P-G97A-G128A-Y217Q, A88V-L90I-G97A-G128A-Y217Q, G97A-G128A-G211R-N212S-K213V-Y217Q, G23A-S24G-N25G-G97A-G128A-Y217Q, T22N-S24A-G97A-G128A-Y217Q, S24R-G97A-G128A-Y217Q, G97A-A98S-G128A-Y217Q, G97A-G128A-T158G-S159G-Y217Q, Q59E-N61P-G97A-G128A-Y217Q, G97A-A98E-G128A-Y217Q, G97A-G128A-Y217Q-P86S-S87G-A88V-A116N-N117S-N118G, G97A-G128A-Y217Q-S63T-P86S-S87G-A88V, G97A-G128A-Y217Q-P86S-S87G-A88V-P239R, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-N61P-N62S-P194L-A232T, G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-A133V-L267V, G97A-G128A-Y217Q-A134T-L267V, G97A-G128A-Y217Q-S24R-P40E-P129E-S159K-K265R, G97A-G128A-Y217Q-A134T-G211T, G97A-G128A-Y217Q-S24R-P129E, G97A-G128A-Y217Q-I111V-S161P, G97A-G128A-Y217Q-T55P-P129Q, G97A-G128A-Y217Q-I115V-L267V, G97A-G128A-Y217Q-P86S-S87G-A88V-A116S-N117G-N118R, G97A-G128A-Y217Q-V203Y-L267V, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S78N-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-P52S-T55P-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P-A116S-N117G-N118R, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-P129Q-S130G-G131S, G97A-G128A-Y217Q-P86S-S87G-A88V-T242R, G97A-G128A-Y217Q-P40E-T55P-N269K,

G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G-A116N-N117S-N118G,
G97A-G128A-Y217Q-V8L-N25Y-P129Q-S130G-G131S, G97A-G128A-
Y217Q-S24G-N25G-S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N, G97A-
G128A-Y217Q-G211T-L267V, G97A-G128A-Y217Q-S24R-A116N-
N117S-N118G, G97A-G128A-Y217Q-S24R-A128S-P129G, G97A-
G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-N240K, G97A-G128A-Y217Q-
N25Y-P129Q-S130G-G131S, G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-
A134T, G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-L267V, G97A-
G128A-Y217Q-S87G-A88V-S89A-A116N-N117S-N118G, G97A-
G128A-Y217Q-N61P-P129Q-S130G-G131S, G97A-G128A-Y217Q-
N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N, G97A-G128A-Y217Q-T55P-
P129V-P194S, G97A-G128A-Y217Q-T55P-P129V, G97A-G128A-
Y217Q-S24G-N25G-T55P-S78N-S101N, G97A-G128A-Y217Q-T55P-
S78N-I115V, G97A-G128A-Y217Q-N25Y-S87G-A88V-S89A, G97A-
G128A-Y217Q-A134T-N240K, G97A-G128A-Y217Q-S24R-Q59S-
N61P, G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G-P239R, G97A-G128A-
Y217Q-T55P-A116S-N117G-N118R, G97A-G128A-Y217Q-A134T-
S161P, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-N61P-S101N-V203Y,
G97A-G128A-Y217Q-N25Y-Q59S-N61P, G97A-G128A-Y217Q-N25Y-
P129Q-S130G-G131S-A137T, G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-
N25G-N61P-S63H, G97A-G128A-Y217Q-T55P-N61P-S78N-S101N-
V203Y, G97A-G128A-Y217Q-P129Q-N240K, G97A-G128A-Y217Q-
T55P-A134T, G97A-G128A-Y217Q-N25Y-N61P-S63H, G97A-G128A-
Y217Q-S87T-A88L-S89G-P129S, G97A-G128A-Y217Q-T55P-L75H-
N76G, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S78N-S87T-A88L-
S89G-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-T55P-I115V, G97A-
G128A-Y217Q-T55P-A116N-N117S-N118G, G97A-G128A-Y217Q-
S24G-N25G-A116N-N117S-N118G, G97A-G128A-Y217Q-S24R-
P129Q-S130G-G131S, G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G-
G211R-N212S-K213V, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-T55P-N61P-

S78N-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-T55P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N, G97A-G128A-Y217Q-I115V-A273S, G97A-G128A-Y217Q-N25Y-T55P, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P-N240K, G97A-G128A-Y217Q-S161P-L267V, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N, G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-S101N, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-N61P-S101N, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-N240K, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-T55P-S101N, G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H-A128S-P129Q, G97A-G128A-Y217Q-S89Y-P129Q-S130G-G131S, G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-I115V-N240K, G97A-G128A-Y217Q-S53G-N61P-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-S161P-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-N240K, G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-P239R, G97A-G128A-Y217Q-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-I115V-A134T, G97A-G128A-Y217Q-Y6Q-P129Q-S130G-G131S, G97A-G128A-Y217Q-T55P-S78N-S89Y, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-T55P-S78N-A88V-S101N, G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H-S78N-I111V-A134T, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-S78N-S101N, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S78N-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-S53G-N61P-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-S53G-T55P-S78N-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N, G97A-G128A-Y217Q-N240K-A273S, G97A-G128A-Y217Q-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N, G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P-S87T-A88L-S89G, G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H-S78N-S161P, G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H-S78N-I111V, G97A-

G128A-Y217Q-T55P-A128S-P129Q, G97A-G128A-Y217Q-N61P-S78N-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-N61E-A144K, G97A-G128A-Y217Q-A134T-P239R, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S78N-S87T-A88L-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-T55P-N240K, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S87T-A88L-S89G-S101N, G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-P239R, G97A-G128S-Y217Q, G97A-G128A-Y217Q-S53G-N61P-S101N, G97A-G128A-Y217Q-I111V-P129Q-G211T, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P-S87G-A88V-S89A, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N, G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-S162K, G97A-G128A-Y217Q-T55P-P129Q-S130G-G131S, G97A-G128A-Y217Q-T55P-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-S87G-A88V-S89A-P129Q-S130G-G131S, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G, G97A-G128A-Y217Q-I111V-P129Q-S130G-G131S, G97A-G128A-Y217Q-I111V-A273S, G97A-G128A-Y217Q-N61P-S87T-A88L-S89G, G97A-G128A-Y217Q-T22N-S24A-N61P-S63H, G97A-G128A-Y217Q, G97A-G128A-Y217Q-S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-P129S-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-S159K-L267V, G97A-G128A-Y217Q-P40E-S53Y-S78Y-P86S-S87G-A88V, G97A-G128A-Y217Q-S24R-S145D, G97A-G128A-Y217Q-I111V-S159K, G97A-G128A-Y217Q-T55P-P129L, G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-T55P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S78N-S101N, G97A-G128A-Y217Q-S53G-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-S89Y, G97A-G128A-Y217Q-S24R-P129V, G97A-G128A-Y217Q-S87G-A88V-S89A-A116N-N117S-N118G-P172H, G97A-G128A-Y217Q-I111V-A134T, G97A-G128A-Y217Q-

Q59S-N61P-P129Q-S130G-G131S, G97A-G128A-Y217Q-P5S-S87G-A88V-S89A-A116G-N117R, Y217Q-N61P-A97G-G102A-A128G-P129S, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-N61P-S78N, G97A-G128A-Y217Q-S145D-S159K-N240K-Q275E, G97A-G128A-Y217Q-T55P-A128S-P129D, G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G-A128S-P129D, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-I111V-P239R, G97A-G128A-Y217Q-S87G-A88V-S89A-S162K, G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-I115V, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-T55P-S78N, G97A-G128A-Y217Q-T55P-A92G, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S87T-A88L-S89G-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-T22N-S24A-T55P, G97A-G128A-Y217Q-S53G-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-S78N-S87T-A88L-S89G, G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-S159K, G97A-Y217Q-N61P-N62Q-G100N-A128G, G97A-G128A-Y217Q-S24R-S78N-S182P-L267V, G97A-G128A-Y217Q-P239R-A273S, G97A-G128A-Y217Q-S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-T242R, G97A-G128A-Y217Q-S3F-S87T-A88L-S89G-G211T, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-L75H-N76G, G97A-G128A-Y217Q-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G, G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-A144K, G97A-G128A-Y217Q-S78N-S87T-A88L-S89G-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P-A116N-N117S-N118G, G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-I111V, G97A-G128A-Y217Q-S24R-S145D-P239R-Q275E, G97A-G128A-Y217Q-S145D-A273S, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-K141E-T242R, G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-A116N-N117S-N118G-P129Q-S130G-G131S, G97A-G128A-Y217Q-S89Y-G211T, G97A-G128A-Y217Q-S87G-A88V-S89A-A116N-N117S-N118G-A144T, G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y, G97A-G128A-Y217Q-

S24G-N25G-P129V, G97A-Y217Q-N61P-A128G-P129S-S130P, G97A-G128A-Y217Q-T55P-N61P-S87T-A88L-S89G-G110C-S130P, G97A-Y217Q-N123G-A128G, G97A-G128A-Y217Q-N61P-N62Q-G100N-G102A-M124I, S78N-G97A-G128A-Y217Q, G97A-S101N-G128A-Y217Q, G97A-G128A-A137V-Y217Q, N61P-G97A-G128A-Y217Q, G97A-G128A-S130P-Y217Q, G97A-Q103N-G128A-Y217Q, S63T-G97A-G128A-Y217Q, G97A-G102A-G128A-Y217Q, G97A-N109D-G128A-Y217Q-S248R, S87R-G97A-G128A-Y217Q, G97A-G128A-S188D-Y217Q, S87D-G97A-G128A-Y217Q-S248R, G97A-G128A-S188D-S248R-Y217Q, G97A-G128A-S248D-Y217Q, S78N-G97A-G128A-Y217Q-L267V, S78N-G97A-G128A-Y217Q-S161P, S78N-G97A-G128A-Y217Q-I115V, S78N-G97A-G128A-Y217Q-A273S, S78N-G97A-G128A-Y217Q-G211T, S78N-G97A-G128A-Y217Q, S78N-G97A-G128A-Y217Q-I111V, S78N-G97A-G128A-Y217Q-V147L, S78N-G97A-G128A-Y217Q-I108V, S78N-G97A-G128A-Y217Q-S89Y, e S78N-G97A-G128A-Y217Q-A138T, sendo que as posições da sequência variante são numeradas por correspondência às posições da SEQ ID n° 2.

[00184] Em outro aspecto, a protease para água fria é variante da subtilisina BPN' que tem SEQ ID n° 2, em que a variante compreende três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze, quatorze, quinze, ou mais mutações selecionadas a partir das posições de aminoácido 24, 25, 40, 52, 53, 55, 58, 59, 61, 62, 63, 68, 78, 86, 87, 88, 89, 92, 96, 97, 100, 101, 103, 104, 106, 111, 114, 115, 116, 117, 118, 123, 124, 125, 126, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 144, 145, 159, 161, 162, 167, 194, 203, 206, 213, 217, 227, 232, 239, 240, 242, 265, 267, e 275, sendo que as posições da sequência da variante são numeradas por correspondência às posições na sequência de aminoácidos da SEQ ID n° 2.

[00185] Em outro aspecto, a protease para água fria é variante da

subtilisina BPN' que compreende SEQ ID n° 2 (isto é, uma variante de subtilisina BPN'), sendo que a variante compreende um total de três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze, quatorze, quinze ou mais mutações selecionadas a partir dos grupos (a) e (b): (a) mutações carregadas selecionadas do grupo que consiste em N61E, A144K, P129E, P239R, P40E, Q103E, Q206E, Q7275E, S145D, S159K, S162K, S24R, S63H, S87D e T242R; e (b) mutações neutras selecionadas do grupo que consiste em A114G, A116N, A133V, A134T, A232T, A88V, A92G, F58G, G100T, G128A, G131S, G97A, I111V, I115V, K213L, K265N, L126A, L267V, L96T, M124V, N117S, N118G, N123G, N240K, N25G, N61P, N62Q, N62R, N62S, P129Q, P129V, P194L, P239V, P52L, P86S, Q59S, S101N, S125A, S130G, S132N, S161P, S24G, S53G, S78N, S87G, S89Y, T55P, V203Y, V227T, V68A, W106F, Y104N, Y167A, e Y217Q, sendo que as posições da sequência variante são numeradas por correspondência às posições na sequência de aminoácidos de SEQ ID n° 2.

Ácidos nucleicos da invenção

[00186] A invenção fornece ácidos nucleicos isolados, que não têm ocorrência natural, ou recombinantes (também chamados aqui de "polinucleotídeos"), que podem ser coletivamente mencionados como "ácidos nucleicos da invenção" ou "polinucleotídeos da invenção", que codificam os polipeptídeos (por exemplo, variantes de protease) da invenção. Os ácidos nucleicos da invenção, incluindo todos os descritos a seguir, são úteis na produção recombinante (por exemplo, expressão) dos polipeptídeos da invenção, tipicamente através de expressão de um vetor de expressão plasmidial que compreende uma sequência que codifica o polipeptídeo de interesse ou fragmento do mesmo. Conforme discutido acima, os polipeptídeos incluem polipeptídeos da variante de protease, incluindo polipeptídeos da variante de subtilisina possuindo atividade enzimática (por exemplo, atividade pro-

teolítica) que são úteis em aplicações para limpeza e composições de limpeza para limpar um item ou uma superfície (por exemplo, superfície de um item) que precisa ser limpa.

[00187] A invenção inclui um ácido nucleico isolado, recombinante, substancialmente puro, ou que não tem ocorrência natural que compreende uma sequência de polinucleotídeo que codifica qualquer proteína, polipeptídeo, ou variante de protease (incluindo qualquer proteína de fusão, etc.) da invenção descrita acima na seção intitulada "Polipeptídeos da invenção" e em outro local no presente documento, incluindo, mas não se limitando aos exemplos, que inclui os exemplos da parte I e os exemplos da parte II, ou uma sequência de polinucleotídeo complementar do mesmo. A invenção também fornece um ácido nucleico isolado, recombinante, substancialmente puro, ou que não tem ocorrência natural compreendendo uma sequência de polinucleotídeo que codifica uma combinação de dois ou mais de quaisquer polipeptídeos, proteínas, ou variantes de protease (incluindo qualquer proteína de fusão) da invenção descritos acima e em outro local no presente documento, incluindo, mas não se limitando aos exemplos, incluindo os exemplos da parte I e os exemplos da parte II.

[00188] Em um décimo aspecto, a invenção apresenta um ácido nucleico isolado, que não tem ocorrência natural, ou recombinante que compreende uma sequência de polinucleotídeo que codifica uma variante (ou polipeptídeo tal como no terceiro aspecto) do primeiro, segundo, terceiro, quarto, quinto, sexto, sétimo, oitavo, ou nono aspectos da invenção, ou uma sequência de polinucleotídeo complementar do mesmo.

[00189] Em um décimo-primeiro aspecto, a invenção apresenta um ácido nucleico isolado, que não tem ocorrência natural, ou recombinante que compreende uma sequência de polinucleotídeo que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com a sequência de polinucleotídeo apresentada na SEQ ID nº 3 ou SEQ ID nº 5, ou uma sequência de polinucleotídeo complementar do mesmo.

[00190] A presente invenção fornece adicionalmente um ácido nucleico que codifica uma variante de protease que compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos de SEQ ID nº 2, e sendo que a carga líquida total da variante de protease é +1, +2, +3, +4, +5, 0, -1, -2, -3, -4, ou -5 em relação à carga líquida total da protease subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens*, e sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID nº 2, como determinado por alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[00191] A presente invenção apresenta ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina da protease subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens*, sendo que a protease subtilisina BPN' compreende a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID nº 2, e sendo que a variante de protease compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID nº 2 em não mais que duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou 25 mutações em posições de aminoácido selecionadas a partir das posições de aminoácido 1 a 275, sendo que as posições de aminoácido da variante de subtilisina são numeradas por correspondência com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* descrita como SEQ ID nº 2, sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido

correspondente na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID nº 2 como determinado por alinhamento com a variante de protease.

[00192] A presente invenção fornece adicionalmente ácidos nucleicos que codificam uma variante de subtilisina que compreende uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID nº 2, e sendo que a carga líquida total da variante de protease é +1, +2, +3, +4, +5, 0, -1, -2, -3, -4, ou -5 em relação à carga líquida total da protease subtilisina BPN' de *Bacillus lentus*, e sendo que as posições de aminoácido da variante de protease são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID nº 2, como determinado por alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[00193] As variantes de protease com baixa força iônica acima podem fazer parte de uma composição detergente que é diluída em água, tipicamente, dentro de uma máquina de lavar, para formar um líquido de lavagem de detergente para lavagem de roupas cuja condutividade é de cerca de 0,1 mS/cm a cerca de 3 mS/cm, de cerca de 0,3 mS/cm a cerca de 2,5 mS/cm, ou mesmo de cerca de 0,5 mS/cm a cerca de 2 mS/cm. As variantes de protease podem ser variantes de protease com alta força iônica. Tais variantes de protease alta força iônica compreendem duas ou mais mutações, e possuem uma carga líquida total de +5, +4, +3, +2, +1 ou 0 em relação à protease subtilisina BPN' selvagem mostrada na SEQ ID nº 2.

[00194] As variantes de protease com alta força iônica acima podem fazer parte de uma composição detergente que é diluída em água, tipicamente, dentro de uma máquina de lavar, para formar um

líquido de lavagem de detergente para lavagem de roupas cuja condutividade é de cerca de 3 mS/cm a cerca de 30 mS/cm, de cerca de 3,5 mS/cm a cerca de 20 mS/cm, ou mesmo de cerca de 4 mS/cm a cerca de 10 mS/cm.

[00195] A carga da variantes de protease é expressa em relação a BPN' que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID nº 2. As aminoácidos que conferem uma única carga negativa são D e E e as que conferem uma única carga positiva são R, H e K. Qualquer alteração de aminoácido em relação à SEQ ID nº 2 que altera uma carga é usada para calcular a carga da variante de protease. Por exemplo, a introdução de uma mutação de carga negativa a partir de uma posição neutra selvagem adicionará uma carga líquida de -1 à variante de protease, enquanto que a introdução de uma mutação de carga negativa (D ou E) a partir de um resíduo de aminoácido positivo selvagem (R, H ou K) adicionará uma carga líquida de -2. A soma das alterações de carga de todos os resíduos de aminoácido que são diferentes para a variante de protease em relação a BPN' que possui a sequência de aminoácidos da SEQ ID nº 2 dá a alteração de carga da variante de protease. Sem se ater à teoria, acredita-se que: A faixa de carga preferencial para proteases para água fria a ser usada em soluções de detergente para lavagem de roupas de baixa condutividade é -5, -4, -3, -2, -1, 0, particularmente -2, -1; a faixa de carga preferencial para proteases para água fria a ser usada em soluções de detergente para lavagem de roupas de alta condutividade é +5, +4, +3, +2, +1, 0, particularmente +2, +1. A seleção correta da carga, pode levar a níveis inesperadamente aprimorados de desempenho de limpeza em água fria. "Soluções de detergente para lavagem de roupas de baixa condutividade" são definidas como tendo uma condutividade de cerca de 0,1 mS/cm a cerca de 3 mS/cm, de cerca de 0,3 mS/cm a cerca de 2,5 mS/cm, ou mesmo de cerca de 0,5 mS/cm a cerca de 2 mS/cm. "Solu-

ções de detergente para lavagem de roupas de alta condutividade" são definidas como tendo uma condutividade de cerca de 3 mS/cm a cerca de 30 mS/cm, de cerca de 3,5 mS/cm a cerca de 20 mS/cm, ou mesmo de cerca de 4 mS/cm a cerca de 10 mS/cm. Os exemplos acima não se destinam a limitar o escopo. Uma vez que mutações são combinadas para otimizar o desempenho em água fria, a carga da enzima também pode ser equilibrada por mutações em posições adicionais.

[00196] A invenção inclui proteases para água fria e produtos que compreendem pelo menos uma protease para água fria. Em um aspecto, a protease para água fria é uma variante de subtilisina BPN' que tem a SEQ ID n° 2, a dita variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem uma ou mais mutações, e que tem uma carga líquida total de -1, 0 ou +1 em relação a BPN' selvagem (SEQ ID n° 2). Os aminoácidos que conferem carga negativa são tipicamente D e E e os que conferem carga positiva são tipicamente R, H e K. Sem se ater à teoria, acredita-se que esta faixa de carga (-1, 0, +1) é a carga ótima para gerar desempenho em água fria. Entretanto, estes exemplos devem ser considerados como não limitadores. Em um aspecto, uma vez que as mutações são combinadas para otimizar o desempenho em água fria, a carga enzimática é equilibrada por mutações em posições adicionais.

[00197] A invenção apresenta um variante de protease isolada, recombinante, substancialmente pura, ou que não tem ocorrência natural (por exemplo, variante de subtilisina) que tem atividade proteolítica, a dita variante de protease compreendendo uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID n° 2 por 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, ou 8 resíduos de aminoácido, sendo que as posições de aminoácido são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina

BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID n° 2, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*, sendo que a variante de subtilisina inclui a sequência de aminoácidos de BPN'-v3 (SEQ ID n° 4) ou BPN'-v36 (SEQ ID n° 6).

[00198] Em um aspecto, a invenção fornece uma variante de protease isolada, recombinante, substancialmente pura, ou que não tem ocorrência natural (por exemplo, variante de subtilisina) que tem atividade proteolítica, a dita variante de protease compreendendo uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID n° 2 por não mais que 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 6, 5, 4, 3, 2 resíduos de aminoácido, sendo que as posições de aminoácido são numeradas de acordo com a numeração das posições de aminoácido correspondentes na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID n° 2, como determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante de protease com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*, conforme aqui apresentado.

[00199] A invenção inclui um ácido nucleico isolado, recombinante, ou que não tem ocorrência natural que compreende uma sequência de polinucleotídeo que codifica: (a) pelo menos uma variante de protease da invenção, incluindo qualquer variante de protease aqui descrita, incluindo, mas não se limitando às variantes de protease apresentadas nos exemplos da parte I, (b) pelo menos uma protease para água fria da invenção, ou (c) pelo menos uma variante de protease da invenção, incluindo qualquer variante de protease aqui descrita, incluindo, mas não se limitando a uma variante GG36 série I apresentada nos exemplos da parte II, ou uma sequência de polinucleotídeo complementar

de qualquer um dos mesmos. Em outro aspecto, a invenção fornece um vetor de expressão que compreende pelo menos um ácido nucleico da invenção. O vetor de expressão pode ser operacionalmente ligado a um promotor.

[00200] Em outro aspecto, a invenção, a invenção apresenta um ácido nucleico isolado que compreende uma sequência de polinucleotídeo que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com a sequência de polinucleotídeo apresentada na SEQ ID nº 3 ou SEQ ID nº 5, ou uma sequência de polinucleotídeo complementar do mesmo.

[00201] Os ácidos nucleicos da invenção podem ser gerados usando quaisquer técnicas de síntese, manipulação, e/ou isolamento adequadas, ou combinações das mesmas. Por exemplo, um polinucleotídeo da invenção pode ser produzido com o uso de técnicas de síntese ácido nucleico padrão, como, por exemplo, técnicas de síntese em fase sólida que são bem conhecidas pelos versados na técnica. Nestas técnicas, fragmentos de até 50 ou mais bases de nucleotídeo são, tipicamente, sintetizados e, então, unidos (por exemplo, por métodos de ligação enzimática ou química, ou métodos de recombinação mediada por polimerase) para formar essencialmente qualquer sequência de ácido nucleico contínua desejada. A síntese dos ácidos nucleicos da invenção também pode ser facilitada (ou alternativamente executada) por meio de qualquer método adequado conhecido na técnica, incluindo, mas não se limitando a síntese química usando o método de fosforamidita clássico (vide, por exemplo, Beaucage et al. *Tetrahedron Letters* 22:1859-69 (1981)); ou o método descrito por Matthes et al., *EMBO J.* 3:801-805 (1984), tal como é tipicamente praticado em métodos sintéticos automatizados. Os ácidos nucleicos da invenção podem também ser produzidos pelo uso de um sintetizador

de DNA automático. Os ácidos nucleicos personalizados podem ser comprados junto à uma variedade de fontes comerciais (por exemplo, The Midland Certified Reagent Company, the Great American Gene Company, Operon Technologies Inc., e DNA2.0). Outras técnicas para sintetizar ácidos nucleicos e princípios relacionados são conhecidas na técnica (vide, por exemplo, Itakura et al., Ann. Rev. Biochem. 53:323 (1984); e Itakura et al., Science 198:1056 (1984)).

[00202] Conforme indicado acima, técnicas de DNA recombinante úteis na modificação de ácidos nucleicos são bem conhecidas na arte. Por exemplo, técnicas como, por exemplo, digestão por endonuclease de restrição, ligação, transcrição reversa e produção de cDNA, e reação em cadeia da polimerase (por exemplo, PCR) são conhecidas e facilmente empregadas pelos versados na técnica. Os nucleotídeos da invenção podem, também, ser obtidos pela seleção de bibliotecas de cDNA (por exemplo, bibliotecas de cDNA geradas com o uso de técnicas de mutagênese comumente usadas na arte, inclusive aquelas descritas aqui) com o uso de uma ou mais sondas de oligonucleotídeo que podem hibridizar ou amplificar por PCR polinucleotídeos que codificam um polipeptídeo(s) variante de protease da invenção. Os procedimentos para selecionar e isolar clones de cDNA e procedimentos de amplificação por PCR são bem conhecidos daqueles versados na técnica e são descritos em referências padrão conhecidas pelos versados na técnica. Alguns ácidos nucleicos da invenção podem ser obtidos pela alteração de uma cadeia principal de um polinucleotídeo de ocorrência natural (por exemplo, que codifica uma enzima ou protease original), por exemplo, por um procedimento de mutagênese conhecido (por exemplo, mutagênese sítio-dirigida, mutagênese por saturação do sítio, e recombinação *in vitro*).

[00203] A invenção inclui ácidos nucleicos que hibridizam a um ácido nucleico alvo da invenção (por exemplo, SEQ ID n° 3 ou 5), ou uma

sequência de polinucleotídeo complementar do mesmo, sendo que a hibridização é sobre substancialmente todo o comprimento do ácido nucleico alvo. O ácido nucleico em hibridização pode hibridizar a uma sequência de nucleotídeo da invenção sob condições pelo menos es-tringentes ou sob condições de pelo menos alta estringência. Con-dições de hibridização moderadamente estringentes, estringentes, e altamente estringentes para experimentos de hibridização de ácido nu-cleico são conhecidos. Exemplos de fatores que podem ser combina-dos para alcançar tais níveis de estringência são resumidamente dis-cutidos na presente invenção.

[00204] Os ácidos nucleicos hibridizam devido a uma variedade de forças físico-químicas bem caracterizadas, como, por exemplo, ligação ao hidrogênio, exclusão de solvente, empilhamento de base e similares. Um guia para a hibridização de ácidos nucleicos é encontrado em P. Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology – Hybridization with Nucleic Acid Probes*, vol. 24, parte I, capítulo 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", (Elsevier, N.Y.) (deste ponto em diante no presente documento "Tijssen"). Vide também Hames e Higgins (1995) *Gene Probes* 1 e 2. Uma indicação de que duas sequências de ácido nucleico são substancialmente idênticas é que as duas moléculas hibridizam umas as outras sob condições pelo menos estringentes. As condições estringentes de hibridização no contexto de experimentos de hibridização de ácido nucleico, como, por exemplo, hibridizações Southern e Northern, são dependentes da sequência, e são diferentes sob diferentes parâmetros ambientais. As condições de alta estringência são tipicamente selecionadas de modo que a hibridização ocorra a cerca de 5°C ou menos que o ponto de fusão térmico (T_m) para a sequência específica a uma força iônica e pH definidos. A T_m é a temperatura (sob força

iônica e pH definidos) na qual 50% da sequência de teste hibridiza a uma sonda perfeitamente pareada. A T_m indica a temperatura na qual o duplex de ácido nucleico é 50% desnaturado sob as condições dadas e representa uma medição direta da estabilidade do híbrido de ácido nucleico. Desta forma, a T_m corresponde à temperatura que corresponde ao ponto médio na transição da hélice para o espiral aleatório; ela depende do comprimento, da composição de nucleotídeos, e da força iônica para fitas longas de nucleotídeos. Sob condições estridentes, uma sonda hibridizará tipicamente à sua subsequência alvo, mas não a outras sequências. Uma condição muito estridente é selecionada para ser igual à T_m para uma sonda específica.

[00205] A T_m de um duplex DNA-DNA pode ser estimada com o uso da equação (1): $T_m (^{\circ}\text{C}) = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 (\log_{10}M) + 0,41 (\% \text{ G+C}) - 0,72 (\% \text{ f}) - 500/n$, onde M é a molaridade dos cátions monovalentes (geralmente Na^+), $(\% \text{ G+C})$ é a porcentagem de nucleotídeos guanossina (G) e citosina (C), $(\% \text{ f})$ é a porcentagem de formamida e n é o número de bases de nucleotídeo (isto é, comprimento) do híbrido. A T_m de um duplex RNA-DNA pode ser estimada com o uso da equação (2): $T_m (^{\circ}\text{C}) = 79,8^{\circ}\text{C} + 18,5 (\log_{10}M) + 0,58 (\% \text{ G+C}) - 11,8(\% \text{ G+C})^2 - 0,56 (\% \text{ f}) - 820/n$, onde M é a molaridade dos cátions monovalentes (geralmente Na^+), $(\% \text{ G+C})$ é a porcentagem de nucleotídeos guanossina (G) e citosina (C), $(\% \text{ f})$ é a porcentagem de formamida e n é o número de bases de nucleotídeo (isto é, comprimento) do híbrido. As equações 1 e 2 acima são tipicamente precisas apenas para duplexes híbridos maiores que cerca de 100 a 200 nucleotídeos. A T_m de sequências de ácido nucleico mais curtas que 50 nucleotídeos pode ser calculada da seguinte forma: $T_m (^{\circ}\text{C}) = 4G+C+2(A+T)$, onde A (adenina), C, T (timina), e G são os números dos nucleotídeos correspondentes.

[00206] O material de ácido nucleico não hibridizado é tipicamente removido por uma série de lavagens, cuja estringência pode ser ajustada dependendo dos resultados desejados, ao conduzir análise de hibridização. Condições de lavagem de baixa estringência (por exemplo, usando uma mais sal e temperatura mais baixa) aumentam a sensibilidade, mas podem produzir sinais de hibridização inespecíficos e muitos sinais de fundo. Condições de estringência mais elevada (por exemplo, usando menos sal e temperatura mais elevada, próxima à temperatura de hibridização) reduz o sinal de fundo, tipicamente restando apenas o sinal específico remanescente. Para informações adicionais, vide Hames e Higgins, *supra*.

[00207] Exemplos de condições estringentes para análise de pelo menos dois ácidos nucleicos que compreendem pelo menos 100 nucleotídeos incluem incubação em uma solução ou sobre um filtro em um Southern ou Northern blot compreendendo 50% de formalina (ou formamida) com 1 miligrama (mg) de heparina a 42°C, com a hibridização sendo executada de um dia para o outro. Uma lavagem com estringência regular pode ser executada com o uso de uma solução que compreende lavagem com tampão SSC 0,2x a cerca de 65°C durante cerca de 15 minutos (vide Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Frio Spring Harbor Press, e sua terceira edição (2001) para uma descrição do tampão SSC). A lavagem com estringência regular pode ser precedida por uma lavagem com baixa estringência para remover sinal de fundo da sonda. Uma lavagem de baixa estringência pode ser executada, por exemplo, em uma solução que compreende tampão SSC 2x a cerca de 40°C durante cerca de 15 minutos. Uma lavagem altamente estringente pode ser executada usando uma solução que compreende NaCl 0,15 M a cerca de 72°C durante cerca de 15 minutos. Exemplos de condições de estringência moderada incluem incubação de um dia para outro a 37°C em uma so-

lução compreendendo 20% de formalina (ou formamida), SSC 0,5x, 50 mM de fosfato de sódio (pH 7,6), solução de Denhardt 5x, 10% de sulfato de dextrano, e 20 mg/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado, seguido de lavagem dos filtros em SSC 1X a cerca de 37 a 50°C. As condições de alta estringência são condições que (a) usam baixa força iônica e alta temperatura para a lavagem, como, por exemplo, 0,015 M de cloreto de sódio/0,0015 M de citrato de sódio/0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 50°C, (b) empregam um agente desnaturante durante a hibridização, como, por exemplo, formamida, por exemplo, 50% (v/v) de formamida com 0,1% de albumina sérica bovina (BSA)/0,1% de Ficoll/0,1% de polivinil pirrolidona (PVP)/50 mM de tampão de fosfato de sódio a pH 6,5 com 750 mM de cloreto de sódio, 75 mM de citrato de sódio a 42°C, ou (c) empregam 50% de formamida, SSC 5x (0,75 M de NaCl, 0,075 M de citrato de sódio), 50 mM de fosfato de sódio (pH 6,8), 0,1% de pirofosfato de sódio, solução de Denhardt 5x, DNA de esperma de salmão sonificado (50µg/ml), SDS 0,1%, e 10% de sulfato de dextrano a 42°C com lavagens a (1) 42°C em SSC 0,2x, (2) 55°C em 50% de formamida, e (3) 55°C em SSC 0,1X (de preferência, com EDTA). Uma razão entre sinal e ruído de 2x ou 2,5x a 5x que foi observada para uma sonda não relacionada no teste de hibridização particular indica a detecção de uma hibridização específica. A detecção de hibridização pelo menos estrigente entre duas sequências no contexto da presente invenção indica uma similaridade estrutural ou homologia relativamente forte a um ácido nucleico da invenção.

Vetores, células, e métodos para fazer os polipeptídeos da variante de protease da invenção

[00208] Vários métodos adequados para gerar os polinucleotídeos modificados da invenção, que codificam as variantes de protease da invenção (como, por exemplo, as proteases para água fria da in-

venção) são conhecidos na técnica, incluindo, mas não se limitando a, por exemplo, mutagênese por saturação de sítio, mutagênese por varredura, mutagênese por inserção, mutagênese por deleção, mutagênese aleatória, mutagênese sítio-dirigida, e evolução dirigida, assim como várias outras abordagens recombinatórias. Os métodos para fazer polinucleotídeos e proteínas modificadas (por exemplo, variantes de protease) incluem metodologias de embaralhamento de DNA (vide, por exemplo, Stemmer WP, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(22):10747-51 (1994)); métodos à base de recombinação não homóloga de genes, por exemplo, ITCHY (Ostermeier et al., *Bioorg. Med. Chem.* 7:2139-44 [1999]); SCRATCHY (Lutz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:11248-53 [2001]); SHIPREC (Sieber et al., *Nat. Biotechnol.* 19:456-60 [2001]); NRR (Bittker et al., *Nat. Biotechnol.* 20:1024-9 [2001]; Bittker et al., *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 101:7011-6 [2004]); métodos que se baseiam no uso de oligonucleotídeos para inserir mutações deleções e/ou inserções aleatórias e direcionadas, (Ness et al., *Nat. Biotechnol.* 20:1251-5 [2002]; Coco et al., *Nat. Biotechnol.* 20:1246-50 [2002]; Zha et al., *Chembiochem.* 4:34-9 [2003]; Glaser et al., *J. Immunol.* 149:3903-13 [1992]); vide também Arkin e Youvan, *Biotechnology* 10:297-300 (1992); Reidhaar-Olson et al., *Methods Enzymol.* 208:564-86 (1991).

[00209] Em um aspecto, um polinucleotídeo original de extensão completa é ligado em um plasmídeo de expressão adequado e o seguinte método de mutagênese é usado para facilitar a construção da protease modificada da presente invenção, embora outros métodos possam ser usados. O método tem por base o descrito por Pisarchik et al. (Pisarchik et al., *Prot. Eng. Des. Select.* 20:257-265 [2007]). Em um aspecto, é fornecida uma vantagem adicional de que a enzima de restrição corta fora da sua sequência de reconhecimento, o que permite a digestão de praticamente qualquer sequência de nucleotídeo e impos-

sibilita a formação de uma cicatriz no sítio de restrição.

[00210] Em uma abordagem, um gene de ocorrência natural que codifica uma protease de extensão completa é obtido, sequenciado e varrido para buscar um ou mais pontos no qual uma mutação é desejada (por exemplo, deleção, inserção, substituição) em um ou mais aminoácidos. A mutação do gene para alterar sua sequência para se adaptar à sequência desejada é realizada por extensão do iniciador de acordo com métodos de conhecimento geral. Os fragmentos à esquerda e à direita do(s) ponto(s) desejado(s) de mutação são amplificados por PCR e incluem o sítio de restrição *Eam*1104I. Os fragmentos da esquerda e da direita são digeridos com *Eam*1104I para gerar uma pluralidade de fragmentos que possuem projeções de três bases complementares que são, então, agrupados e ligados para gerar uma biblioteca de sequências modificadas contendo uma ou mais mutações. Este método evita a ocorrência de mutações de mudança no quadro de leitura (frameshift). Este método também simplifica o processo de mutagênese porque todos os oligonucleotídeos podem ser sintetizados para ter o mesmo sítio de restrição, e ligantes sintéticos não são necessários para criar os sítios de restrição tal como é requerido por alguns outros métodos.

[00211] Em um aspecto, a invenção inclui um método para fazer uma protease para água fria, o método compreendendo: (a) fornecer uma biblioteca de variantes de ácido nucleico de uma molécula substrato de DNA que codifica uma protease original; (b) transformar a biblioteca de variantes de ácido nucleico em células hospedeiras; (c) expressar a biblioteca para fornecer produtos de expressão de polipeptídeo; (d) selecionar os produtos de expressão de polipeptídeo para identificar uma protease mutante que tem pelo menos uma propriedade selecionada do grupo que consiste em: (i) ter um índice de desempenho de 1,1 a 10 sobre uma mancha de sangue/leite/tinta (SLT) a pH

8 e 16°C em comparação a PURAFECT® Prime (SEQ ID n° 2 com a substituição de aminoácido Y217L) conforme definido no "método de teste" descrito no exemplo 1 da parte I; (ii) um índice de desempenho de 1,3 a 10 sobre uma mancha de SLT a pH 8 e 16°C em comparação a BPN' (SEQ ID n° 2), conforme definido no "método de teste" descrito neste documento na parte I, exemplo 1; (iii) um índice de desempenho de 0,9 a cerca de 10 sobre uma mancha de SLT a pH 8 e 16°C em comparação a BPN'-v3 (SEQ ID n° 4), conforme definido no "método de teste" descrito neste documento na parte I, exemplo 1; e (d) um índice de desempenho de 1,0 a cerca de 10 para SLT a pH 8 e 16°C em comparação a BPN'-v36 (SEQ ID n° 6), conforme definido no "método de teste" descrito neste documento na parte I, exemplo 1, sendo que uma protease para água fria é identificada.

[00212] Em outro aspecto, a invenção fornece um vetor de expressão que compreende pelo menos um ácido nucleico da invenção. Tal ácido nucleico pode compreender uma sequência de polinucleotídeo que codifica: (a) pelo menos uma variante de protease da invenção, incluindo qualquer variante de protease aqui descrita, incluindo, mas não se limitando às variantes de protease apresentadas nos exemplos da parte I, (b) pelo menos uma protease para água fria da invenção, ou (c) pelo menos uma variante de protease da invenção, incluindo qualquer variante de protease aqui descrita, incluindo, mas não se limitando a uma variante GG36 série I apresentada nos exemplos da parte II, ou uma sequência de polinucleotídeo complementar de qualquer um dos mesmos. Tal vetor de expressão pode ser operacionalmente ligado a um promotor.

[00213] Em outro aspecto, a invenção fornece uma célula hospedeira recombinante que compreende: (a) um ácido nucleico da invenção, (b) um vetor de expressão que compreende um ácido nucleico da invenção, (c) uma variante de protease da invenção, incluindo, mas não

se limitando a, por exemplo, uma protease para água fria da invenção. A célula hospedeira recombinante pode ser uma célula bacteriana, como, por exemplo, mas não se limitando, por exemplo, a uma célula de *Bacillus*. Uma célula de *Bacillus* exemplificadora é uma célula de *Bacillus subtilis*.

[00214] Em outro aspecto, a invenção fornece uma cultura celular que compreende: (a) um ácido nucleico da invenção, (b) um vetor de expressão que compreende um ácido nucleico da invenção, (c) uma variante de protease da invenção, incluindo, mas não se limitando a, por exemplo, uma protease para água fria da invenção.

[00215] Em outro aspecto, a invenção fornece vetores isolados ou recombinantes que compreendem pelo menos um polinucleotídeo da invenção aqui descrito (por exemplo, um polinucleotídeo que codifica uma variante de protease da invenção aqui descrita), vetores de expressão ou cassetes de expressão isolados ou recombinantes compreendendo pelo menos um ácido nucleico ou polinucleotídeo da invenção, construtos de DNA isolados, substancialmente puros, ou recombinantes compreendendo pelo menos um ácido nucleico ou polinucleotídeo da invenção, células isoladas ou recombinantes compreendendo pelo menos um polinucleotídeo da invenção, culturas celulares compreendendo células que compreende pelo menos um polinucleotídeo da invenção, culturas celulares que compreende pelo menos um ácido nucleico ou polinucleotídeo da invenção, e composições que compreende um ou mais destes vetores, ácidos nucleicos, vetores de expressão, cassetes de expressão, construtos de DNA, células, culturas celulares, ou qualquer combinação ou misturas dos mesmos.

[00216] Em outro aspecto, a invenção fornece células recombinantes compreendendo pelo menos um vetor (por exemplo, vetor de expressão ou construto de DNA) da invenção que compreende pelo menos um ácido nucleico ou polinucleotídeo da invenção. Algumas des-

tas células recombinantes são transformadas ou transfectadas com este pelo menos um vetor. Tais células são tipicamente chamadas de células hospedeiras. Algumas de tais células compreendem células bacterianas, inclusive, mas não se limitando a, por exemplo, células de *Bacillus* sp., como, por exemplo, células de *Bacillus subtilis*. A invenção também fornece células recombinantes (por exemplo, células hospedeiras recombinantes) compreendendo pelo menos uma variante de protease da invenção.

[00217] Em outro aspecto, a invenção fornece um vetor que compreende um ácido nucleico ou polinucleotídeo da invenção. O vetor pode ser um vetor de expressão ou cassete de expressão no qual uma sequência de polinucleotídeo da invenção, que codifica uma variante de protease da invenção, está operacionalmente ligado a um ou mais segmentos de ácido nucleico necessários para a expressão gênica eficaz (por exemplo, um promotor operacionalmente ligado ao polinucleotídeo da invenção que codifica uma variante de protease da invenção). Um vetor pode incluir um terminador de transcrição e/ou um gene de seleção, como, por exemplo, um gene para resistência a antibióticos que permite a manutenção contínua da cultura de células hospedeiras infectadas pelo plasmídeo por cultivo em meio contendo microbicida.

[00218] Um vetor de expressão pode ser derivado de DNA plasmidial ou viral, ou em aspectos alternativos, contém elementos de ambos. Os vetores exemplificadores incluem, mas não se limitam a, pXX, pC194, pJH101, pE194, pHP13 (Harwood e Cutting (eds.)), Molecular Biological Methods for *Bacillus*, John Wiley & Sons (1990), vide, por exemplo, capítulo 3; os plasmídios de replicação adequados para *B. subtilis* incluem os mostrados na página 92; Perego, M. (1993) Integrational Vectors for Genetic Manipulations in *Bacillus subtilis*, pg. 615 to 624; A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, e R. Losick (ed.), *Bacillus subtilis*

and other Gram-positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

[00219] Para a expressão e a produção de uma proteína de interesse (por exemplo, variante de protease) em uma célula, pelo menos um vetor de expressão compreendendo pelo menos uma cópia de um polinucleotídeo que codifica a protease modificada e, de preferência, compreendendo múltiplas cópias, é transformado na célula sob condições adequadas para expressão da protease. Em um aspecto, uma sequência de polinucleotídeo que codifica a variante de protease (assim como outras sequências incluídas no vetor) é integrada ao genoma da célula hospedeira, enquanto que, em outro aspecto, um vetor plasmidial que compreende uma sequência de polinucleotídeo que codifica a variante de protease permanece como um elemento extracromossômico autônomo dentro da célula. A invenção fornece tanto os elementos de ácido nucleico extracromossômicos como as sequências de nucleotídeo de entrada que são integradas ao genoma da célula hospedeira. Os vetores aqui descritos são úteis para a produção das variantes de protease da invenção. Em um aspecto, um construto de polinucleotídeo que codifica a variante de protease está presente sobre um vetor de integração que permite a integração e, opcionalmente, a amplificação do polinucleotídeo que codifica a variante de protease dentro do cromossomo bacteriano. Exemplos de sítios para integração são bem conhecidos dos versados na técnica. Em um aspecto, a transcrição de um polinucleotídeo que codifica uma variante de protease da invenção é feita por um promotor que é o promotor selvagem para a protease precursora selecionada. Em alguns outros aspectos, o promotor é heterólogo à protease precursora, mas é funcional na célula hospedeira. Especificamente, exemplos de promotores adequados para uso em células hospedeiras bacterianas incluem, mas não se limitam, por exemplo, aos promotores amyE, amyQ, amyL, pstS, sacB,

pSPAC, pAprE, pVeg, pHpall, o promotor do gene da amilase maltogênica de *B. stearothermophilus*, o gene da amilase de *B. amyloliquefaciens* (BAN), o gene da protease alcalina de *B. subtilis*, o gene da protease alcalina de *B. clausii*, e o gene da xilosidase de *B. pumilis*, o gene cryIIIA de *B. thuringiensis*, e o gene da alfa amilase de *B. licheniformis*. Os promotores adicionais incluem, mas não se limitam a, o promotor A4, assim como aos promotores de fago Lambda P_R ou P_L, e os promotores lac, trp ou tac de *E. coli*.

[00220] As variantes de protease da invenção podem ser produzidas em células hospedeiras de qualquer microorganismo adequado Gram positivo, inclusive bactérias e fungos. Por exemplo, em um aspecto, a variante de protease é produzida em células hospedeiras de origem fúngica e/ou bacteriana. Em um aspecto, as células hospedeiras são *Bacillus sp.*, *Streptomyces sp.*, *Escherichia sp.* ou *Aspergillus sp.* Em um aspecto, as variantes de protease são produzidas por células hospedeiras de *Bacillus sp.* Exemplos de células hospedeiras de *Bacillus sp.* que podem ser usadas na produção das variantes de protease da invenção incluem, mas não se limitam a, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. pumilis*, *B. thuringiensis*, *B. clausii*, e *B. megaterium*, assim como outros organismos dentro do gênero *Bacillus*. Em um aspecto, células hospedeiras de *B. subtilis* são usadas para a produção de variantes de protease. As patentes U.S. 5.264.366 e 4.760.025 (RE 34.606) descrevem várias cepas hospedeiras de *Bacillus* que podem ser usadas para produzir variantes de protease da invenção, embora outras cepas adequadas possam ser usadas.

[00221] Várias cepas bacterianas industriais que podem ser usadas para produzir variantes de protease da invenção incluem cepas de *Bacillus sp.* não recombinantes (isto é, selvagens), assim como variantes

de cepas de ocorrência natural e/ou cepas recombinantes. Em um aspecto, a cepa hospedeira é uma cepa recombinante, sendo que um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de interesse foi introduzido no hospedeiro. Em um aspecto, a cepa hospedeira é uma cepa hospedeira de *B. subtilis* e, particularmente, uma cepa hospedeira de *Bacillus subtilis* recombinante. Inúmeras cepas de *B. subtilis* são conhecidas, inclusive, mas não se limitando a, por exemplo, 1A6 (ATCC 39085), 168 (1A01), SB19, W23, Ts85, B637, PB1753 a PB1758, PB3360, JH642, 1A243 (ATCC 39,087), ATCC 21332, ATCC 6051, MI113, DE100 (ATCC 39,094), GX4931, PBT 110, e PEP 211strain (vide, e.g., Hoch et al., Genetics 73:215–228 (1973)) (vide também as patentes US nº 4.450.235 e 4.302.544, e EP 0134048, cada uma das quais estando aqui incorporada a título de referência, em sua totalidade). O uso de *B. subtilis* como células hospedeiras para expressão é bem conhecido na técnica (vide, por exemplo, Palva et al., Gene 19:81-87 (1982); Fahnestock e Fischer, J. Bacteriol. 165:796–804 (1986); e Wang et al., Gene 69:39–47 (1988)).

[00222] Em um aspecto, a célula hospedeira de *Bacillus* é *Bacillus* sp. que inclui uma mutação ou deleção em pelo menos um dos seguintes genes, *degU*, *degS*, *degR* e *degQ*. A mutação pode ser em um gene *degU* e, em alguns casos, a mutação pode ser *degU*(Hy)32. Vide, por exemplo, Msadek et al., J. Bacteriol. 172:824-834 (1990) e Olmos et al., Mol. Gen. Genet. 253:562–567 (1997)). Uma cepa hospedeira típica é *Bacillus subtilis* carregando uma mutação *degU*32(Hy). O hospedeiro de *Bacillus* pode compreender uma mutação de aminoácidos (por exemplo, substituição) ou deleção em *scoC4* (vide, por exemplo, Caldwell et al., J. Bacteriol. 183:7329-7340 (2001)); *spoII*E (vide, por exemplo, Arigoni et al., Mol. Microbiol. 31:1407-1415 (1999)); e/ou *oppA* ou outros genes do operon *opp* (vide, por exemplo, Perego et al., Mol. Microbiol. 5:173-185 (1991)). De fato, contempla-se que qualquer

mutação no operon *opp* que cause o mesmo fenótipo que uma mutação no gene *oppA* poderá ser usada em um aspecto da cepa de *Bacillus* alterada da invenção. Tais mutações podem ocorrer sozinhas ou combinações de mutações podem estar presentes. Em um aspecto, uma cepa alterada da célula hospedeira de *Bacillus* que pode ser usada para produzir uma variante de protease da invenção é uma cepa hospedeira de *Bacillus* que já inclui uma mutação em um ou mais dos genes acima mencionados. Além disso, as células hospedeiras de *Bacillus* sp. que compreendem mutação(ões) e/ou deleções de genes de protease endógenos podem ser usados. A célula hospedeira *Bacillus* pode compreender uma deleção dos genes *aprE* e *nprE*. A célula hospedeira de *Bacillus* sp. pode compreender uma deleção de 5 genes de protease, ou a célula hospedeira de *Bacillus* sp. pode compreender uma deleção de 9 genes de protease (vide, por exemplo, publicação de pedido de patente U.S. n° 2005/0202535).

[00223] As células hospedeiras são transformadas com pelo menos um ácido nucleico que codifica pelo menos uma variante de protease da invenção usando qualquer método adequado conhecido na técnica. Quer o ácido nucleico seja incorporado em um vetor ou seja usado sem a presença de DNA plasmidial, ele é tipicamente introduzido em um microorganismo, em um aspecto, de preferência, uma célula de *E. coli* ou uma célula de *Bacillus* competente. Os métodos para introduzir um ácido nucleico (por exemplo, DNA) em células de *Bacillus* ou células de *E. coli* utilizando construtos ou vetores de DNA plasmidial e transformar tais construtos ou vetores de DNA plasmidial em tais células são bem conhecidos. Em um aspecto, os plasmídios são subsequentemente isolados das células de *E. coli* e transformados em células de *Bacillus*. Entretanto, não é essencial usar microorganismos intervenientes como, por exemplo, *E. coli*, e, em um aspecto, um construto ou vetor de DNA é introduzido diretamente em um hospedeiro de

Bacillus.

[00224] Os versados na técnica têm conhecimento de métodos adequados para introduzir as sequências de ácido nucleico ou polinucleotídeo da invenção em células de *Bacillus* (vide, por exemplo, Ferrari et al., "Genetics," em Harwood et al. (ed.), *Bacillus*, Plenum Publishing Corp. (1989), pág. 57 to 72; Saunders et al., J. Bacteriol. 157:718-726 (1984); Hoch et al., J. Bacteriol. 93:1925 -1937 (1967); Mann et al., Current Microbiol. 13:131-135 (1986); e Holubova, Folia Microbiol. 30:97 (1985); Chang et al., Mol. Gen. Genet. 168:11-115 (1979); Vorobjeva et al., FEMS Microbiol. Lett. 7:261-263 (1980); Smith et al., Appl. Env. Microbiol. 51:634 (1986); Fisher et al., Arch. Microbiol. 139:213-217 (1981); e McDonald, J. Gen. Microbiol. 130:203 (1984)). De fato, métodos tais como transformação, incluindo transformação e congressão de protoplasto, transdução, e fusão de protoplasto são bem conhecidos e adequados ao uso na presente invenção. Métodos de transformação são usados para introduzir um construto ou vetor de DNA compreendendo um ácido nucleico que codifica uma variante de protease da presente invenção em uma célula hospedeira. Métodos conhecidos na técnica para transformar células de *Bacillus* incluem métodos tais como transformação por resgate de marcador plasmidial, que envolve a absorção de um plasmídio doador por células competentes carregando o plasmídio residente parcialmente homólogo (Contente et al., Plasmid 2:555-571 (1979); Haima et al., Mol. Gen. Genet. 223:185-191 (1990); Weinrauch et al., J. Bacteriol. 154:1077-1087 (1983); e Weinrauch et al., J. Bacteriol. 169:1205-1211 (1987)). Neste método, o plasmídio de entrada se recombina com a região homóloga do plasmídio "auxiliar" residente em um processo que imita a transformação cromossômica.

[00225] Em adição aos métodos comumente usados, em um aspecto, as células hospedeiras são transformadas diretamente com um

construto de DNA ou vetor que compreende um ácido nucleico que codifica uma variante de protease da invenção (isto é, uma célula intermediária não é usada para amplificar, ou processar de outro modo o construto de DNA ou vetor antes da introdução na célula hospedeira). A introdução do construto de DNA ou vetor da invenção na célula hospedeira inclui os métodos físicos e químicos conhecidos na técnica para introduzir uma sequência de ácido nucleico (por exemplo, sequência de DNA) em uma célula hospedeira sem inserção em um plasmídio ou vetor. Tais métodos incluem, mas não se limitam à precipitação com cloreto de cálcio, eletroporação, DNA nu, lipossomas e similares. Em aspectos adicionais, os construtos de DNA ou vetores são co-transformados com um plasmídio, sem serem inseridos no plasmídio. Em aspectos adicionais, um marcador seletivo é deletado da cepa de *Bacillus* alterada por métodos conhecidos na técnica (vide Stahl et al., J. Bacteriol. 158:411-418 (1984); e Palmeros et al., Gene 247:255 -264 (2000)).

[00226] Em um aspecto, as células transformadas da presente invenção são cultivadas em meios nutrientes convencionais. As condições de cultivo adequadas específicas, como, por exemplo, temperatura, pH e similares são conhecidas pelos versados na técnica. Além disso, algumas condições de cultivo podem ser encontradas na literatura científica, como, por exemplo, Hopwood (2000) Practical Streptomyces Genetics, John Innes Foundation, Norwich UK; Hardwood et al., (1990) Molecular Biological Methods for *Bacillus*, John Wiley e a partir da American Type Culture Collection (ATCC). Em um aspecto, a invenção fornece uma cultura (por exemplo, cultura celular) que compreende pelo menos uma variante de protease ou pelo menos um ácido nucleico da invenção. Também é fornecida uma composição que compreende pelo menos um ácido nucleico, vetor, ou construto de DNA da invenção.

[00227] As células hospedeiras transformadas com pelo menos uma sequência de polinucleotídeo que codifica pelo menos uma variante de protease da invenção podem ser cultivadas em um meio nutriente adequado sob condições que permitem a expressão da presente protease, após o que a protease resultante é recuperada da cultura. O meio usado para cultivar as células compreende qualquer meio convencional adequado para o cultivo das células hospedeiras, como, por exemplo, meio mínimo ou complexo contendo suplementos adequados. Os meios adequados estão disponíveis junto a fornecedores comerciais ou podem ser preparados de acordo com protocolos publicados (por exemplo, em catálogos da American Type Culture Collection). A protease produzida pelas células pode ser recuperada a partir do meio de cultura por procedimentos convencionais, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, à separação das células hospedeiras do meio por centrifugação ou filtração, precipitação dos componentes proteínicos do sobrenadante ou filtrado através de um sal (por exemplo, sulfato de amônio), purificação cromatografia (por exemplo, troca iônica, filtração em gel, afinidade, etc.). Qualquer método adequado para recuperar ou purificar uma variante de protease da invenção pode ser usado.

[00228] Em um aspecto, uma variante de protease produzida por uma célula hospedeira recombinante é secretada dentro do meio de cultura. Uma sequência de ácido nucleico que codifica um domínio facilitador de purificação pode ser usada para facilitar a purificação das proteínas solúveis. Um vetor ou construto de DNA que compreende uma sequência de polinucleotídeo que codifica uma variante de protease pode compreender, adicionalmente, uma sequência de ácido nucleico que codifica um domínio facilitador de purificação para facilitar a purificação da variante de protease (vide, por exemplo, Kroll, D.J. et al., DNA Cell Biol. 12:441-53 (1993)). Tais domínios facilitadores de

purificação incluem, mas não se limitam, por exemplo, a peptídeos quelantes de metal como, por exemplo, módulos de histidina-triptofano que permitem a purificação sobre metais imobilizados (Porath J., *Protein Expr. Purif.* 3:263-281 (1992)), domínios de proteína A que permitem a purificação sobre imunoglobulina imobilizada, e o domínio utilizado no sistema de purificação por extensão/afinidade FLAGS (Immunex Corp., Seattle, WA). A inclusão de uma sequência ligante clivável como, por exemplo, o fator XA ou enteroquinase (Invitrogen, San Diego, CA) entre o domínio de purificação e a proteína heteróloga também pode ser usada para facilitar a purificação.

[00229] Testes para detectar e medir a atividade enzimática de uma enzima, como, por exemplo, uma variante de protease da invenção, são bem conhecidos. Vários testes para detectar e medir a atividade de proteases, como, por exemplo, as variantes de protease da invenção, também são conhecidos dos versados na técnica. Em particular, testes para medir a atividade da protease estão disponíveis, os quais se baseiam na liberação de peptídeos solúveis em ácido a partir de caseína ou hemoglobina, medido como absorbância a 280 nm ou colorimetricamente usando o método de Folin (vide, por exemplo, Bergmeyer et al., "Methods of Enzymatic Analysis" vol. 5, Peptidases, Proteinases e seus inibidores, Verlag Chemie, Weinheim (1984)). Outros testes exemplificadores envolvem a solubilização de substratos cromogênicos (vide, por exemplo, Ward, "Proteinases," em Fogarty (ed.). Microbial Enzymes and Biotechnology, Applied Science, London, (1983), pp. 251-317). Outros exemplos de testes incluem, mas não se limitam a, o teste de succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-*para* nitroanilida (SAAP-FpNA) e o teste do sal de sódio de sulfonato de 2,4,6-trinitrobenzeno (teste de TNBS). Várias referências adicionais conhecidas dos versados na técnica fornecem métodos adequados (vide, por exemplo, Wells et al., *Nucleic Acids Res.* 11:7911-7925 (1983); Christianson et al.,

Anal. Biochem. 223:119 -129 (1994); e Hsia et al., Anal Biochem. 242:221-227 (1999)).

[00230] Uma variedade de métodos pode ser usada para determinar o nível de produção de uma protease madura (por exemplo, variante de protease madura da invenção) em uma célula hospedeira. Tais métodos incluem, mas não se limitam, por exemplo, a métodos que usam anticorpos policlonais ou monoclonais específicos para a protease. Exemplos de métodos incluem, mas não se limitam, por exemplo, a ensaios imunossorvente ligados à enzima (ELISA), radioimunoensaios (RIA), imunoensaios fluorescentes (FIA), e seleção de célula ativada por fluorescente (FACS). Estes e outros testes são bem conhecidos na técnica (vide, por exemplo, Maddox et al., J. Exp. Med. 158:1211 (1983)).

[00231] Em outro aspecto, a invenção fornece métodos para fabricar ou produzir uma variante de protease madura da invenção. Uma variante de protease madura não inclui um peptídeo de sinal ou uma sequência de pró-peptídeo. Alguns destes métodos compreendem fazer ou produzir uma variante de protease da invenção em uma célula hospedeira bacteriana recombinante, como, por exemplo, uma célula de *Bacillus sp.*, incluindo, por exemplo, uma célula de *Bacillus subtilis*. Em um aspecto, a invenção fornece um método de produzir uma variante de protease da invenção, o método compreendendo cultivar uma célula hospedeira recombinante que compreende um vetor de expressão recombinante compreendendo um ácido nucleico que codifica uma variante de protease da invenção sob condições propícias para a produção da variante de protease. Alguns destes métodos compreendem adicionalmente recuperar a variante de protease a partir da cultura.

[00232] Em um aspecto, a invenção fornece um método de produzir uma variante de protease da invenção, o método compreendendo: (a)

introduzir um vetor de expressão recombinante que compreende um ácido nucleico que codifica uma variante de protease da invenção em uma população de células (por exemplo, células bacterianas, como, por exemplo, células de *Bacillus subtilis*); e (b) cultivar as células em um meio de cultura sob condições propícias para produzir a variante de protease codificada pelo vetor de expressão. Alguns destes métodos compreendem adicionalmente: (c) isolar a variante de protease a partir das células ou a partir do meio de cultura.

[00233] Além da produção recombinante, os polipeptídeos da variante de protease da invenção podem ser produzidos por síntese direta de peptídeo usando técnicas em fase sólida (vide, por exemplo, Stewart et al. (1969) Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co, San Francisco; Merrifield (1963) J. Am. Chem. Soc 85:2149-2154). A síntese de peptídeos pode ser realizada com o uso de técnicas manuais ou automatizadas. Síntese automatizada pode ser alcançada, por exemplo, usando o sintetizador da 431A Peptide Synthesizer da Applied Biosystems (Perkin Elmer, Foster City, Califórnia) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Por exemplo, subsequências podem ser sintetizadas quimicamente separadamente e combinadas com o uso de métodos químicos para fornecer variantes de protease ou fragmentos funcionais das mesmas. Alternativamente, tais sequências de polipeptídeo variantes podem ser compradas junto à qualquer empresa especializada na produção de polipeptídeos. Mais comumente, os polipeptídeos da invenção são produzidos pela expressão de ácidos nucleicos codificantes e recuperação dos polipeptídeos, por exemplo, conforme descrito acima e nos exemplos.

[00234] Em outro aspecto, a invenção fornece um método para produzir uma variante de protease, o método compreendendo cultivar uma célula hospedeira recombinante da invenção, a dita célula hospedeira compreendendo um vetor de expressão que compreende pelo

menos um ácido nucleico da invenção, sob condições propícias para a produção da variante. O método pode compreender, adicionalmente, recuperar a variante a partir da cultura.

[00235] Em outro aspecto, a invenção inclui um método para produzir uma variante de protease, o método compreendendo: (a) introduzir o vetor de expressão recombinante da invenção em uma população de células; e (b) cultivar as células em um meio de cultura sob condições propícias para produzir a variante de subtilisina codificada pelo vetor de expressão. O método pode compreender, adicionalmente, (c) isolar ou recuperar a variante a partir das células ou a partir do meio de cultura.

[00236] Em outro aspecto, a invenção fornece métodos para produzir uma variante de serina protease de uma serina protease de *Bacillus*, compreendendo: transformar uma célula hospedeira com um vetor de expressão compreendendo um ácido nucleico que codifica a variante de serina protease; e cultivar a célula hospedeira transformada sob condições adequadas para a produção da variante de serina protease. Em um aspecto, os métodos compreendem adicionalmente a etapa de coletar a variante de serina protease produzida. Em um aspecto, a célula hospedeira é uma célula de *Bacillus*, e em um subconjunto destes aspectos, a célula de *Bacillus* é uma célula de *B. subtilis*. Além disso, a presente invenção apresenta métodos de limpeza, que compreendem a etapa de colocar uma superfície e/ou um artigo que compreende um tecido em contato com uma composição de limpeza compreendendo uma variante de serina protease. Em alguns métodos alternativos, a presente invenção apresenta métodos de limpeza, que compreendem a etapa de colocar uma superfície e/ou um artigo que compreende louças em contato com uma composição de limpeza compreendendo uma variante de serina protease.

[00237] Em outro aspecto, a invenção fornece um método para

identificar uma protease subtilisina selvagem, a dita protease subtilisina compreendendo uma sequência de aminoácidos que compreende os seguintes aminoácidos: uma glicina ou arginina na posição de aminoácido 24, uma glicina na posição de aminoácido 53, uma asparagina na posição de aminoácido 78, uma alanina na posição de aminoácido 97, uma asparagina na posição de aminoácido 101, uma alanina ou serina na posição de aminoácido 128, e/ou uma leucina ou glutamina na posição de aminoácido 217, sendo que as ditas posições de aminoácido são numeradas por correspondência às posições de aminoácido na sequência de aminoácidos de BPN' apresentada na SEQ ID n° 2, o dito método compreendendo: a) fornecer uma amostra que compreende pelo menos uma protease subtilisina selvagem ou uma biblioteca de proteases de subtilisina selvagens, ou fornecer uma amostra de DNA compreendendo uma ou mais sequências de DNA que codificam as proteases de subtilisina selvagens; e b) identificar uma protease subtilisina selvagem ou uma sequência de DNA que codifica uma protease selvagem.

[00238] Em um décimo-segundo aspecto, a invenção apresenta um vetor de expressão que compreende pelo menos um ácido nucleico do décimo ou décimo-primeiro aspecto da invenção. Um vetor de expressão de acordo com o décimo-segundo aspecto da invenção pode ser operacionalmente ligado a um promotor. Tal vetor de expressão pode estar sob a forma isolada ou purificada.

[00239] Em um décimo-terceiro aspecto, a invenção fornece uma célula hospedeira recombinante que compreende: (a) um ácido nucleico do décimo ou décimo-primeiro aspecto da invenção ou (b) um vetor de expressão do décimo-segundo aspecto da invenção. Uma célula hospedeira recombinante do décimo-terceiro aspecto da invenção pode ser uma célula bacteriana, que pode ser, opcionalmente, uma célula de *Bacillus*. Uma célula hospedeira recombinante do décimo-terceiro

aspecto da invenção pode ser uma célula de *Bacillus subtilis*.

[00240] Em um décimo-quarto aspecto, a invenção apresenta uma cultura celular compreendendo: (a) um ácido nucleico do décimo ou décimo-primeiro aspecto da invenção ou (b) um vetor de expressão do décimo-segundo aspecto da invenção.

[00241] Em um décimo-quinto aspecto, a invenção apresenta um método para produzir uma variante de protease, o método compreendendo cultivar uma célula hospedeira recombinante do décimo-terceiro aspecto da invenção sob condições propícias para a produção da variante. Um método de acordo com o décimo-quinto aspecto da invenção pode compreender, adicionalmente, o isolamento ou recuperação da variante a partir da cultura.

[00242] Em um décimo-sexto aspecto, a invenção apresenta um método para produzir uma variante de protease, o método compreendendo: (a) introduzir o vetor de expressão recombinante do décimo-segundo aspecto da invenção em uma população de células; e (b) cultivar as células em um meio de cultura sob condições propícias para produzir a variante de protease codificada pelo vetor de expressão. O método de acordo com o décimo-sexto aspecto da invenção pode compreender, adicionalmente (c) o isolamento ou recuperação da variante a partir das células ou do meio de cultura.

Composições da invenção

[00243] A invenção inclui uma composição que compreende pelo menos um polipeptídeo (por exemplo, pelo menos uma variante de protease) da invenção. Os polipeptídeos da invenção são descritos *abaixo* e *acima*, e estão incluídos nos exemplos da parte I e nos exemplos da parte II. Tais composições podem compreender pelo menos um excipiente, veículo, ingrediente auxiliar, ou outro substituinte, componente, ou material.

[00244] Por exemplo, em um aspecto, a invenção inclui uma com-

posição que compreende pelo menos uma variante de protease e pelo menos um excipiente, veículo, ingrediente auxiliar, ou outro substituinte, componente, ou material. Tal pelo menos uma variante de protease pode ser qualquer uma daquelas aqui descritas, incluindo, mas não se limitando aos exemplos da parte I. Tal pelo menos uma variante de protease pode ser uma variante de protease BPN'. Por exemplo, uma composição da invenção pode ser uma variante de protease BPN', como, por exemplo, BPN'-v36 (SEQ ID n° 6) ou BPN'-v3 (SEQ ID n° 4) ou qualquer variante de protease descrita aqui ou na exemplos 2 a 23 da parte I. Tal composição pode ser um produto para cuidados de tecidos e da casa ou uma composição para cuidados de tecidos e da casa. Alternativamente tal composição pode ser um produto para cuidados de tecidos e da casa ou uma composição para cuidados de tecidos e da casa.

[00245] Tal composição pode compreender, adicionalmente (em adição à variante de protease BPN') pelo menos uma variante de protease GG36, como, por exemplo, pelo menos uma variante de protease da série I GG36 descrita nos exemplos da parte II. Tais composições são úteis em uma variedade aplicações conforme descrito em outro local no presente documento.

[00246] Em um décimo-sétimo aspecto, a invenção apresenta uma composição que compreende uma variante (ou polipeptídeo tal como no terceiro aspecto) do primeiro, segundo, terceiro, quarto, quinto, sexto, sétimo, oitavo, ou nono aspectos da invenção. Uma composição de acordo com o décimo-sétimo aspecto da invenção pode compreender um ingrediente auxiliar ou veículo conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento. Uma composição de acordo com o décimo-sétimo aspecto da invenção pode compreender pelo menos um builder e/ou pelo menos um tensoativo. Uma composição de acordo com o décimo-sétimo aspecto da invenção pode compreen-

der fosfato ou pode não compreender fosfato.

[00247] Uma composição de acordo com o décimo-sétimo aspecto da invenção pode ser uma composição de limpeza ou uma composição detergente. Uma composição de acordo com o décimo-sétimo aspecto da invenção pode ser um produto para cuidados com tecidos ou com a casa. Uma composição de acordo com o décimo-sétimo aspecto da invenção pode não ser um produto para cuidados com tecidos ou com a casa. Uma composição de acordo com o décimo-sétimo aspecto da invenção pode ser uma composição de limpeza ou composição detergente que é um produto para cuidados com tecidos ou com a casa. Uma composição de acordo com o décimo-sétimo aspecto da invenção pode ser uma composição de limpeza ou composição detergente que não é um produto para cuidados com tecidos ou com a casa.

[00248] Uma composição de acordo com o décimo-sétimo aspecto da invenção pode compreender, adicionalmente, uma, duas, três, quatro, cinco ou mais enzimas adicionais. Tal(is) enzima(s) adicional(is) pode(m) ser selecionada(s) do grupo consistindo em enzimas adicionais selecionadas do grupo que consiste em hemicelulase, celulase, amilase, peroxidase, protease, xilanase, lipase, fosfolipase, esterase, cutinase, pectinase, pectato liase, mananase, queratinase, redutase, oxidase, fenoloxidase, lipoxigenase, ligninase, pululanase, tannase, pentosanase, malanase, β -glucanase, arabinosidase, hialuronidase, condroitinase, e lacase.

[00249] A enzima adicional de acordo com o décimo-sétimo aspecto da invenção pode ser uma variante de protease GG36 que tem atividade proteolítica, como, por exemplo, uma variante de protease GG36 da série I, cuja variante de protease GG36 da série I pode compreender uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de

identidade de sequência com a subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* com a SEQ ID nº 755 e pelo menos uma substituição de aminoácido selecionada do grupo que consiste em A1R, Q2S, V4R, V4S, S9A, R10S, P14K, A16S, H17R, N18R, G20R, T22A, T22R, S24R, S24W, G25R, G25V, V26F, L42I, N43R, N43A, G46R, P52F, P52E, P52N, T57R, Q59A, N62E, N62Q, V68A, V68C, T71G, I72C, A74C, L75A, L75F, L75R, N76D, S78R, L82R, P86W, E89P, E89T, E89G, E89H, E89I, E89V, E89W, Y91N, K94N, G100S, S101A, S101N, S101G, S101D, S103G, S103N, V104L, V104I, S106V, S106G, A108I, L111V, E112V, G115K, G115R, N117F, G118I, V121F, S128D, S128F, S128L, S128N, P129E, S144R, L148I, A158E, G159E, S160D, S166D, N185E, N185I, R186H, S188E, S188D, D197F, V203E, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, P210R, S212I, S212F, Y214F, A215N, A215D, A215E, L217E, L217N, T224A, A230E, A231I, Q236F, N238R, N238K, P239K, P239G, P239R, P239S, W241R, S242R, S242L, N243R, V244R, N248I, N248V, H249R, L250I, N252R, T253R, L262D, Y263F, S265F, L267V, L267N, N269I, N269R, E271F, E271I, E271H, E271P, E271T, E271V, E271L, e A272F, sendo que cada posição de aminoácido da variante é numerada por correspondência a uma posição de aminoácido na sequência de aminoácidos da protease subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* descrita na SEQ ID nº 2. Uma composição de acordo com o décimo-sétimo aspecto da invenção que compreende uma enzima adicional (como, por exemplo, uma protease, como, por exemplo, uma variante de protease G36 da série I, conforme descrito na presente invenção) pode ser um produto para cuidados de tecidos e da casa. Alternativamente, tal composição pode não ser um produto para cuidados de tecidos e da casa.

[00250] Uma composição de acordo com o décimo-sétimo aspecto da invenção pode compreender uma variante de protease GG36 da

série I que compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade de sequência com a subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* da SEQ ID nº 755 e pelo menos uma substituição de aminoácido selecionada do grupo que consiste em T022R-S024R, S009A-E271L, N018R-W241R, N018R-G115R, N043R-H249R, G020R-H249R, V004R-H249R, G020R-S024R, N018R-H249R, S009A-G020R, G020R-W241R, S009A-S078R, G020R-G115R, N018R-S024R, S024R-S242R, T022R-G115R, N018R-N043R, G020R-N043R, N018R-S242R, S242R-N269R, N018R-V244R, S024R-N269R, G020R-E271L, S024R-E271L, V004R-S009A, G020R-N269R, A001R-S024R, V244R-E271L, S009A-N018R, W241R-E271L, V004R-S024R, S009A-H249R, S009A-T022R, N062E-P129E, N062E-G159E, A016S-L148I, A158E-H249R, A016S-N062E, L111V-S188D, T022A-N062E, N062E-L148I, T022A-P129E, N062E-E271F, N062E-A158E, A016S-G159E, N062E-R186H, S128N-G159E, N062E-S188D, N062E-S128N, L148I-G159E, S103G-A158E, L111V-G159E, A158E-E271F, A016S-S188D, T022A-L111V, S128N-A158E, A016S-A158E, V104L-A158E, S128N-R186H, G159E-Y209E, N062E-S101A, L111V-Y209E, L148I-S188D, S101A-Y209E, T022A-S188D, A016S-T022A, S128N-P129E, A016S-Y209E, A016S-S128N, T022A-E089P, S128N-Y209E, E089P-A158E, N062E-S103G, R186H-E271F, A016S-P129E, E089P-G159E, L111V-H249R, S101A-P129E, L148I-Y209E, T022A-G159E, P129E-H249R, P129E-Y209E, V104L-P129E, S128N-S188D, L111V-A158E, T022A-A158E, N062E-Y209E, N062E-H249R, S101A-R186H, E089P-P129E, P129E-E271, T22A-L111V-G159E, S101A-S103G-V104L-Y209E, S101A-S103G-V104L-G159E, S101A-S103G-V104L-S188D, S101G-S103A-V104I-G159D, T22A-S103G-G159E, T22A-S128N-E271F-Y209E, T22A-Y209E-E271F, T22A-S101A-Y209E, S101A-Y209E-E271F, T22A-L111V-S128N,

T22A-S101A-G159E, S101A-S103G-V104L, T22A-S101A-S103G-V104L, S101A-S103G-V104L, S101G-S103A-V104I, S101A-S103G-V104L-S128N, S103A-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q245R-N248D, N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-S24R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-T253R, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N238R, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N76D, e S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-E271F, sendo que cada posição de aminoácido da variante é numerada por correspondência a uma posição de aminoácido na sequência de aminoácidos da protease subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* descrita na SEQ ID nº 2. Tal composição pode ser um produto para cuidados de tecidos e da casa ou uma composição para cuidados de tecidos e da casa. Em outro aspecto, tal composição pode não ser um produto para cuidados de tecidos e da casa ou uma

composição para cuidados de tecidos e da casa.

[00251] Uma composição de acordo com o décimo-sétimo aspecto da invenção pode compreender uma variante de protease GG36 da série I que compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade de sequência com a subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* da SEQ ID n° 755 e compreende três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou mesmo 25 substituições de aminoácido selecionadas do grupo que consiste em: A1R, Q2S, V4R, V4S, S9A, R10S, P14K, A16S, H17R, N18R, G20R, T22A, T22R, S24R, S24W, G25R, G25V, V26F, L42I, N43R, N43A, G46R, P52F, P52E, P52N, T57R, Q59A, N62E, N62Q, V68A, V68C, T71G, I72C, A74C, L75A, L75F, L75R, N76D, S78R, L82R, P86W, E89P, E89T, E89G, E89H, E89I, E89V, E89W, Y91N, K94N, G100S, S101A, S101N, S101G, S101D, S103G, S103N, V104L, V104I, S106V, S106G, A108I, L111V, E112V, G115K, G115R, N117F, G118I, V121F, S128D, S128F, S128L, S128N, P129E, S144R, L148I, A158E, G159E, S160D, S166D, N185E, N185I, R186H, S188E, S188D, D197F, V203E, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, P210R, S212I, S212F, Y214F, A215N, A215D, A215E, L217E, L217N, T224A, A230E, A231I, Q236F, N238R, N238K, P239K, P239G, P239R, P239S, W241R, S242R, S242L, N243R, V244R, N248I, N248V, H249R, L250I, N252R, T253R, L262D, Y263F, S265F, L267V, L267N, N269I, N269R, E271F, E271I, E271H, E271P, E271T, E271V, E271L, e A272F; e opcionalmente pelo menos uma substituição de aminoácido selecionada do grupo que consiste em: S103A, G159D, Q236H, Q245R, N248D, e N252K, em que cada posição de aminoácido da variante é numerada por correspondência a uma posição de aminoácido na sequência de aminoácidos da protease subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* descrita na SEQ ID n° 2.

Tal composição pode ser um produto para cuidados de tecidos e da casa ou uma composição para cuidados de tecidos e da casa. Em outro aspecto, tal composição pode não ser um produto para cuidados de tecidos e da casa ou uma composição para cuidados de tecidos e da casa.

[00252] Uma composição de acordo com o décimo-sétimo aspecto da invenção pode compreender uma variante de protease GG36 da série I que compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade de sequência com a subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* da SEQ ID nº 755 e (a) duas ou mais substituições seleccionadas do grupo que consiste em A1R, Q2S, V4R, V4S, S9A, R10S, P14K, A16S, T22A, T22R, S24R, G25V, V26F, L42I, P52F, P52E, P52N, N62E, N62Q, V68A, V68C, T71G, I72C, A74C, L75A, L75F, S78R, E89P, E89T, E89G, E89H, E89W, Y91N, K94N, G100S, S101A, S101N, S101G, S101D, S103G, S103N, V104L, V104I, A108I, L111V, E112V, G115K, N117F, V121F, S128D, S128F, S128L, S128N, P129E, L148I, A158E, G159E, S160D, S166D, N185E, R186H, S188E, S188D, V203E, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, P210R, S212I, S212F, Y214F, A215N, A215D, A215E, L217E, L217N, T224A, A230E, A231I, Q236F, N238R, N238K, P239K, P239G, P239R, N248V, H249R, L250I, L262D, Y263F, S265F, L267V, L267N, N269I, N269R, E271F, E271I, E271H e A272F, e/ou (b) um ou mais conjuntos de substituições seleccionadas do grupo que consiste em N062E-P129E, N062E-G159E, A016S-L148I, A158E-H249R, A016S-N062E, L111V-S188D, T022A-N062E, N062E-L148I, T022A-P129E, N062E-E271F, N062E-A158E, A016S-G159E, N062E-R186H, S128N-G159E, N062E-S188D, N062E-S128N, L148I-G159E, S103G-A158E, L111V-G159E, A158E-E271F, A016S-S188D, T022A-L111V, S128N-A158E, A016S-A158E, V104L-A158E, S128N-R186H,

G159E-Y209E, N062E-S101A, L111V-Y209E, L148I-S188D, S101A-Y209E, T022A-S188D, A016S-T022A, S128N-P129E, A016S-Y209E, A016S-S128N, T022A-E089P, S128N-Y209E, E089P-A158E, N062E-S103G, R186H-E271F, A016S-P129E, E089P-G159E, L111V-H249R, S101A-P129E, L148I-Y209E, T022A-G159E, P129E-H249R, P129E-Y209E, V104L-P129E, S128N-S188D, L111V-A158E, T022A-A158E, N062E-Y209E, N062E-H249R, S101A-R186H, E089P-P129E, P129E-E271F, T22A-L111V-G159E, S101A-S103G-V104L-Y209E, S101A-S103G-V104L-G159E, S101A-S103G-V104L-S188D, S101G-S103A-V104I-G159D, T22A-S103G-G159E, T22A-S128N-E271F-Y209E, T22A-Y209E-E271F, T22A-S101A-Y209E, S101A-Y209E-E271F, T22A-L111V-S128N, T22A-S101A-G159E, S101A-S103G-V104L, T22A-S101A-S103G-V104L, S101A-S103G-V104L, S101G-S103A-V104I, S101A-S103G-V104L-S128N, S103A-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D, N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-S24R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-T253R, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N238R,

S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N76D, e S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-E271F, sendo que cada posição de aminoácido da variante é numerada por correspondência a uma posição de aminoácido na sequência de aminoácidos da protease subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* apresentada na SEQ ID nº 2. Tal composição pode ser um produto para cuidados de tecidos e da casa ou uma composição para cuidados de tecidos e da casa. Em outro aspecto, tal composição pode não ser um produto para cuidados de tecidos e da casa ou uma composição para cuidados de tecidos e da casa.

[00253] Uma composição de acordo com o décimo-sétimo aspecto da invenção pode compreender uma variante de protease GG36 da série I que compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade de sequência com a subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* da SEQ ID nº 755 e (a) duas ou mais substituições selecionadas a partir do grupo que consiste em V4R, H17R, N18R, G20R, T22R, S24R, S24W, G25R, N43R, N43A, G46R, P52F, P52N, T57R, Q59A, N62Q, T71G, L75R, N76D, S78R, L82R, P86W, E89P, E89W, E89T, E89I, E89H, E89V, V104L, S106V, S106G, G115R, G118I, V121F, S144R, N185I, D197F, Y209N, Y209S, L217E, A231I, P239R, P239S, W241R, S242R, S242L, N243R, V244R, N248I, H249R, N252R, T253R, E271T, E271V, E271L, E271H, E271F, E271P, A1R, S9A, S212F, e N269R; e/ou (b) um ou mais conjuntos de substituições selecionadas do grupo que consiste em T022R-S024R, S009A-E271L, N018R-W241R, N018R-G115R, N043R-H249R, G020R-H249R, V004R-H249R, G020R-S024R, N018R-H249R, S009A-G020R, G020R-W241R, S009A-S078R, G020R-G115R,

N018R-S024R, S024R-S242R, T022R-G115R, N018R-N043R, G020R-N043R, N018R-S242R, S242R-N269R, N018R-V244R, S024R-N269R, G020R-E271L, S024R-E271L, V004R-S009A, G020R-N269R, A001R-S024R, V244R-E271L, S009A-N018R, W241R-E271L, V004R-S024R, S009A-H249R, S009A-T022R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-S24R, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N252K, e S101G-S103A-V104L-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, sendo que cada posição de aminoácido da variante é numerada por correspondência a uma posição de aminoácido na sequência de aminoácidos da protease subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* apresentada na SEQ ID nº 2. Tal composição pode ser um produto para cuidados de tecidos e da casa ou uma composição para cuidados de tecidos e da casa. Em outro aspecto, tal composição pode não ser um produto para cuidados de tecidos e da casa ou uma composição para cuidados de tecidos e da casa.

[00254] Uma composição de acordo com o décimo-sétimo aspecto da invenção pode compreender pelo menos uma enzima adicional selecionada do grupo que consiste em hemicelulase, celulase, amilase, peroxidase, protease, xilanase, lipase, fosfolipase, esterase, cutinase, pectinase, pectato liase, mananase, queratinase, redutase, oxidase, fenoloxidase, lipoxigenase, ligninase, pululanase, tanase, pentosanase, malanase, β -glucanase, arabinosidase, hialuronidase, condroitinase, e lacase. Uma composição de acordo com o décimo-sétimo aspecto da invenção pode compreender duas ou mais enzimas adicionais selecionadas do grupo que consiste em hemicelulase, celulase, amilase, peroxidase, protease, xilanase, lipase, fosfolipase, esterase, cutinase, pectinase, pectato liase, mananase, queratinase, redutase, oxi-

dase, fenoloxidase, lipoxigenase, ligninase, pululanase, tanase, pentosanase, malanase, β -glucanase, arabinosidase, hialuronidase, condroitinase, e lacase.

[00255] Uma composição de acordo com o décimo-sétimo aspecto da invenção pode compreender fosfato ou pode não conter fosfato. Uma composição de acordo com o décimo-sétimo aspecto da invenção pode compreender pelo menos um builder e/ou pelo menos um tensoativo.

[00256] Conforme discutido adicionalmente em outro local no presente documento, os polipeptídeos da invenção, incluindo as variantes de protease da invenção, são úteis em uma variedade de aplicações para limpeza, incluindo aplicações para limpeza de roupas, aplicações para lavagem automática de louças, aplicações para lavagem de louças à mão, aplicações para limpeza de superfícies duras, aplicações de cuidados pessoais, e outras aplicações aqui descritas. Desta forma, por exemplo, em um aspecto, a invenção fornece composições de limpeza que compreendem pelo menos um polipeptídeo (por exemplo, variante de protease) da invenção. Conforme observado acima, tais composições de limpeza incluem, mas não se limitam, por exemplo, a composições detergentes para lavagem automática e manual de louças, composições detergentes para lavagem de roupas (incluindo, por exemplo, composições detergentes líquidas e em pó para lavagem de roupas), composições para limpeza de tecido, composições para limpeza de superfícies duras (incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a uma superfície dura de um item que não é uma louça, não é um utensílio de mesa, mesa, tampo da mesa, item de mobília, parede, piso, teto, etc.). Tais composições de limpeza, que são úteis nos métodos para limpar um item ou uma superfície que precisa de limpeza, podem compreender, por exemplo, mas não se limitam a, pelo menos um excipiente, veículo, e/ou outro substituinte, componente, ou mate-

rial.

[00257] Em outro aspecto, a invenção fornece uma composição compreendendo qualquer polipeptídeo da invenção (por exemplo, qualquer variante de protease ou variante de subtilisina da invenção) aqui descrito, sendo que a dita composição é uma composição para cuidados de tecidos e da casa ou um produto para cuidados de tecidos e da casa.

[00258] Em outro aspecto, a invenção fornece uma composição compreendendo qualquer polipeptídeo da invenção (por exemplo, qualquer variante de protease ou variante de subtilisina da invenção) aqui descrito, sendo que a dita composição não é uma composição para cuidados de tecidos e da casa ou não é um produto para cuidados de tecidos e da casa. Uma composição da invenção compreendendo uma variante de protease da invenção pode compreender, adicionalmente, pelo menos um material auxiliar selecionado a partir de encapsulado de perfume; agente de tonalização de tecido; alvejante solúvel em água fria; catalisador de alvejamento que pode compreender um material selecionado a partir de um cátion de imínio, poliion de imínio, zwitterion de imínio; amina modificada; óxido de amina modificado; N-sulfonil imina; N-fosfonil imina; N-acil imina; dióxido de tiadiazol; perfluoroimina; cetona de açúcar cíclico; lipase de primeira lavagem; celulase bacteriana para limpeza; tensoativo não iônico Guerbet; e misturas de qualquer um dos mesmos. As composições da invenção podem compreender, adicionalmente, pelo menos uma protease não imunoequivalente adicional selecionada a partir de subtilisinas (EC 3.4.21.62); proteases semelhantes à tripsina ou semelhantes à quimo-tripsina; metaloproteases; e misturas dos mesmos.

[00259] As composições da invenção podem compreender, adicionalmente, pelo menos uma protease não imunoequivalente adicional selecionada a partir de: subtilisinas (EC 3.4.21.62) derivadas de *B.*

subtilis, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* e *B. gibsonii*; proteases de tripsina e/ou proteases de quimotripsina derivadas de *Celulomonas*; metaloproteases derivadas de *B. amyloliquefaciens*; e misturas dos mesmos.

[00260] As composições da invenção compreendem adicionalmente pelo menos uma enzima adicional selecionada a partir de lipases de primeira lavagem; alfa-amilases; celulases bacterianas de limpeza; e misturas dos mesmos.

[00261] Uma composição da invenção pode compreender, adicionalmente, pelo menos um dos seguintes: um encapsulado que compreende um perfume compreende uma micro cápsula de perfume; um agente de tonalização que compreende um material selecionado a partir de corantes básicos, ácidos, hidrofóbicos, diretos e poliméricos, e conjugados de corante que possuem um comprimento de onda de absorção de pico de 550 nm a 650 nm e misturas dos mesmos; um tensoativo detergente que compreende um material selecionado a partir de tensoativos detergentes aniônicos, tensoativos detergentes não iônicos, tensoativos detergentes catiônicos, tensoativos detergentes zwitteriônicos e tensoativos detergentes anfotéricos e misturas dos mesmos; um builder compreendendo um material selecionado de zeólitos, fosfatos e misturas dos mesmos; um sal de silicato compreendendo um material selecionado de silicato de sódio, silicato de potássio e misturas dos mesmos; um alvejante compreendendo um material selecionado de alvejante solúvel em água fria e misturas dos mesmos; um polímero de carboxilato que compreende um material selecionado de copolímero aleatório de maleato/acrilato ou homopolímero de poliácido acrílico e misturas dos mesmos; um polímero para liberação de sujeiras compreendendo um material selecionado de co-polímero de tereftalato e misturas dos mesmos; um polímero celulósico compreendendo um material selecionado de alquil celulose, alquil alcoxiálquil celulose, carbóxi al-

quil celulose, alquil carbóxi alquil celulose e misturas dos mesmos; um catalisador de alvejamento compreendendo um material selecionado de um cátion de imínio; poliíon de imínio; zwiteríon de imínio; amina modificada; óxido de amina modificado; N-sulfonil imina; N-fosfonil imina; N-acil imina; dióxido de tiadiazol; perfluoroimina; cetona de açúcar cíclico e qualquer mistura desses materiais; um ativador de alvejamento compreendendo um material selecionado de sulfonato de dodecanoil oxibenzeno, sulfonato de decanoil oxibenzeno, ácido decanoil oxibenzóico ou sal do mesmo, sulfonato de 3,5,5-trimetil hexanoilóxi benzeno, tetra acetil etileno diamina (TAED), sulfonato de nonanoiloxibenzeno (NOBS) e misturas dos mesmos; uma fonte de peróxido de hidrogênio compreendendo um material selecionado de um sal de peridrato inorgânico, incluindo um sal de metal alcalino, como, por exemplo, sais de sódio de perborato (geralmente mono- ou tetra-hidrato), percarbonato, persulfato, perfosfato, sal de persilicato, e qualquer mistura desses materiais; um quelante compreendendo um material selecionado de DTPA (ácido dietileno triamina pentaacético), HEDP (ácido hidroxietano difosfônico), DTPMP (dietileno triamina penta(ácido metileno fosfônico)), ácido etilenodiamina dissuccínico (EDDS), sal dissódico de ácido 1,2-di-hidróxi benzeno-3,5-dissulfônico hidratado, derivado do dito quelante; e qualquer mistura desses materiais.

[00262] Uma composição da invenção pode compreender um agente de tonalização de tecido selecionado do grupo que consiste em um corante; conjugado corante-argila compreendendo pelo menos um corante catiônico básico e uma argila de esmectita; e qualquer mistura desses materiais.

[00263] Uma composição da invenção pode compreender pelo menos um agente de tonalização de tecido selecionado a partir de corante de pequenas moléculas, corante polimérico, e qualquer mistura desses materiais; conjugado corante-argila compreendendo pelo menos

um corante catiônico básico e uma argila de esmectita; e qualquer mistura desses materiais.

[00264] Uma composição que compreende uma protease da invenção pode ser fornecida em doses unitárias com um único compartimento ou com múltiplos compartimentos. A composição pode ser uma dose unitária com múltiplos compartimentos, sendo que a variante de protease está em um compartimento diferente do que qualquer fonte de peróxido de hidrogênio e/ou quelante e/ou enzima adicional. Uma composição que compreende pelo menos uma variante de protease ou polipeptídeo da invenção pode compreender um líquido de lavagem.

[00265] Uma composição que compreende pelo menos uma variante de protease da invenção pode compreender um ou mais dos seguintes ingredientes (com base no peso do total da composição): de cerca de 0,0005%, em peso a cerca de 0,1% em peso, de cerca de 0,001% em peso a cerca de 0,05% em peso, ou mesmo de cerca de 0,002% em peso a cerca de 0,03% em peso da dita variante de protease; e um ou mais dos seguintes: de cerca de 0,00003% em peso a cerca de 0,1% em peso de agente de tonalização de tecido; de cerca de 0,001% em peso a cerca de 5% em peso de cápsulas de perfume; de cerca de 0,001% em peso a cerca de 1% em peso de alvejantes solúveis em água fria; de cerca de 0,00003% em peso a cerca de 0,1% em peso de catalisadores de alvejamento; de cerca de 0,00003% em peso a cerca de 0,1% em peso de lipases de primeira lavagem; de cerca de 0,00003% em peso a cerca de 0,1% em peso celulasas bacterianas de limpeza; e/ou de cerca de 0,05% em peso a cerca de 20% em peso de tensoativos não iônicos de Guerbet.

[00266] Uma composição pode ser um detergente para lavagem de roupas granular ou em pó que compreende uma protease para água fria ou que compreende uma variante de protease que não é uma pro-

tease para água fria.

[00267] Uma composição da invenção pode ser fornecida em qualquer forma adequada, incluindo um fluido ou sólido. A composição pode estar sob a forma de um saco com uma dose unitária, especialmente quando está sob a forma de um líquido, e a composição pode ser pelo menos parcialmente, ou mesmo completamente, encerrada por um saco solúvel em água. Além disso, a composição pode ter qualquer combinação de parâmetros e/ou características detalhadas acima.

[00268] Exceto onde especificado em contrário, todos os níveis de componente ou composição aqui fornecidos são com relação ao teor de ativo daquele componente ou composição, e não incluem impurezas, por exemplo, solventes residuais ou subprodutos, que podem estar presente em fontes comercialmente disponíveis. Os pesos dos componentes enzimáticos são com base na proteína ativa total. Todas as porcentagens e razões são calculadas em peso, exceto onde indicado em contrário. Todas as porcentagens e razões são calculadas com base na composição total exceto onde indicado em contrário. Nas composições detergentes exemplificadas, os níveis das enzimas são expressos como enzima pura em peso da composição total e, exceto onde especificado em contrário, os ingredientes do detergente são expressos com base no peso das composições totais.

[00269] Conforme indicado aqui, em um aspecto, as composições de limpeza da presente invenção podem compreender, ainda um ou mais materiais ou ingredientes auxiliares incluindo, mas não se limitando por exemplo, a um ou mais tensoativos, builders, alvejantes, ativadores de alvejamento, catalisadores de alvejamento, outras enzimas, sistemas estabilizantes de enzimas, quelantes, alvejantes ópticos, polímeros para liberação de sujeiras, agentes para transferência de corantes, dispersantes, supressores de espuma, corantes, perfumes, cápsulas de perfume, corantes, sais de carga, hidrótropos, fotoa-

tivadores, fluorescedores, condicionadores de tecido, amaciantes de tecido, tensoativos hidrolisáveis, conservantes, antioxidantes, agentes anti-encolhimento, agentes anti-amarrotamento, germicidas, fungicidas, pontos de cor, agentes para tratamento de prata, agentes anti-embaciamento e/ou anti-corrosão, fontes de alcalinidade, agentes solubilizantes, veículos, excipientes, elementos auxiliares ao processamento, pigmentos, auxiliares de enxágue (por exemplo, um auxiliar de enxágue contendo pelo menos um tensoativo para evitar a formação de gotículas de água por fazer a água drenar a partir da superfície do item que está sendo limpo em uma lâmina fina, ao invés de formar gotículas), solventes, e/ou agentes de controle de pH (vide, por exemplo, patentes US n°s 6.610.642, 6.605.458, 5.705.464, 5.710.115, 5.698.504, 5.695.679, 5.686.014 e 5.646.101, todos os quais estão aqui incorporados a título de referência). Os aspectos dos materiais específicos da composição de limpeza são exemplificados em detalhes abaixo. Se um material(is) auxiliar(es) de limpeza não for(em) compatível(is) com uma variante de protease da presente invenção em uma composição de limpeza desejada, então, usa-se um método adequado para manter o(s) material(is) auxiliar(es) de limpeza e a(s) variante(s) de protease separados (isto é, não entrando em contato com um com o outro) até a combinação dos dois componentes ser apropriada. Tais métodos de separação incluem qualquer método adequado conhecido na técnica (por exemplo, cápsulas de gel, encapsulação, tabletes, separação física, etc.).

[00270] As composições de limpeza da presente invenção são empregadas vantajosamente, por exemplo, em aplicações para lavanderia, aplicações para limpeza de superfícies duras, aplicações para lavagem manual ou à mão de louças, aplicações para lavagem automática de louças, aplicações para limpeza de óculos, assim como aplicações cosméticas, como, por exemplo, para limpar dentaduras, den-

tes, cabelo, e pele. Devido às vantagens únicas de eficácia aumentada em soluções a temperaturas mais baixas, as enzimas variantes de protease da presente invenção são adequadas para aplicações de lavanderia e aplicações de lavagem de louças, incluindo aplicações de lavagem de louças manual e automática. Além disso, as enzimas variantes de protease da presente invenção podem ser usadas em composições sólidas, em gel, granulares, e/ou líquidas, incluindo composições e/ou formulações detergentes sólidas, em gel, granulares, e/ou líquidas.

[00271] As variantes de protease da presente invenção também podem ser usadas como composições de aditivo para produto de limpeza. Em um aspecto, uma variante de protease da invenção é útil em aplicações para limpeza e métodos em solução a baixa temperatura. Em um aspecto, a invenção fornece composições de produto aditivo de limpeza que incluem pelo menos uma enzima variante de protease da presente invenção e que são idealmente adequadas para inclusão em um processo de lavagem quando se deseja eficácia de branqueamento adicional. Tais casos incluem, mas não se limitam, por exemplo, a aplicações para limpeza em solução a baixa temperatura. Em um aspecto, a composição de produto aditivo está na sua forma mais simples – isto é, uma ou mais variantes de protease da invenção. Em um aspecto, a composição de produto aditivo é embalada em uma forma de dosagem para ser adicionada a um processo de limpeza. Em um aspecto, a composição de produto aditivo é embalada em uma forma de dosagem para ser adicionada a um processo de limpeza no qual uma fonte de peróxigênio é empregada e no qual se deseja eficácia de alvejamento aumentada. Qualquer forma unitária de dosagem única adequada pode ser usada, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a pílulas, tabletes, cápsulas de gel, ou outras unidades de dosagem única, como, por exemplo, pós ou líquidos pré-medidos. Desta

forma, em um aspecto, a invenção fornece uma composição de produto de limpeza que compreende pelo menos uma variante de protease da invenção, sendo que o produto é formulado em uma forma adequada (por exemplo, como um líquido, sólido em pó, pílula, tablete, cápsula de gel ou outra forma adequada) em uma unidade de dosagem única adequada para que uma dose única da variante de protease seja fornecida. Tais produtos de limpeza são úteis em uma variedade métodos e aplicações de limpeza, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a métodos e aplicações de lavagem de roupas na máquina ou manual, lavagem de louças automática ou métodos e aplicações de lavagem de louças à mão, etc. Tais métodos e aplicações de limpeza podem ser conduzidos a uma baixa temperatura ou condições de baixo pH. Em um aspecto, pelo menos uma carga e/ou pelo menos um material veículo é incluído para aumentar o volume de tais composições. Materiais de carga ou veículos adequados incluem, mas não se limitam, por exemplo, a vários sais de sulfato, carbonato e silicato assim como talco, argila e similares. Os materiais de carga ou veículos adequados para composições líquidas incluem, mas não se limitam, por exemplo, a água ou álcoois primários e secundários de baixo peso molecular incluindo polióis e dióis. Exemplos destes álcoois incluem, mas não se limitam, por exemplo, a metanol, etanol, propanol e isopropanol. Em um aspecto, as composições contêm de cerca de 5% a cerca de 90% destes materiais de carga ou veículos. As cargas ácidas podem ser incluídas nestas composições para reduzir o pH da solução resultante no método ou aplicação de limpeza. Alternativamente, em um aspecto, o aditivo de limpeza inclui um ou mais ingredientes auxiliares, tal como descrito mais completamente a seguir.

[00272] As presentes composições de limpeza e aditivos de limpeza exigem uma quantidade eficaz de pelo menos uma variante de protease da invenção, sozinha ou em combinação com outras proteases e/ou

enzimas adicionais. O nível necessário de enzima é obtido pela adição de uma ou mais variantes de protease da invenção. Tipicamente, uma composição de limpeza compreende pelo menos cerca de 0,0001 por cento, em peso, a cerca de 20 por cento, em peso, de cerca de 0,0001 a cerca de 10 por cento, em peso, de cerca de 0,0001 a cerca de 1 por cento em peso, de cerca de 0,001 a cerca de 1 por cento em peso, ou de cerca de 0,01 a cerca de 0,1 por cento em peso de pelo menos uma variante de protease da invenção. Em um aspecto, uma composição da invenção (por exemplo, composição de limpeza da invenção) compreende de cerca de 0,01 miligrama (mg) a cerca de 10 mg, cerca de 0,01 a cerca de 5 mg, cerca de 0,01 mg a cerca de 2 mg, cerca de 0,01 a cerca de 1 mg, cerca de 0,5 mg a cerca de 10 mg, cerca de 0,5 a cerca de 5 mg, cerca de 0,5 a cerca de 4 mg, cerca de 0,5 a cerca de 4 mg, cerca de 0,5 a cerca de 3 mg, cerca de 0,5 a cerca de 2 mg, cerca de 0,5 a cerca de 1 mg, cerca de 0,1 a cerca de 10 mg, cerca de 0,1 a cerca de 5 mg, cerca de 0,1 a cerca de 4 mg, cerca de 0,1 a cerca de 3 mg, cerca de 0,1 a cerca de 2 mg, cerca de 0,1 a cerca de 2 mg, cerca de 0,1 a cerca de 1 mg, cerca de 0,1 a cerca de 0,5 mg de pelo menos uma variante de protease ativa da invenção por grama da composição.

[00273] A invenção inclui uma composição de limpeza que compreende uma quantidade de uma variante de protease da invenção (a dita composição compreendendo, opcionalmente, um ou mais ingredientes auxiliares) para que, quando a composição de limpeza for adicionada à água de lavagem, a concentração de protease resultante no líquido de lavagem resultante seja de 0,01 ppm a 10 ppm, incluindo, por exemplo, 0,1 ppm a 1 ppm, 0,1 a 5 ppm, 1 a 5 ppm, 1 ppm a 10 ppm, 5 ppm a 10 ppm, 5 ppm a 7 ppm.

[00274] As composições de limpeza da invenção são formuladas tipicamente para que, durante o uso em operações de limpeza aquosa,

a água de lavagem tenha um pH de cerca de 5,0 a cerca de 11,5 ou mesmo de cerca de 7,5 a cerca de 10,5. As composições ou formulações líquidas são tipicamente formuladas para ter um pH puro de cerca de 3,0 a cerca de 9,0 ou de cerca de 3,0 a cerca de 5,0. As composições de produto de lavanderia granulares são tipicamente formuladas para ter um pH de cerca de 9 a cerca de 11. As composições detergentes para lavagem de louças à mão e para lavagem de louças automática são tipicamente formuladas para ter um pH de cerca de 8 a cerca de 11,5, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a faixas de pH de cerca de 8 a cerca de 10, de cerca de 9 a cerca de 11,5, e de cerca de 9,5 a cerca de 11,5 dependendo do método e aplicação específica. As técnicas para controlar o pH nos níveis de uso recomendados incluem o usar de tampões, álcalis, ácidos, etc., e são bem conhecidos dos versados na técnica.

[00275] As composições de limpeza com baixo pH adequadas possuem tipicamente um pH puro de cerca de 3 a cerca de 5, e são tipicamente isentas de tensoativos que sofrem hidrólise em tal pH do ambiente. Tais tensoativos incluem tensoativos de alquil sulfato de sódio que compreendem pelo menos uma porção de óxido de etileno ou mesmo de cerca de 1 a cerca de 16 mols de óxido de etileno. Tais composições de limpeza compreendem tipicamente uma quantidade suficiente de um modificador de pH, como, por exemplo, hidróxido de sódio, monoetanolamina, ou ácido hidrocloreto, para dar a esta composição de limpeza um pH puro de cerca de 3 a cerca de 5. Tais composições compreendem, tipicamente, pelo menos uma enzima estável em relação a ácidos. Em um aspecto, a composição são líquidas, enquanto em outros aspectos, elas são sólidas. O pH destas composições líquidas é, tipicamente, medido como pH puro. O pH destas composições sólidas é medido como uma solução de sólidos a 10% da dita composição sendo que o solvente é água destilada. Nestes aspec-

tos, todas as medições de pH são tomadas a 20°C, exceto onde indicado em contrário.

[00276] Em um aspecto, quando a(s) variante(s) de protease da invenção é/são empregada(s) em uma composição granular ou líquida, é desejável que a variante de protease esteja sob a forma de uma partícula encapsulada para proteger a variante de protease de outros componentes da composição granular durante o armazenamento. Além disso, a encapsulação também é uma forma de controlar a disponibilidade da variante de protease durante o processo de limpeza. Em um aspecto, a encapsulação intensifica o desempenho da(s) variante(s) de protease e/ou enzimas adicionais. Nesse sentido, as variantes de protease da presente invenção são encapsuladas com qualquer material de encapsulação adequado conhecido na técnica. Em um aspecto, o material de encapsulação encapsula, tipicamente, pelo menos parte do catalisador para a(s) variante(s) de protease da invenção. Tipicamente, o material de encapsulação é solúvel em água e/ou dispersível em água. Em um aspecto, o material de encapsulação tem uma temperatura de transição vítrea (tg) de 0°C ou mais. A temperatura de transição vítrea é descrita em mais detalhes no documento WO 97/11151. O material de encapsulação é tipicamente selecionado a partir de carboidratos, gomas naturais ou sintéticas, quitina, quitosano, celulose e derivados de celulose, silicatos, fosfatos, boratos, álcool polivinílico, polietileno glicol, ceras de parafina, e combinações dos mesmos. Quando o material de encapsulação é um carboidrato, ele é selecionado, tipicamente, a partir de monossacarídeos, oligossacarídeos, polissacarídeos, e combinações dos mesmos. Em alguns aspectos típicos, o material de encapsulação é um amido (vide, por exemplo, EP 0 922 499; patentes US n°s 4.977.252, 5.354.559 e 5.935.826). Em um aspecto, o material de encapsulação é uma microesfera produzida a partir de plástico como, por exemplo, termoplásticos, acrilonitrila, me-

tacrilonitrila, poliacrilonitrila, polimetacrilonitrila e misturas dos mesmos; microesferas comercialmente disponíveis que podem ser usadas incluem, mas não se limitam àquelas fornecidas pela EXPANCEL® (Stockviksverken, Suécia), e PM 6545, PM 6550, PM 7220, PM 7228, EXTENDOSPHERES®, LUXSIL®, Q-CEL®, e SPHERICEL® (PQ Corp., Valley Forge, PA).

[00277] Conforme descrito na presente invenção, as variantes de protease da invenção encontram uso específico em métodos e aplicações de limpeza, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições detergentes para limpeza, lavanderia, lavagem de louças à mão, e lavagem de louças automática. Estas aplicações colocam as enzimas sob vários estresses ambientais. As variantes de protease da invenção fornecem vantagens em relação a muitas enzimas usadas atualmente nestas aplicações para limpeza devido à sua atividade proteolítica e estabilidade sob várias condições.

[00278] Há uma variedade de condições de lavagem, por exemplo, formulações detergentes, volumes de água de lavagem, temperaturas da água de lavagem, e duração do tempo de lavagem diferentes, às quais as proteases envolvidas na lavagem são expostas. Além disso, as formulações detergentes usadas em diferentes áreas geográficas possuem diferentes concentrações de seus componentes relevantes presentes na água de lavagem. Por exemplo, os detergentes europeus possuem tipicamente cerca de 4500 a 5000 partes por milhão (ppm) de componentes detergentes na água de lavagem, enquanto que detergentes japoneses possuem tipicamente aproximadamente 667 ppm de componentes detergentes na água de lavagem. Na América do Norte, particularmente nos Estados Unidos, os detergentes possuem tipicamente cerca de 975 ppm de componentes detergentes presentes na água de lavagem.

[00279] Um sistema com baixa concentração de detergente inclui

detergentes nos quais menos que cerca de 800 ppm dos componentes detergentes estão presentes na água de lavagem. Os detergentes japoneses são tipicamente considerados como um sistema com baixa concentração de detergente uma vez que eles possuem aproximadamente 667 ppm de componentes detergentes presentes na água de lavagem.

[00280] Uma concentração de detergente média inclui detergentes nos quais entre cerca de 800 ppm e cerca 2000 ppm dos componentes detergentes estão presentes na água de lavagem. Os detergentes norte-americanos são geralmente considerados como sistemas de média concentração de detergente uma vez que eles possuem aproximadamente 975 ppm de componentes detergentes presentes na água de lavagem. O Brasil tem, tipicamente, aproximadamente, 1500 ppm de componentes detergentes presentes na água de lavagem.

[00281] Um sistema de alta concentração de detergente inclui detergentes nos quais mais de cerca 2000 ppm dos componentes detergentes estão presentes na água de lavagem. Os detergentes europeus são geralmente considerados como sistemas de alta concentração de detergente uma vez que eles possuem aproximadamente 4500 a 5000 ppm de componentes detergentes na água de lavagem.

[00282] Os detergentes latino americanos são geralmente detergentes com builder à base de fosfato que produzem muita espuma e a faixa de detergentes usada na América Latina pode estar tanto nas concentrações médias de detergente quanto altas, uma vez que eles variam de 1500 ppm a 6000 ppm de componentes detergentes na água de lavagem. Conforme mencionado acima, o Brasil tem, tipicamente, aproximadamente, 1500 ppm de componentes detergentes presentes na água de lavagem. Entretanto, outras regiões com detergentes com builder à base de fosfato que produzem muita espuma, não se limitando a outros países latino americanos, podem ter sistemas com alta

concentração de detergente de até cerca de 6000 ppm de componentes detergentes presentes na água de lavagem.

[00283] Em vista do exposto, é evidente que as concentrações de composições detergentes nas soluções de lavagem típicas ao redor do mundo variam de menos que cerca de 800 ppm de composição detergente ("regiões com baixa concentração de detergente"), por exemplo, cerca de 667 ppm no Japão, a entre cerca de 800 ppm a cerca de 2000 ppm ("regiões com concentração de detergente média"), por exemplo, cerca de 975 ppm nos EUA e cerca de 1500 ppm no Brasil, até mais que cerca de 2000 ppm ("regiões com alta concentração de detergente"), por exemplo, cerca de 4500 ppm a cerca de 5000 ppm na Europa e cerca de 6000 ppm em regiões com builder à base de fosfato que produzem muita espuma.

[00284] As concentrações das soluções de lavagem típicas são determinadas empiricamente. Por exemplo, nos EUA, uma máquina de lavar típica retém um volume de cerca de 64,4 L de solução de lavagem. Consequentemente, de modo a obter uma concentração de cerca de 975 ppm de detergente na solução de lavagem, cerca de 62,79 g de composição detergente precisam ser adicionados a 64,4 L da solução de lavagem. Esta quantidade é a quantidade típica medida na água de lavagem pelo consumidor que usa o copo de medida fornecido com o detergente.

[00285] Como um exemplo adicional, diferentes regiões usam diferentes temperaturas de lavagem. A temperatura da água de lavagem no Japão é tipicamente menor que a usada na Europa. Por exemplo, a temperatura da água de lavagem na América do Norte e no Japão está tipicamente entre cerca de 10 e cerca de 30°C (por exemplo, cerca de 20°C), enquanto que a temperatura da água de lavagem na Europa está tipicamente entre cerca de 30 e cerca de 60°C (por exemplo, cerca de 40°C). Entretanto, de modo a economizar energia, muitos con-

sumidores estão trocando e usando de água fria na lavagem. Além disso, em algumas outras regiões, a água fria é tipicamente usada para lavar roupa e em aplicações de lavagem de louças. Em um aspecto, a "lavagem em água fria" da presente invenção usa lavagem a temperaturas de cerca de 4°C a cerca de 10°C, de cerca de 10°C a cerca de 40°C, ou de cerca de 20°C a cerca de 30°C, de cerca de 15°C a cerca de 25°C, de cerca de 10°C a cerca de 20°C, de cerca de 14°C a cerca de 18°C, assim como todas as outras combinações dentro da faixa de cerca de 15°C a cerca de 35°C, e todas as faixas dentro de 10°C a 40°C, e cerca de 16°C.

[00286] Como um exemplo adicional, diferentes regiões possuem tipicamente dureza da água diferente. A dureza da água é geralmente expressa em grãos por galão de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ misturados. A dureza é uma medida da quantidade de cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}) na água. A maior parte da água nos Estados Unidos é dura, mas o grau de dureza varia. Água moderadamente dura (60 a 120 ppm) a dura (121 a 181 ppm) tem 60 a 181 partes por milhão (partes por milhão convertido para grãos por galão americano é n° de ppm dividido por 17,1 que é igual a grãos por galão) de minerais de dureza.

Água	Grãos por galão	Partes por milhão
Mole	menos de 1,0	menos de 17
Levemente dura	1,0 a 3,5	17 a 60
Moderadamente dura	3,5 a 7,0	60 a 120
Dura	7,0 a 10,5	120 a 180
Muito dura	mais de 10,5	mais de 180

[00287] A dureza da água europeia é tipicamente mais que cerca de 10,5 (por exemplo, cerca de 10,5 a cerca de 20,0) grãos por galão de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mistos (por exemplo, cerca de 15 grãos por galão de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mistos). A dureza da água norte-americana é tipicamente maior que a dureza da água japonesa, mas menor que a dureza da água europeia. Por exemplo, a dureza da água norte-americana pode

estar entre cerca de 3 a cerca de 10 grãos, cerca de 3 a cerca de 8 grãos ou cerca de 6 grãos. A dureza da água japonesa é tipicamente menor que a dureza da água norte-americana, geralmente menor que cerca de 4, por exemplo cerca de 3 grãos por galão de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mistos.

[00288] Consequentemente, em um aspecto, a invenção fornece variantes de protease que mostram surpreendente desempenho de lavagem em pelo menos um conjunto de condições de lavagem (por exemplo, temperatura da água, dureza da água, e/ou concentração de detergente). Em um aspecto, as variantes de protease da invenção são comparáveis em desempenho de lavagem a outras proteases subtilisina. Em um aspecto, as variantes de protease da presente invenção possuem desempenho de lavagem intensificado em comparação às proteases subtilisina atualmente disponíveis para comercialização. Desta forma, em um aspecto da invenção, as variantes de protease aqui fornecidas exibem estabilidade oxidativa intensificada, estabilidade térmica otimizada, capacidades de limpeza intensificadas sob várias condições, e/ou estabilidade quelante intensificada. Além disso, as variantes de protease da invenção podem ser usadas em composições de limpeza que não incluem detergentes, novamente sozinhas ou em combinação com builders e estabilizantes.

[00289] Em um aspecto, a invenção fornece uma composição de limpeza que compreende pelo menos uma variante de protease da presente invenção que está presente em uma quantidade de cerca de 0,00001% a cerca de 10%, em peso, da composição com o restante (por exemplo, cerca de 99,999% a cerca de 90,0%) compreendendo um ou mais materiais auxiliares de limpeza com base no peso da composição. Em outro aspecto, a invenção fornece uma composição de limpeza que compreende pelo menos uma variante de protease da invenção que está presente a um nível de cerca de 0,0001% a cerca

de 10%, cerca de 0,001% a cerca de 5%, cerca de 0,001% a cerca de 2%, ou cerca de 0,005% a cerca de 0,5%, em peso da composição com o equilíbrio da composição de limpeza (por exemplo, cerca de 99,9999% a cerca de 90,0%, cerca de 99,999% a cerca de 98%, cerca de 99,995% a cerca de 99,5%, em peso) compreendendo um ou mais materiais auxiliares de limpeza.

[00290] Em um aspecto, uma composição de limpeza da invenção compreende, além da pelo menos uma variante de protease da invenção, uma ou mais enzimas adicionais, que proporcionam benefícios de desempenho de limpeza e/ou cuidado de tecidos e/ou lavagem de louças manual ou à mão e/ou lavagem de louças automática. Exemplos de enzimas adequadas incluem, mas não se limitam, por exemplo, a hemicelulases, celulases, peroxidases, proteases, xilanases, lipases, fosfolipases, esterases, peridrolases, cutinases, pectinases, pectato liases, mananases, queratinases, redutases, oxidases, fenoloxidases, lipoxigenases, ligninases, pululanases, tanases, pentosanas, malanases, β -glucanases, arabinosidases, hialuronidase, condroitinase, lacase, e/ou amilases, enzimas metaloprotease neutra (abreviadas como "nprE"), ou misturas de qualquer uma das mesmas. Em um aspecto, a composição de limpeza compreende, além da pelo menos uma variante de protease da invenção, uma combinação de enzimas adicionais (isto é, um "coquetel") que compreende enzimas aplicáveis convencionais como, por exemplo, pelo menos uma protease, lipase, cutinase, celulase, e/ou amilase adicional.

[00291] Além das variantes de protease aqui fornecidas, qualquer outra protease adequada pode ser usada e incluída em uma composição da invenção. Em um aspecto, a invenção fornece uma composição (por exemplo, composição de limpeza) que compreende pelo menos uma variante de protease da invenção e pelo menos uma protease adicional. As proteases adequadas incluem as de origem animal,

vegetal, ou microbiana. Em um aspecto, uma protease microbiana pode estar incluída. Um mutante quimicamente ou geneticamente modificado de uma protease pode estar incluído. Em um aspecto, a pelo menos uma protease adicional é uma serina protease, de preferência, uma protease microbiana alcalina ou uma protease semelhante à tripsina. Exemplos de proteases alcalinas incluem subtilisinas, especialmente as derivadas de *Bacillus* (por exemplo, subtilisina, subtilisina de *B. lentus* (isto é, GG36), subtilisina de *B. amyloliquefaciens* (isto é, BPN'), subtilisina Carlsberg, subtilisina 309, subtilisina 147, PB92, e subtilisina 168). Exemplos adicionais incluem as proteases mutantes (isto é, variantes de protease) descritas nas patentes U.S. N° RE 34.606, 5.955.340, 5.700.676, 6.312.936, e 6.482.628, que estão aqui incorporadas a título de referência. As proteases adicionais incluem, mas não se limitam a, tripsina (por exemplo, de origem suína ou bovina), e a protease de *Fusarium* descrita em WO 89/06270. Uma composição da invenção que compreende pelo menos uma variante de protease da invenção pode, também, compreender pelo menos uma enzima protease disponível para comercialização. As enzimas protease disponíveis para comercialização que podem ser usadas nas composições da invenção incluem, mas não se limitam, por exemplo, a MAXATASE®, MAXACAL™, MAXAPEM™, OPTICLEAN®, OPTIMASE®, PROPERASE®, PURAFECT®, PURAFECT® OXP, PURAMAX™, EXCELLASE™, e PURAFAST™ (Genencor); ALCALASE®, SAVINASE®, PRIMASE®, DURAZYM™, POLARZYME®, OVOZYME®, KANNASE®, LIQUANASE®, NEUTRASE®, RELASE® e ESPERASE® (Novozymes); A subtilisina KAP de *Bacillus alkalophilus* com A230V+S256G+S259N (Kao); e protease BLAP™ de *B. lentus*, BLAP X, e BLAP S (Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien, Dusseldorf, Alemanha). Proteases adicionais que podem estar incluídas nas composições da invenção incluem as descritas nos documentos

WO95/23221, WO 92/21760, publicação de patente US n° 2008/0090747, e patentes US n°s 5.801.039, 5.340.735, 5.500.364, 5.855.625, RE 34.606, 5.955.340, 5.700.676, 6.312.936, e 6.482.628, e várias outras patentes. Metaloproteases podem estar incluídas nas composições da invenção. Tais metaloproteases, incluem, mas não se limitam, por exemplo, à enzima metaloprotease neutra (nprE) descrita em WO 07/044993.

[00292] Em um aspecto, a invenção fornece uma composição (por exemplo, composição de limpeza) que compreende pelo menos uma variante de protease da invenção e pelo menos uma lipase. As lipases adequadas incluem, mas não se limitam, por exemplo, àquelas de origem bacteriana ou fúngica. Um mutante quimicamente ou geneticamente modificado de uma lipase pode estar incluído na composição. Exemplos de lipases úteis incluem lipase de *Humicola lanuginosa* (vide, por exemplo, EP 258 068, e EP 305 216), lipase de *Rhizomucor miehei* (vide, por exemplo, EP 238 023), lipase de *Candida*, como, por exemplo, lipase de *C. antarctica* (por exemplo, lipase A ou B de *C. antarctica*; vide, por exemplo, EP 214 761), lipases de *Pseudomonas* como, por exemplo, lipase de *P. alcaligenes* e lipase de *P. pseudoalcaligenes* (vide, por exemplo, EP 218 272), lipase de *P. cepacia* (vide, por exemplo, EP 331 376), lipase de *P. stutzeri* (vide, por exemplo, GB 1,372,034), lipase de *P. fluorescens*, lipase de *Bacillus* (por exemplo, lipase de *B. subtilis* (Dartois et al., Biochem. Biophys. Acta 1131:253-260 (1993)); lipase de *B. stearothermophilus* (vide, por exemplo, JP 64/744992); e lipase de *B. pumilus* (vide, por exemplo, WO 91/16422)).

[00293] Além disso, inúmeras lipases clonadas podem ser usadas nas composições (por exemplo, composições de limpeza) da presente invenção, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, à lipase de *Penicillium camembertii* (Yamaguchi et al., Gene 103:61-67 (1991)), lipase de *Geotricum candidum* (Schimada et al., J. Biochem. 106:383-

388 (1989)), e várias lipases de *Rhizopus* como, por exemplo, lipase de *R. delemar* (Hass et al., Gene 109:117-113 (1991)), uma lipase de *R. niveus* (Kugimiya et al., Biosci. Biotech. Biochem. 56:716-719 (1992)) e lipase de *R. oryzae*.

[00294] Outros tipos de enzimas lipolíticas, como, por exemplo, cutinases, também podem ser usadas em um aspecto da presente invenção, e incluem, mas não se limitam, por exemplo, à cutinase derivada de *Pseudomonas mendocina* (vide WO 88/09367), e a cutinase derivada de *Fusarium solani pisi* (vide WO 90/09446).

[00295] Lipases adequadas adicionais incluem lipases comercialmente disponíveis como, por exemplo, M1 LIPASE™, LUMA FAST™, e LIPOMAX™ (Genencor); LIPOLEASE® e LIPOLEASE® ULTRA (Novozymes); e LIPASE P™ "Amano" (Amano Pharmaceutical Co. Ltd., Japão).

[00296] Em um aspecto, a invenção fornece composições (por exemplo, composições de limpeza) que compreendem pelo menos uma variante de protease da invenção e pelo menos uma lipase que está presente em uma quantidade de cerca de 0,00001% a cerca de 10% de lipase adicional em peso da composição e o restante com um ou mais materiais auxiliares de limpeza, em peso da composição. Em um aspecto, uma composição de limpeza da presente invenção compreende, além da pelo menos uma variante de protease da invenção, pelo menos uma lipase em uma quantidade de cerca de 0,0001% a cerca de 10%, cerca de 0,001% a cerca de 5%, cerca de 0,001% a cerca de 2%, ou cerca de 0,005% a cerca de 0,5% de lipase em peso da composição.

[00297] Também está incluída uma composição (por exemplo, composição de limpeza) que compreende pelo menos uma variante da invenção e pelo menos uma amilase. Qualquer amilase (por exemplo, alfa e/ou beta) adequada para uso em soluções alcalinas pode ser útil

para ser incluída em tal composição. As amilases adequadas incluem, mas não se limitam, por exemplo, àquelas de origem bacteriana ou fúngica. Um mutante quimicamente ou geneticamente modificado de uma amilase pode estar incluído. As amilases que podem ser usadas nas composições da invenção, incluem, mas não se limitam, por exemplo, às α -amilases obtidas a partir de *B. licheniformis* (vide, por exemplo, GB 1.296.839). As amilases disponíveis para comercialização que podem ser usadas nas composições da invenção incluem, mas não se limitam, por exemplo, a DURAMYL®, TERMAMYL®, FUNGAMYL®, STAINZYME®, STAINZYME PLUS®, STAINZYME ULTRA®, e BAN™ (Novozymes), assim como POWERASE™, RAPIDASE® e MAXAMYL® P (Genencor).

[00298] Em um aspecto, a invenção fornece uma composição de limpeza que compreende pelo menos uma variante de protease ou pelo menos uma amilase, sendo que a amilase está presente em uma quantidade de cerca de 0,00001% a cerca de 10% de amilase adicional em peso da composição e o restante de um ou mais materiais auxiliares de limpeza, em peso da composição. Em outro aspecto, a invenção inclui uma composição de limpeza que compreende pelo menos uma variante de protease e pelo menos uma amilase que está presente em uma quantidade de cerca de 0,0001% a cerca de 10%, em relação a 0,001% a cerca de 5%, em relação a 0,001% a cerca de 2%, cerca de 0,005% a cerca de 0,5% de amilase, em peso da composição.

[00299] Qualquer celulase adequada pode ser usada em uma composição de limpeza da presente invenção. Em um aspecto, a invenção fornece uma composição de limpeza que compreende pelo menos uma variante de protease da invenção e uma ou pelo menos uma celulase. As celulasas adequadas incluem, mas não se limitam, por exemplo, àquelas de origem bacteriana ou fúngica. Um mutante química-

mente ou geneticamente modificado de uma celulase pode estar incluído na composição da invenção. As celulases adequadas incluem, mas não se limitam, por exemplo, a celulases de *Humicola insolens* (vide, por exemplo, patente US nº 4.435.307) e celulases que possuem benefícios de tratamento da cor (vide, por exemplo, EP 0 495 257). As celulases adequadas adicionais são conhecidas na técnica. Celulases comercialmente disponíveis que podem ser usadas e podem estar incluídas em uma composição da invenção incluem, mas não se limitam a, por exemplo, CELLUZYME®, CAREZYME® (Novozymes), e KAC-500(B)TM (Kao Corporation), Puradax 7000L, Puradax HA 4000G (Genencor). Em um aspecto, as Celulases são incorporado como porções ou fragmentos de celulases maduras selvagens ou variantes, sendo que uma porção da terminação N é deletada (vide, por exemplo, patente US nº 5.874.276). Em um aspecto, uma composição de limpeza da invenção compreende pelo menos uma variante de protease da invenção e pelo menos uma celulase em uma quantidade de cerca de 0,00001% a cerca de 10% de celulase adicional, em peso da composição e o restante de um ou mais materiais auxiliares de limpeza, em peso da composição. Em outro aspecto, a invenção fornece uma composição de limpeza que compreende pelo menos uma variante de protease da invenção e pelo menos uma celulase em uma quantidade de cerca de 0,0001% a cerca de 10%, cerca de 0,001% a cerca de 5%, cerca de 0,001% a cerca de 2%, cerca de 0,005% a cerca de 0,5% de celulase, em peso da composição.

[00300] Qualquer mananase adequada para uso nas composições detergentes também pode ser usada e, desta forma, pode estar incluída em uma composição de limpeza da invenção. Em um aspecto, a invenção fornece uma composição de limpeza que compreende pelo menos uma variante de protease da invenção e pelo menos uma mananase. As mananases adequadas incluem, mas não se limitam, por

exemplo, àquelas de origem bacteriana ou fúngica. Um mutante quimicamente ou geneticamente modificado de uma mananase pode estar incluído na composição da invenção. Várias mananases úteis e que podem estar incluídas em uma composição de invenção são conhecidas (vide, por exemplo, as mananases descritas nas patentes U.S. N° 6.566.114, 6.602.842, e 6.440.991, que estão aqui incorporadas a título de referência). Em um aspecto, a invenção fornece uma composição de limpeza que compreende pelo menos uma variante de protease da invenção e pelo menos uma mananase em uma quantidade de cerca de 0,00001% a cerca de 10% de mananase adicional, em peso da composição, e o restante de um ou mais materiais auxiliares de limpeza, em peso da composição. Em algumas destas composições de limpeza, cada mananase está presente em uma quantidade de cerca de 0,0001% a cerca de 10%, cerca de 0,001% a cerca de 5%, cerca de 0,001% a cerca de 2%, ou cerca de 0,005% a cerca de 0,5% de mananase em peso da composição.

[00301] Uma peroxidase pode ser usada em combinação com peróxido de hidrogênio ou uma fonte do mesmo (por exemplo, um percarbonato, perborato ou percarbonato) em uma composição da invenção. Uma oxidase pode ser usada em combinação com oxigênio em uma composição da invenção. Ambos os tipos de enzimas são usadas para o "alveijamento em solução" (isto é, para evitar a transferência de um corante têxtil de um tecido tingido para outro tecido quando os tecidos são lavados juntos em um líquido de lavagem), de preferência, junto com um agente acentuador (vide, por exemplo, WO 94/12621 e WO 95/01426). As peroxidases/oxidases adequadas que podem estar incluídas nas composições da invenção incluem, mas não se limitam, por exemplo, àquelas de origem vegetal, bacteriana ou fúngica. Um mutante quimicamente ou geneticamente

modificado de uma peroxidase ou oxidase pode estar incluído na composição da invenção. Em um aspecto, a invenção fornece uma composição de limpeza que compreende pelo menos uma variante de protease da invenção e pelo menos uma peroxidase e/ou pelo menos uma enzima oxidase. Cada peroxidase ou oxidase pode estar presente na composição em uma quantidade de cerca de 0,00001% a cerca de 10% de peroxidase ou oxidase em peso da composição e o restante de um ou mais materiais auxiliares de limpeza, em peso da composição. Em outro aspecto, a invenção fornece uma composição de limpeza que compreende pelo menos uma variante de protease da invenção e pelo menos uma peroxidase e/ou pelo menos uma enzima oxidase, sendo que cada peroxidase ou oxidase está presente em uma quantidade de cerca de 0,0001% a cerca de 10%, cerca de 0,001% a cerca de 5%, cerca de 0,001% a cerca de 2%, ou cerca de 0,005% a cerca de 0,5% de enzima peroxidase ou oxidase, respectivamente, em peso da composição.

[00302] Em um aspecto, a invenção fornece uma composição (por exemplo, composição de limpeza) que compreende pelo menos uma variante de protease da invenção e uma ou mais enzimas adicionais podem ser usadas, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a uma ou mais peridrolases (vide, por exemplo, WO 05/056782).

[00303] Em outro aspecto, a invenção fornece uma composição (por exemplo, composição de limpeza) que compreende pelo menos uma variante de protease da invenção e uma ou mais misturas das enzimas acima mencionadas, como, por exemplo, uma ou mais proteases, amilases, lipases, mananases, e/ou celulasas adicionais. De fato, contempla-se que várias misturas destas enzimas poderão ser usadas nas composições da presente invenção. Também é contemplado que as diferentes quantidades da(s) variante(s) de protease e uma ou mais enzimas adicionais podem, ambas, variar

independentemente na faixa de cerca de 10%, o restante da composição de limpeza sendo composto de um ou mais materiais auxiliares de limpeza. A seleção específica de um material auxiliar de limpeza é facilmente feita considerando a superfície ou item (por exemplo, item de louças, utensílios de mesa, ou tecidos) ou tecido a ser limpo, e a forma desejada da composição para as condições de limpeza durante o uso (por exemplo, através do uso de detergente para lavagem de louças manual ou automática).

[00304] Em um aspecto, a invenção fornece uma composição (por exemplo, composição de limpeza) que compreende pelo menos uma variante de protease da invenção (e, opcionalmente, pelo menos uma enzima adicional, se desejado) e um ou mais materiais auxiliares de limpeza. Exemplos de materiais auxiliares de limpeza adequados incluem, mas não se limitam, por exemplo, a tensoativos, builders, alvejantes, ativadores de alvejamento, catalisadores de alvejamento, outras enzimas, sistemas estabilizantes de enzimas, quelantes, alvejantes ópticos, polímeros para liberação de sujeiras, agentes para transferência de corantes, agentes inibidores de transferência de corantes, materiais catalíticos, peróxido de hidrogênio, fontes de peróxido de hidrogênio, perácidos pré-formados, agentes poliméricos dispersantes, agentes de remoção de sujeira de argila, agentes elastificantes de estrutura, dispersantes, supressores de espuma, corantes, perfumes, corantes, sais de carga, hidrótropos, perfume, cápsula de perfume, fotoativadores, fluorescedores, condicionadores de tecido, amaciantes de tecido, veículos, hidrótropos, elementos auxiliares ao processamento, solventes, pigmentos, tensoativos hidrolisáveis, conservantes, antioxidantes, agentes anti-encolhimento, agentes anti-amarrotamento, germicidas, fungicidas, pontos de cor, agentes para tratamento de prata, anti-embaciamento e/ou anti-corrosão, fontes de alcalinidade, agentes solubilizantes, veículos,

elementos auxiliares ao processamento, pigmentos, e agentes de controle de pH (vide, por exemplo, as patentes US n°s 6.610.642, 6.605.458, 5.705.464, 5.710.115, 5.698.504, 5.695.679, 5.686.014 e 5.646.101, que estão aqui incorporadas a título de referência). Os aspectos dos materiais específicos da composição de limpeza são exemplificados em detalhes abaixo. Conforme observado acima, se um material auxiliar de limpeza não for compatível com uma variante de protease da presente invenção incluída em uma composição de limpeza desejada, então, usa-se um método adequado para manter o(s) material(is) auxiliar(es) de limpeza e a(s) variante(s) de protease separados (isto é, não entrando em contato com um com o outro) até a combinação dos componentes ser apropriada. Tais métodos de separação incluem qualquer método adequado conhecido na técnica (por exemplo, cápsulas de gel, encapsulação, tabletes, separação física, etc.).

[00305] Em um aspecto, uma composição (por exemplo, composição de limpeza) da invenção compreende uma quantidade eficaz de pelo menos uma variante de protease da invenção que é útil ou eficaz para limpar uma superfície que precisa de remoção de mancha proteinácea. Tais composições de limpeza incluem composições de limpeza para aplicações como limpeza de superfícies duras, lavanderia, tecidos, pratos, utensílios de mesa, ou louças (por exemplo, por lavagem manual de pratos ou à mão ou lavagem de louças automática). De fato, em um aspecto, a presente invenção apresenta composições para limpeza de tecido, enquanto que em outro aspecto, a invenção fornece composições para limpeza de produtos que não são tecidos. Especialmente, a invenção também fornece composições de limpeza que compreende pelo menos uma variante de protease da invenção, sendo que tais composições de limpeza são adequadas para cuidados pessoais, incluindo cuidados

com a cavidade oral (incluindo dentífricos, pastas dentais, enxaguatórios bucais, etc., assim como composições para limpeza de dentaduras), adequadas para limpar a pele e o cabelo e adequadas para limpar óculos. A presente invenção é destinada a abranger composições detergentes sob qualquer forma (isto é, líquida, granular, barra, sólida, semissólida, géis, emulsões, tabletes, cápsulas, etc.).

[00306] À título de exemplo, várias composições de limpeza nas quais as variantes de protease da invenção podem ser usadas são descritas com mais detalhes abaixo. Em um aspecto no qual as composições de limpeza da invenção são formuladas como composições adequadas para uso em método(s) de lavagem em máquina de lavar roupas, a composição da invenção contém, de preferência, pelo menos um tensoativo e pelo menos um composto de builder, assim como um ou mais materiais auxiliares de limpeza, incluindo, por exemplo, um ou mais materiais auxiliares de limpeza selecionados a partir do grupo de compostos poliméricos orgânicos, agentes alvejantes, enzimas adicionais, supressores de espuma, dispersantes, dispersantes de sabão de cálcio, agentes de suspensão de sujeira e anti-redeposição, e inibidores de corrosão. Em um aspecto, as composições de lavanderia também contém um ou mais agentes amaciantes (isto é, como materiais auxiliares de limpeza adicionais). Exemplos de composições e formulações para limpeza de roupas ou tecidos adicionais às quais uma ou mais variantes de protease da invenção podem ser adicionadas são apresentados nos exemplos abaixo.

[00307] As composições da invenção também podem ser usadas como produtos aditivos detergentes sob a forma sólida ou líquida. Tais produtos aditivos são destinados a suplementar e/ou reforçar o desempenho de composições detergentes convencionais e podem ser adicionados em qualquer estágio do processo de limpeza. Em um

aspecto, a densidade da composição detergente para lavagem de roupas varia de cerca de 400 a cerca de 1200 g/litro, enquanto que em outros aspectos, ela varia de cerca de 500 a cerca de 950 g/litro da composição medida a 20°C.

[00308] Em um aspecto, a invenção fornece composições de limpeza, como, por exemplo, as descritas na patente U.S. nº 6.605.458, compreendendo pelo menos uma variante de protease da invenção. Em um aspecto, a composição que compreende pelo menos uma variante de protease da invenção é uma composição para limpeza de tecido granular compacta, enquanto que, em outros aspectos, a composição é uma composição para limpeza de tecidos granular útil para lavar tecidos coloridos; em outro aspecto, a composição é uma composição para limpeza de tecidos granular que fornece amaciamento através da capacidade de lavagem. Em outro aspecto, a composição é uma composição para limpeza de tecidos líquida para tarefas pesadas. Em outro aspecto, a invenção fornece uma composição que compreende pelo menos uma variante de protease da invenção, sendo que a composição é uma composição para limpeza de tecidos, como, por exemplo, a descrita nas patentes U.S. Nº 6.610.642 e 6.376.450. Também são fornecidas composições detergentes granulares para lavagem de roupas que possuem utilidade particular sob as condições de lavagem europeias ou japonesas (vide, por exemplo, patente US nº 6.610.642) que compreendem pelo menos uma variante de protease da invenção.

[00309] Em um aspecto, a invenção fornece composições para limpeza de superfícies duras compreendendo pelo menos uma variante de protease aqui fornecida. Algumas destas composições compreendem composições para limpeza de superfícies duras como, por exemplo, aquelas descritas nas patentes U.S. Nº 6.610.642, 6.376.450, e 6.376.450 que incluem pelo menos uma desta variante de

protease.

[00310] A invenção inclui composições detergentes para lavagem de louças à mão ou para lavagem de louças automática compreendendo pelo menos uma variante de protease aqui fornecida. Algumas destas composições compreendem composições para limpeza de superfícies duras, como, por exemplo, aquelas descritas nas patentes U.S. N° 6.610.642 e 6.376.450.

[00311] Em um aspecto, a invenção fornece composições de limpeza para uso em métodos para lavagem de louças à mão ou manual ou para lavagem de louças automática que compreendem pelo menos uma variante de protease da invenção e/ou pelo menos um tensoativo e/ou pelo menos um material auxiliar de limpeza adicional selecionado a partir do grupo de compostos poliméricos orgânicos, agentes acentuadores de espuma, íons de metais do grupo II, solventes, hidrótropos, e enzimas adicionais.

[00312] Em um aspecto no qual as composições de limpeza da invenção são formuladas como composições adequadas para uso em método(s) para lavagem de louças automática em máquina, a composição da invenção contém, tipicamente, pelo menos um tensoativo e/ou pelo menos um composto de builder e podem conter um ou mais materiais auxiliares de limpeza selecionados, de preferência, a partir de compostos poliméricos orgânicos, agentes alvejantes, enzimas adicionais, supressores de espuma, dispersantes, dispersantes de sabão de cálcio, agentes de suspensão de sujeira e anti-redeposição e inibidores de corrosão. Exemplos de composições e formulações para lavagem de louças adicionais às quais uma ou mais variantes de protease da invenção podem ser adicionadas são apresentados nos exemplos abaixo.

[00313] Em outro aspecto, a invenção fornece composições para cuidados da cavidade oral compreendendo pelo menos uma variante

de protease da presente invenção, as quais são úteis para cuidado da cavidade oral (por exemplo, limpeza de dentes e dentaduras); componentes de composições para cuidados da cavidade oral que podem ser úteis e estão incluídos em tais composições incluem os descritos na patente U.S. N° 6.376.450. As composições da invenção podem compreender, adicionalmente, materiais auxiliares de limpeza e os compostos descritos nas patentes US n°s 6.376.450, 6.605.458, e 6.610.642, que estão aqui incorporadas por referência.

[00314] As composições de limpeza da invenção são formuladas em qualquer forma adequada e são preparadas por qualquer processo escolhido pelo formulador, exemplos não limitadores destes são descritos nas patentes US n°s 5.879.584, 5.691.297, 5.574.005, 5.569.645, 5.565.422, 5.516.448, 5.489.392, e 5.486.303, que estão aqui incorporadas à título de referência. Quando uma composição de limpeza com baixo pH é desejada, o pH desta composição é ajustado através da adição de um material como, por exemplo, monoetanolamina ou um material ácido como, por exemplo, cloreto de hidrogênio (HCl).

[00315] Embora não seja essencial para os propósitos da presente invenção, a listagem não limitadora de compostos auxiliares ilustrada posteriormente é adequada ao uso nas presentes composições de limpeza. Em um aspecto, estes compostos auxiliares são incorporados, por exemplo, para auxiliar ou aumentar o desempenho de limpeza para o tratamento do substrato a ser limpo ou até modificar a estética da composição de limpeza como é o caso com perfumes, corantes, tingimentos ou similares. Entende-se que tais compostos auxiliares estão em adição às variantes de protease da presente invenção. A natureza exata destes componentes adicionais, e níveis de incorporação dos mesmos, dependerão da forma física da composição e da natureza da operação de limpeza a qual os mesmos serão usados. Os mate-

riais auxiliares adequados incluem, mas não se limitam a, tensoativos, builders, agentes quelantes, agentes inibidores de transferência de corantes, auxiliares de deposição, dispersantes, enzimas adicionais, e estabilizantes de enzimas, materiais catalíticos, ativadores de alveijamento, reforçadores de alveijamento, peróxido de hidrogênio, fontes de peróxido de hidrogênio, perácidos pré-formados, agentes poliméricos dispersantes, agentes para remoção de sujeira de argila/anti-redeposição, alvejantes, supressores de espuma, corantes, perfumes, agentes elastificantes de estrutura, amaciantes de tecido, veículos, hidrótipos, elementos auxiliares ao processamento e/ou pigmentos. Além da descrição abaixo, exemplos adequados destes outros compostos auxiliares e quantidades de uso são encontrados na patente US nº 5.576.282, 6.306.812, e 6.326.348, aqui incorporada por referência. Os ingredientes auxiliares supracitados podem constituir o restante das composições de limpeza da presente invenção.

[00316] Em um aspecto, as composições de limpeza da invenção compreendem pelo menos um tensoativo e/ou um sistema tensoativo, sendo que o tensoativo é selecionado a partir de tensoativos não iônicos, tensoativos aniônicos, tensoativos catiônicos, tensoativos anfóteros, tensoativos zwitteriônicos, tensoativos não iônicos semipolares e misturas dos mesmos. Em alguns aspectos da composição de limpeza com baixo pH (por exemplo, composições que possuem um pH puro de cerca de 3 a cerca de 5), a composição tipicamente não contém sulfato etoxilado de alquila, já que se acredita que tal tensoativo pode ser hidrolisado por tais composições em conteúdos ácidos. Em um aspecto, o tensoativo está presente em uma quantidade de cerca de 0,1% a cerca de 60%, enquanto que em aspectos alternativos, a quantidade é de cerca de 1% a cerca de 50%, enquanto que em aspectos ainda adicionais, o nível é de cerca de 5% a cerca de 40%, em peso da composição para limpeza.

[00317] Em um aspecto, as composições de limpeza da invenção compreendem um ou mais builders detergentes ou sistemas builder. Em algumas destas composições que incorporam pelo menos um builder, as composições de limpeza compreendem pelo menos cerca de 1%, de cerca de 3% a cerca de 60% ou mesmo de cerca de 5% a cerca de 40% de builder, com base no peso da composição para limpeza. Os builders incluem, mas não se limitam, por exemplo, sais de metal alcalino, amônio e alcanolamônio de polifosfatos, silicatos de metal alcalino, carbonatos de metais alcalino-terrosos e alcalinos, aluminossilicatos, compostos de policarboxilato, éter hidróxi policarboxilatos, copolímeros de anidrido maleico com etileno ou éter vinil metílico, ácido 1,3,5-triidróxi benzeno-2,4,6-trissulfônico e ácido carboximetiloxi succínico, os diversos sais de metal alcalino, amônio e amônio substituído de ácidos poliacéticos como ácido etilenodiamino tetraacético e ácido nitrilotriacético, bem como policarboxilatos como ácido melítico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido oxidissuccínico, ácido polimaleico, ácido benzeno 1,3,5-tricarboxílico, ácido carboximetiloxi succínico, e seus sais solúveis. Contempla-se que qualquer builder adequado poderá ser usado em várias composições da invenção.

[00318] Em algumas destas composições, os builders formam complexos iônicos de dureza solúveis em água (por exemplo, builders sequestrantes), como, por exemplo, citratos e polifosfatos (por exemplo, tripolifosfato de sódio e tripolifosfato de sódio hexaidratado, tripolifosfato de potássio, e tripolifosfato de sódio e potássio misto, etc.). Contempla-se que qualquer builder adequado poderá ser usado na presente invenção, inclusive aqueles conhecidos na técnica (vide, por exemplo, EP 2 100 949).

[00319] Algumas composições de limpeza da invenção compreendem pelo menos um agente quelante em adição a pelo menos uma variante de protease. Os agentes quelantes adequados incluem, mas

não se limitam, por exemplo, a agentes quelante de cobre, ferro, e/ou manganês e misturas dos mesmos. Em aspectos nos quais pelo menos um agente quelante é usado, as composições de limpeza da presente invenção compreendem de cerca de 0,1% a cerca de 15% ou mesmo de cerca de 3% a cerca de 10% de agente quelante, com base no peso da presente composição de limpeza.

[00320] Algumas composições de limpeza aqui fornecidas compreendem pelo menos um auxiliar de deposição em adição a pelo menos uma variante de protease. Os auxiliares de deposição adequados incluem, mas não se limitam, por exemplo, a polietileno glicol, polipropileno glicol, policarboxilato, polímeros para liberação de sujeiras como, por exemplo, ácido politereftálico, argilas como, por exemplo, caulinita, montmorilonita, atapulgita, illita, bentonita, haloisita, e misturas dos mesmos.

[00321] Conforme indicado na presente invenção, em um aspecto, os agentes anti-redeposição podem ser usados em um aspecto da presente invenção,. Em um aspecto, tensoativos não iônicos podem ser usados. Estes tensoativos não iônicos também podem ser usados para prevenir a redeposição de sujeiras. Em um aspecto, o agente anti-redeposição é um tensoativo não iônico, conforme conhecido na técnica (vide, por exemplo, EP 2 100 949).

[00322] Em um aspecto, as composições de limpeza da presente invenção incluem um ou mais agentes inibidores de transferência de corantes. Os agentes inibidores de transferência de corantes poliméricos adequados incluem, mas não se limitam a, polímeros de polivinil pirrolidona, polímeros de N-óxido de poliamina, copolímeros de N-vinil pirrolidona e N-vinil imidazol, poliviniloxazolidonas e polivinilimidazóis ou misturas dos mesmos. Em aspectos nos quais pelo menos um agente inibidor da transferência de corantes é usado, as composições de limpeza da presente invenção compreendem de cerca de 0,0001%

a cerca de 10%, de cerca de 0,01% a cerca de 5%, ou mesmo de cerca de 0,1% a cerca de 3%, em peso da composição de limpeza.

[00323] Em um aspecto, silicatos são incluídos nas composições da presente invenção. Em alguns aspectos, os silicatos de sódio (por exemplo, dissilicato de sódio, metassilicato de sódio, e filossilicatos cristalinos) podem ser usados. Em um aspecto, os silicatos estão presentes em uma quantidade de cerca de 1% a cerca de 20%. Em um aspecto, os silicatos estão presentes em uma quantidade de cerca de 5% a cerca de 15%, em peso da composição.

[00324] Em um aspecto, as composições de limpeza da invenção também compreendem dispersantes. Os materiais orgânicos solúveis em água adequados incluem, mas não se limitam, por exemplo, aos ácidos homo ou copolímeros ou seus sais, nos quais o ácido policarboxílico compreende pelo menos dois radicais carboxila separados um do outro por não mais que dois átomos de carbono.

[00325] Em um aspecto, as enzimas (por exemplo, variantes de protease da invenção ou outras enzimas adicionais) usadas nas composições de limpeza são estabilizadas por qualquer técnica adequada. Em um aspecto, as enzimas empregadas aqui podem ser estabilizadas pela presença de fontes solúveis em água de íons de cálcio e/ou magnésio nas composições finais que fornecem tais íons às enzimas. Em um aspecto, os estabilizantes de enzimas incluem oligossacarídeos, polissacarídeos, e sais metálicos divalentes inorgânicos, incluindo metais alcalino-terrosos, como, por exemplo, sais de cálcio. Contempla-se que várias técnicas para a estabilização de enzimas poderá ser usada na presente invenção. Por exemplo, em um aspecto, as enzimas empregadas na presente invenção são estabilizadas pela presença de fontes solúveis em água de íons zinco (II), cálcio (II) e/ou magnésio (II) nas composições finalizadas que fornecem tais íons às enzimas, assim como outros íons metálicos (por exemplo, bário (II), escândio (II), ferro

(II), manganês (II), alumínio (III), estanho (II), cobalto (II), cobre (II), níquel (II), e oxovanádio (IV). Cloretos e sulfatos também podem ser usados em um aspecto da presente invenção,. Exemplos de oligossacarídeos e polissacarídeos adequados (por exemplo, dextrinas) são conhecidos na técnica (vide, por exemplo, WO 07/145964). Em um aspecto, inibidores reversíveis de protease também podem ser usados, como, por exemplo, compostos contendo boro (por exemplo, borato, ácido fenil borônico, ácido 4-formil fenil borônico, outros derivados de ácido fenil borônico, inibidores de peptídeo, e similares) e/ou um aldeído tripeptídico pode ser usado nas composições da invenção para melhorar ainda mais a estabilidade, como desejado.

[00326] Em um aspecto, um ou mais alvejantes, ativadores de alveamento, e/ou catalisadores de alveamento são incluídos nas composições da invenção. Em um aspecto, as composições de limpeza da invenção compreendem composto(s) de alveamento inorgânico(s) e/ou orgânico(s). Os alvejantes inorgânicos incluem, mas não se limitam a, sais de peridrato (por exemplo, sais de perborato, percarbonato, perfosfato, persulfato, e persilicato). Em um aspecto, os sais de peridrato inorgânico são sais de metais alcalinos. Em um aspecto, os sais de peridrato inorgânico são incluídos como o sólido cristalino, sem proteção adicional, embora em alguns outros aspectos, o sal seja revestido. Qualquer sal adequado conhecido na técnica pode ser usado nas composições da invenção (vide, por exemplo, EP 2 100 949).

[00327] Em um aspecto, ativadores de alveamento são usados nas composições da invenção. Os ativadores de alveamento são tipicamente precursores de perácidos orgânicos que aumentam a ação de alveamento durante o curso da limpeza a temperaturas de 60°C e abaixo. Os ativadores de alveamento adequados ao uso na presente

invenção incluem compostos que, sob as condições de peridrólise, dão ácidos peroxicarboxílicos alifáticos que possuem, de preferência, de cerca de 1 a cerca de 10 átomos de carbono, em particular, de cerca de 2 a cerca de 4 átomos de carbono, e/ou ácido perbenzóico opcionalmente substituído. Ativadores de alvejamento adicionais são conhecidos na técnica e podem ser usados na composição da invenção (vide, por exemplo, EP 2 100 949).

[00328] Em um aspecto e conforme descrito adicionalmente aqui, as composições de limpeza da invenção compreendem adicionalmente pelo menos um catalisador de alvejamento. Em um aspecto, os complexos de triazaciclononano de manganês e complexos relacionados podem ser usados, assim como complexos de cobalto, cobre, manganês, e ferro. Catalisadores de alvejamento adicionais podem ser usados na presente invenção (vide, por exemplo, patentes US n°s 4.246.612, 5.227.084, e 4.810.410; WO 99/06521; e EP 2 100 949).

[00329] Em um aspecto, as composições de limpeza da invenção compreendem um ou mais complexos de metal catalítico. Em um aspecto, um catalisador de alvejamento contendo metal pode ser usado. Em alguns aspectos, o catalisador de alvejamento metálico compreende um sistema catalisador que compreende um cátion de metal de transição de atividade catalítica alvejante definida (por exemplo, cobre, ferro, titânio, rutênio, tungstênio, molibdênio, ou cátions de manganês), um cátion de metal auxiliar que tem pouca ou nenhuma atividade catalítica alvejante (por exemplo, cátions de zinco ou alumínio), e um sequestrado que tem constantes de estabilidade definidas para os cátions de metal catalíticos e auxiliares, particularmente ácido etilenodiaminotetracético, ácido etileno diamino tetra(metileno fosfônico), e sais solúveis em água dessas substâncias (vide, por exemplo, patente US n° 4.430.243). Em um aspecto, as

composições de limpeza da invenção são catalisadas através de um composto de manganês. Tais compostos e teores de uso são bem conhecidos na técnica (vide, por exemplo, patente US 5.576.282). Em aspectos adicionais, catalisadores de alvejamento à base de cobalto podem ser usados e estão incluídos nas composições de limpeza da invenção. Vários catalisadores de alvejamento à base de cobalto são conhecidos na técnica (vide, por exemplo, patentes US nº 5.597.936 e 5.595.967) e são facilmente preparados por procedimentos conhecidos.

[00330] Em um aspecto, as composições de limpeza da invenção incluem um complexo de metais de transição de um ligante macropolicíclico rígido (MRL). Como uma questão prática, mas sem que isto constitua uma limitação, em um aspecto, a composição e processos de limpeza fornecidos pela invenção são ajustados para fornecer na ordem de pelo menos uma parte por cem milhões da espécie ativa de MRL no meio aquoso para lavagem e, em um aspecto, e tipicamente fornece de cerca de 0,005 ppm a cerca de 25 ppm, de cerca de 0,05 ppm a cerca de 10 ppm, ou mesmo de cerca de 0,1 ppm a cerca de 5 ppm de MRL no líquido de lavagem.

[00331] Em um aspecto, os metais de transição no presente catalisador de alvejamento à base de metal de transição incluem, mas não se limitam, por exemplo, a manganês, ferro e cromo. Os MRLs preferenciais incluem, também, mas não se limitam, por exemplo, a ligantes ultra-rígidos especiais que possuem ligação cruzada (por exemplo, 5,12-dietil-1,5,8,12-tetraazabicyclo(6.6.2)hexadecano). Os MRLs à base de metal de transição adequados são facilmente preparados por procedimentos conhecidos (vide, por exemplo, WO 2000/32601 e patente US nº 6.225.464).

[00332] Em um aspecto, a invenção fornece uma composição detergente para lavagem de louças automática formulada como um

tablete detergente. Tal tablete compreende pelo menos uma variante de protease da invenção e um builder, como, por exemplo, um builder salino. Alguns destes tabletes possuem uma alcalinidade pelo menos equivalente a 3 gramas (g) de hidróxido de sódio por 100 gramas da composição em tabletes e uma densidade de pelo menos 1,4 gramas/centímetro cúbico. O builder salino pode compreender uma mistura de um sal de silicato e um sal de fosfato, de preferência, com mais silicato (por exemplo, metassilicato de sódio) do que fosfato (por exemplo, tripolifosfato de sódio). Alguns destes tabletes são isentos de materiais tensoativos e são especialmente adaptados para uso em máquinas para lavagem de louças automática.

[00333] Em um aspecto, as composições de limpeza da presente invenção compreendem agentes para tratamento de metais. Os agentes para tratamento de metais são úteis para evitar e/ou reduzir as manchas, corrosão, e/ou oxidação dos metais, incluindo alumínio, aço inoxidável, e metais não ferrosos (por exemplo, prata e cobre). Os agentes para tratamento de metais adequados incluem os descritos nos documentos EP 2 100 949, WO 9426860, e WO 94/26859). Em algumas composições de limpeza, o agente para tratamento de metais é um sal de zinco. Algumas destas composições de limpeza compreendem de cerca de 0,1% a cerca de 5%, em peso de um ou mais agentes para tratamento de metais.

[00334] Conforme indicado acima, as composições de limpeza da presente invenção são formuladas em qualquer forma adequada e são preparadas por qualquer processo escolhido pelo formulador, exemplos não limitadores destes são descritos nas patentes US n°s 5.879.584, 5.691.297, 5.574.005, 5.569.645, 5.516.448, 5.489.392, e 5.486.303, que estão aqui incorporadas a título de referência. Em um aspecto no qual uma composição de limpeza com baixo pH é desejada, o pH desta composição é ajustado através da adição de um

material ácido como, por exemplo, cloreto de hidrogênio (HCl).

[00335] As composições de limpeza aqui apresentadas podem ser usadas para limpar um local (por exemplo, uma superfície, louças, utensílios de mesa, ou tecido). Tipicamente, pelo menos uma porção do local é colocada em contato com a presente composição de limpeza da invenção em sua forma pura ou diluída em um líquido de lavagem, e, então, o local é opcionalmente lavado e/ou enxaguado. Para os propósitos da presente invenção, "lavagem" inclui, mas não se limita a, por exemplo, esfregamento e agitação mecânica. Em um aspecto, as composições de limpeza são empregadas em concentrações de cerca de 500 ppm a cerca de 15.000 ppm em solução. Quando o solvente de lavagem é água, a temperatura da água situa-se, tipicamente, na faixa de cerca de 5°C a cerca de 90°C e quando o local compreende um tecido, a razão em massa entre a água e o tecido é tipicamente de cerca de 1:1 a cerca de 30:1.

Processos para fazer e usar as composições

[00336] As composições da invenção aqui descritas, incluindo, por exemplo, composições de limpeza, podem ser formuladas em qualquer forma adequada e podem ser preparadas por qualquer processo adequado escolhido pelo formulador (vide, por exemplo, Patentes US n°s 5.879.584, 5.691.297, 5.574.005, 5.569.645, 5.565.422, 5.516.448, 5.489.392, 5.486.303, 4.515.705, 4.537.706, 4.515.707, 4.550.862, 4.561.998, 4.597.898, 4.968.451, 5.565.145, 5.929.022, 6.294.514 e 6.376.445).

[00337] Em um aspecto, as composições de limpeza da invenção são fornecidas em forma de dose unitária, incluindo tabletes, cápsulas, sachês, sacos e sacos de múltiplos compartimentos. Em um aspecto, o formato de dose unitária é destinado a proporcionar liberação controlada dos ingredientes dentro de um saco de múltiplos compartimentos (ou outro formato de dose unitária). Os formatos de dose unitária e li-

beração controlada adequados são conhecidos na técnica (vide, por exemplo, EP 2 100 949, WO 02/102955, patentes US nºs 4.765.916 e 4.972.017, e WO 04/111178 para materiais adequados para uso em formatos de dose unitária e liberação controlada). Em um aspecto, a forma de dose unitária é fornecida por tabletes envoltos por um filme solúvel em água ou sacos solúveis em água. Vários formatos para doses unitárias são fornecidos em EP 2 100 947, e são conhecidos na técnica.

[00338] Aspectos adicionais da invenção com relação aos processos de fazer e usar as composições da invenção são descritos em outro local no presente documento.

Métodos da invenção

[00339] A invenção fornece métodos para limpar ou lavar um item ou superfície (por exemplo, superfície dura) que precisa ser limpa, que incluem, mas não se limitam, por exemplo, a métodos para limpar ou lavar uma louça, utensílio de mesa, um tecido, um item de lavanderia, item de cuidados pessoais, óculos, etc., ou similares, e métodos para limpar ou lavar uma superfície dura ou macia, como, por exemplo, uma superfície dura de um item.

[00340] Em um aspecto, a invenção fornece um método para limpar um item, objeto, ou superfície que precisa de limpeza, o método compreendendo colocar o item ou superfície (ou uma porção do item ou superfície que se deseja limpar) em contato com uma variante de protease da invenção ou uma composição da invenção por um tempo suficiente e/ou sob condições adequadas ou eficazes para limpar o item, objeto, ou superfície até um grau desejado. Alguns destes métodos compreendem adicionalmente o enxágue do item, objeto ou superfície com água. Para alguns destes métodos, a composição de limpeza é uma composição detergente para lavar louças e o item ou objeto a ser limpo é uma louça ou utensílio de mesa. Uma louça é um item geral-

mente usado para servir alimentos ou comer. Uma louça pode ser, mas não se limita, por exemplo, a uma bandeja, placa, copo, vasilha, etc., e similares. O termo "utensílios de mesa" é mais amplo e inclui, mas não se limita, por exemplo, pratos, talheres, facas, garfos, colheres, copos, jarros, vasilhas para servir molhos, vasilhames para bebidas, etc., e similares; um utensílio de mesa inclui qualquer um destes itens ou similares para servir comida ou comer. Para tais métodos, a composição de limpeza é uma composição detergente para lavagem de louças automática ou uma composição detergente para lavagem de louças à mão e o item ou objeto a ser limpo é uma louça ou um utensílio de mesa. Para alguns destes métodos, a composição de limpeza é uma composição detergente para lavagem de roupas, como, por exemplo, uma composição detergente em pó para lavagem de roupas ou uma composição detergente líquida para lavagem de roupas, e o item a ser limpo é um item de tecido.

[00341] Em um aspecto, a invenção fornece métodos para limpar ou lavar um item de tecido que, opcionalmente, precisa ser limpo ou lavado, respectivamente. Alguns destes métodos compreendem fornecer uma composição que compreende a variante de protease (como, por exemplo, mas não se limitando a um composição para limpeza de tecido ou de lavanderia) e um item de tecido ou item de lavanderia que precisa ser limpo e colocar o item de tecido ou de lavanderia (ou uma porção do item que se deseja limpar) em contato com a composição sob condições suficientes ou eficazes para limpar ou lavar o tecido ou item de lavanderia até um grau desejado.

[00342] Em um aspecto, a invenção fornece um método para limpar ou lavar um item ou superfície (por exemplo, uma superfície dura) que precisa, opcionalmente, ser limpa, o método compreendendo fornecer um item ou uma superfície a ser limpa ou lavada e colocar o item ou superfície (ou uma porção do item ou superfície que se deseja limpar

ou lavar) em contato com pelo menos uma variante de protease da invenção ou uma composição da invenção compreendendo pelo menos uma tal variante de protease por um tempo suficiente e/ou sob condições suficientes ou eficazes para limpar ou lavar o item ou superfície até um grau desejado. Tais composições incluem, mas não se limitam, por exemplo, a uma composição de limpeza ou composição detergente da invenção (incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a uma composição detergente para lavagem de louças à mão, composição de limpeza para lavagem de louças à mão, detergente para lavagem de roupas ou detergente para tecidos ou composição para limpeza de tecidos ou para lavar roupas, detergente líquido para lavagem de roupas, composição de limpeza líquida para lavar roupas, composição detergente em pó para lavagem de roupas, composição de limpeza em pó para lavar roupas, composição detergente para lavagem de louças automática, composição detergente ou de limpeza para reforçar a lavagem de roupas, aditivo para limpeza e lavagem de roupas e pré-removedor de manchas para uso em lavanderia, etc.). Em alguns casos, se desejado, o método pode ser repetido uma ou mais vezes, particularmente se limpeza ou lavagem adicional for desejada. Por exemplo, em alguns casos, o método compreende, adicionalmente, opcionalmente, deixar o item ou superfície em contato com a pelo menos uma variante de protease ou composição durante um período de tempo suficiente ou eficaz para limpar ou lavar o item ou superfície até o grau desejado. Alguns destes métodos compreendem adicionalmente o enxágue do item ou superfície com água. Alguns destes métodos compreendem adicionalmente colocar o item ou superfície novamente em contato com pelo menos uma variante de protease da invenção ou uma composição da invenção e deixar o item ou superfície permanecer em contato com a pelo menos uma variante de protease ou composição durante um período de tempo suficiente

para limpar ou lavar o item ou superfície até um grau desejado. Para alguns destes métodos, a composição de limpeza é uma composição detergente para lavar louças e o item a ser limpo é uma louça ou utensílio de mesa. Para tais métodos, a composição de limpeza é uma composição detergente para lavagem de louças automática ou uma composição detergente para lavagem de louças à mão e o item a ser limpo é uma louça ou um utensílio de mesa. Para alguns destes métodos, a composição de limpeza é uma composição detergente para lavar roupas e o item a ser limpo é um item de tecido.

[00343] Em um aspecto, a invenção fornece um método para limpar utensílios de mesa ou louças em uma máquina de lavar louças automática, o método compreendendo fornecer uma máquina de lavar louças automática, colocar uma quantidade de uma composição para lavagem de louças automática que compreende pelo menos uma variante de protease da invenção ou uma composição da invenção suficiente para limpar os utensílios de mesa ou louças na máquina (por exemplo, por colocar a composição em um compartimento ou dispensador para detergente adequado ou fornecido na máquina), colocar as louças ou utensílios de mesa na máquina, e ligar a máquina de modo a limpar os utensílios de mesa ou louças (por exemplo, de acordo com as instruções do fabricante).t Tal método pode incluir qualquer composição para lavagem de louças automática aqui descrita, que compreende, mas não se limita, por exemplo, a qualquer variante de protease aqui descrita. A quantidade de composição para lavagem de louças automática a ser usada pode ser facilmente determinada de acordo com as instruções ou sugestões do fabricante e qualquer forma de composição para lavagem de louças automática que compreende pelo menos uma variante de protease da invenção (por exemplo, forma líquida, em pó, sólida, gel, tablete, etc.), incluindo qualquer uma aqui descrita, pode ser empregada.

[00344] Em um aspecto, a invenção fornece um método para limpeza de uma superfície, item ou objeto que precisa opcionalmente de limpeza, o método compreendendo colocar o item ou superfície (ou uma porção do item ou superfície que se deseja limpar) em contato com pelo menos uma variante de protease da invenção ou uma composição de limpeza da invenção em sua forma pura ou diluída em um líquido de lavagem por um tempo suficiente e/ou sob condições suficientes ou eficazes para limpar ou lavar o item ou superfície até um grau desejado. A superfície, item, ou objeto pode, então, ser (opcionalmente) lavada e/ou enxaguada, se desejado. Para os propósitos da presente invenção, "lavagem" inclui, mas não se limita a, por exemplo, esfregamento e agitação mecânica. Em um aspecto, as composições de limpeza são empregadas em concentrações de cerca de 500 ppm a cerca de 15.000 ppm em solução (por exemplo, solução aquosa). Quando o solvente de lavagem é água, a temperatura da água situa-se, tipicamente, na faixa de cerca de 5°C a cerca de 90°C e quando o local compreende um tecido, a razão em massa entre a água e o tecido é tipicamente de cerca de 1:1 a cerca de 30:1.

[00345] Em um aspecto, a invenção fornece um método para limpar roupas ou um item de tecido em uma máquina de lavar, o método compreendendo fornecer uma máquina de lavar, colocar uma quantidade de uma composição detergente para lavagem de roupas que compreende pelo menos uma variante de protease da invenção suficiente para limpar a roupa ou item de tecido na máquina (por exemplo, colocando composição em um compartimento ou dispensador para detergente adequado ou fornecido na máquina), colocar as roupas ou item de tecido na máquina, e ligar a máquina de modo a limpar as roupas ou item de tecido (por exemplo, de acordo com as instruções do fabricante). Tal método pode incluir qualquer composição detergente para lavagem de roupas aqui descrita, que

compreende, mas não se limita, por exemplo, a qualquer variante de protease aqui descrita. A quantidade de composição detergente para lavagem de roupas a ser usada pode ser facilmente determinada de acordo com as instruções ou sugestões do fabricante e qualquer forma de composição detergente para lavagem de roupas que compreende pelo menos uma variante de protease da invenção (por exemplo, na forma sólida, em pó, líquida, tablete, gel etc.), incluindo qualquer uma aqui descrita, pode ser empregada.

[00346] Em um décimo-oitavo aspecto, a invenção apresenta um método para limpar um item, objeto, ou superfície que precisa de limpeza, o método compreendendo colocar o item, objeto, ou superfície em contato com (i) uma variante (ou polipeptídeo tal como no terceiro aspecto) do primeiro, segundo, terceiro, quarto, quinto, sexto, sétimo, oitavo, ou nono aspectos da invenção ou (ii) uma composição do décimo-sétimo aspecto da invenção. Um método do décimo-oitavo aspecto da invenção pode compreender, adicionalmente, enxaguar o item, objeto, ou superfície com água.

[00347] Em um décimo-nono aspecto, a invenção apresenta um método para limpar um item ou superfície dura, o método compreendendo colocar pelo menos uma porção do item ou superfície dura a ser limpa em contato com (i) uma variante (ou polipeptídeo tal como no terceiro aspecto) do primeiro, segundo, terceiro, quarto, quinto, sexto, sétimo, oitavo, ou nono aspectos da invenção ou (ii) uma composição do décimo-sétimo aspecto da invenção por um tempo suficiente e/ou sob condições suficientes ou eficazes para limpar ou lavar o item ou superfície dura até um grau desejado, e compreendendo, opcionalmente, enxaguar o item ou superfície dura com água.

[00348] Em um vigésimo aspecto, a invenção apresenta um método de tratar e/ou limpar uma superfície ou tecido compreendendo as

etapas de, opcionalmente, lavar e/ou enxaguar a dita superfície ou tecido, colocar a dita superfície ou tecido em contato com (i) uma variante (ou polipeptídeo tal como no terceiro aspecto) do primeiro, segundo, terceiro, quarto, quinto, sexto, sétimo, oitavo, ou nono aspectos da invenção ou (ii) uma composição do décimo-sétimo aspecto da invenção, e, então, opcionalmente lavar e/ou enxaguar a dita superfície ou tecido.

[00349] Está incluído o uso de uma variante de protease ou polipeptídeo da invenção em uma composição detergente, inclusive, mas sem limitação, em uma composição detergente para lavar roupas e/ou louças.

[00350] Exemplos de métodos de limpeza adicionais são fornecidos no presente documento e nos exemplos abaixo.

Experimental

[00351] Na descrição experimental dos exemplos da parte I e dos exemplos da parte I a seguir, as seguintes abreviações são aplicáveis: PI (índice de desempenho), ppm (partes por milhão); M (molar); mM (milimolar); μ M (micromolar); nM (nanomolar); mol (mols); mmol (mili-mols); μ mol (micromols); nmol (nanomols); gm (gramas); mg (miligramas); μ g (microgramas); pg (picogramas); L (litros); ml e mL (mililitros); μ l e μ L (microlitros); cm (centímetros); mm (milímetros); μ m (micrômetros); nm (nanômetros); U (unidades); V (volts); MW (peso molecular); seg (segundos); min(s) (minuto/minutos); h(s) e hr(s) (hora/horas); °C (graus centígrados); QS (quantidade suficiente); ND (não feito); rpm (revoluções por minuto); GH (grau de dureza Alemão); H₂O (água); dH₂O (água deionizada); HCl (ácido hidrolórico); aa (aminoácido); bp (pares de bases); kb (pares de quilobases); kD (quilodaltons); cDNA (DNA complementar ou cópia); DNA (ácido desoxirribonucleico); ssDNA (DNA de fita simples); dsDNA (DNA dupla-fita); dNTP (trifosfato de desoxirribonucleotídeo); RNA (ácido ribonucleico); MgCl₂ (cloreto de

magnésio); NaCl (cloreto de sódio); p/v (peso/volume); v/v (volume/volume); p/p (peso/peso); *g* (gravidade); OD (densidade óptica); ppm (partes por milhão); solução de Dulbecco' tamponada com fosfato (DPBS); SOC (2% de Bacto-triptona, 0,5% de extrato Bacto-levedura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl); caldo Terrific (TB; 12 g/l de Bacto-triptona, 24 g/l de glicerol, 2,31 g/l de KH₂PO₄, e 12,54 g/l de K₂HPO₄); OD₂₈₀ (densidade óptica a 280 nm); OD₆₀₀ (densidade óptica a 600 nm); A₄₀₅ (absorbância a 405 nm); V_{max} (a velocidade inicial máxima de uma reação catalisada por enzima); PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida); PBS (solução salina tamponada com fosfato [150 mM de NaCl, 10 mM de tampão de fosfato de sódio, pH 7.2]); PBST (PBS+0,25% de TWEEN®-20); PEG (polietileno glicol); PCR (reação em cadeia da polimerase); RT-PCR (PCR por transcrição reversa); SDS (dodecil sulfato de sódio); Tris (tris(hidróximetil)aminometano); HEPES (N-[2-hidróxietil]piperazina-N-[ácido 2-etanossulfônico]); HBS (solução salina tamponada com HEPES); Tris-HCl (cloridrato de tris[hidróximetil]aminometano); Tricine (N-[tris-(hidróximetil)-metil]-glicina); CHES (ácido 2-(N-ciclo-hexilamino) etanossulfônico); TAPS (ácido 3-[[tris-(hidróximetil)-metil]-amino]-propanossulfônico); CAPS (ácido 3-(ciclo-hexilamino)-propanossulfônico); DMSO (sulfóxido de dimetila); DTT (1,4-dítio-DL-treitol); SA (ácido sinapínico (ácido 5,5-dimetóxi-4-hidróxi cinâmico)); TCA (ácido tricloroacético); Glut e GSH (glutathiona reduzida); GSSG (glutathiona oxidada); TCEP (Tris[2-carbóxietil] fosfina); Ci (Curies); mCi (miliCuries); µCi (microCuries); HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência); RP-HPLC (cromatografia líquida de alta pressão de fase reversa); TLC (cromatografia de camada fina); MALDI-TOF (ionização/dessorção a laser assistida por matriz--tempo de voo); Ts (tosila); Bn (benzila); Ph (fenila); Ms (mesila); Et (etila), Me (metila); *Taq* (DNA polimerase de *Thermus aquaticus*); Klenow (fragmento grande I de DNA polimerase (Klenow)); EGTA (áci-

do etileno glicol-bis(éter β -aminoetílico)N,N,N',N'-tetraacético); EDTA (ácido etilenodiaminotetracético); bla (β -lactamase ou gene de resistência à ampicilina); HDL (líquido para tarefas pesadas); HDD (detergente em pó para tarefas pesadas); HSG (detergente granular produtor de muita espuma); CEE (Europa Central e Oriental); WE (Europa Ocidental); NA, quando usado com relação a detergentes (América do Norte); Japão e JPN, quando usado com relação a detergentes (Japão); MTP (placa de microtitulação); MJ Research (MJ Research, Reno, NV); Baseclear (Baseclear BV, Inc., Leiden, Holanda); PerSeptive (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA); ThermoFinnigan (ThermoFinnigan, San Jose, CA, E.U.A.); Argo (Argo BioAnalytica, Morris Plains, NJ, E.U.A.); Seitz EKS (SeitzSchenk Filtersystems GmbH, Bad Kreuznach, Alemanha); Pall (Pall Corp., East Hills, NY, EUA e Bad Kreuznach, Alemanha); Spectrum (Spectrum Laboratories, Dominguez Rancho, CA); Molecular Structure (Molecular Structure Corp., Woodlands, TX< EUA); Accelrys (Accelrys, Inc., San Diego, CA, EUA); Chemical Computing (Chemical Computing Corp., Montreal, Canadá); New Brunswick (New Brunswick Scientific, Co., Edison, NJ, EUA); CFT (Center for Test Materials, Vlaardingen, Holanda); P&G e Procter & Gamble (Procter & Gamble, Inc., Cincinnati, OH, EUA); GE Healthcare (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido); DNA2.0 (DNA2.0, Menlo Park, CA, EUA); OXOID (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido); Megazyme (Megazyme International Ireland Ltd., Bray Business Park, Bray, Co., Wicklow, Irlanda); Finnzymes (Finnzymes Oy, Espoo, Finlândia); Kelco (CP Kelco, Wilmington, DE); Corning (Corning Life Sciences, Corning, NY, EUA); (NEN (NEN Life Science Products, Boston, MA, EUA); Pharma AS (Pharma AS, Oslo, Noruega); Dynal (Dynal, Oslo, Noruega); Bio-Synthesis (Bio-Synthesis, Lewisville, TX, EUA); ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA); Gibco/BRL (Gibco/BRL, Grand Island, NY, EUA); Sigma (Sigma Che-

mical Co., St. Louis, MO); Pharmacia (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA); NCBI (National Center for Biotechnology Information); Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA); BD Biosciences e/ou Clontech (BD Biosciences CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA, EUA); Operon Technologies (Operon Technologies, Inc., Alameda, CA, EUA); MWG Biotech (MWG Biotech, High Point, NC, EUA); Oligos Etc (Oligos Etc. Inc, Wilsonville, OR, EUA); Bachem (Bachem Bioscience, Inc., King of Prussia, PA, EUA); Difco (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA); Mediatech (Mediatech, Herndon, VA, EUA); Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EUA); Oxoid (Oxoid Inc., Ogdensburg, NY, EUA); Worthington (Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ, EUA); GIBCO BRL ou Gibco BRL (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, EUA); Millipore (Millipore, Billerica, MA, EUA); Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA); Invitrogen (Invitrogen Corp., San Diego, CA, EUA); NEB (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA); Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA); Pierce (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA); Takara (Takara Bio Inc. Otsu, Japão); Roche (Hoffmann-La Roche, Basel, Suíça); Gene Oracle (Gene Oracle, Inc., Mountain View, CA, EUA); EM Science (EM Science, Gibbstown, NJ, EUA); Qiagen (Qiagen, Inc., Valencia, CA, EUA); Biodesign (Biodesign Intl., Saco, Maine, EUA); Aptagen (Aptagen, Inc., Herndon, VA, EUA); Sorvall (marca Sorvall da Kendro Laboratory Products, Asheville, NC, EUA); Molecular Devices (Molecular Devices, Corp., Sunnyvale, CA, EUA); R&D Systems (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA); Siegfried Handel (Siegfried Handel AG, Zofingen, Suíça); Stratagene (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, EUA); Marsh (Marsh Biosciences, Rochester, NY, EUA); Geneart (Geneart GmbH, Regensburg, Alemanha); Bio-Tek (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, EUA); (Biacore (Biacore, Inc., Piscataway, NJ, EUA); PeproTech (PeproTech, Rocky Hill, NJ, EUA); SynPep (SynPep, Du-

blin, CA, EUA); New Objective (marca New Objective; Scientific Instrument Services, Inc., Ringoes, NJ, EUA); Waters (Waters, Inc., Milford, MA, EUA); Matrix Science (Matrix Science, Boston, MA, EUA); Dionex (Dionex, Corp., Sunnyvale, CA, EUA); Monsanto (Monsanto Co., St. Louis, MO, EUA); Wintershall (Wintershall AG, Kassel, Alemanha); BASF (BASF Co., Florham Park, NJ, EUA); Huntsman (Huntsman Petrochemical Corp., Salt Lake City, UT, EUA); Shell Chemicals (Shell Chemicals, Inc., Londres, Reino Unido); Stepan (Stepan, Northfield, IL, EUA); Clariant (Clariant, Sulzbach, Alemanha); Industrial Zeolite (Industrial Zeolite Ltd., Grays, Essex, Reino Unido); Jungbunzlauer (Jungbunzlauer, Basel, Suíça); Solvay (Solvay, Bruxelas, Bélgica); 3V Sigma (3V Sigma, Bergamo, Itália); Innospec (Innospec, Ellesmere Port, Reino Unido); Thermphos (Thermphos, Vlissingen-Ost, Holanda); Ciba Specialty (Ciba Specialty Chemicals, Basel, Suíça); Dow Corning (Dow Corning, Barry, Reino Unido); Enichem (Enichem Iberica, Barcelona, Espanha); Fluka Chemie AG (Fluka Chemie AG, Buchs, Suíça); Gist-Brocades (Gist-Brocades, NV, Delft, Holanda); Dow Corning (Dow Corning Corp., Midland, MI, EUA); Mettler-Toledo (Mettler-Toledo Inc, Columbus, OH, EUA); RB (Reckitt-Benckiser, Slough, Reino Unido); e Microsoft (Microsoft, Inc., Redmond, WA, E.U.A.).

[00352] Nas composições detergentes exemplificadas aqui fornecidas, os níveis das enzimas são expressos como enzima pura em peso da composição total e exceto onde especificado em contrário, os ingredientes do detergente são expressos com base no peso das composições totais. As identificações abreviadas dos componentes têm os seguintes significados

Abreviação	Ingrediente
LAS	: C ₁₁₋₁₃ alquil benzeno sulfonato de sódio linear
NaC16-17HSAS	: C ₁₆₋₁₇ alquil sulfato de de sódio altamente solúvel
TAS	: alquil sulfato de sódio de sebo
CxyAS	: C _{1x} - C _{1y} alquil sulfato de sódio
CxyEz	: C _{1x} - C _{1y} álcool primário predominantemente linear condensado com uma média de z mols de óxido de etileno
CxyAEzS	: C _{1x} - C _{1y} alquil sulfato de sódio condensado com uma média de z mols de óxido de etileno. Nome da molécula adicionada nos exemplos.
Não iônico	: Álcool graxo etoxilado/propoxilado misto, por exemplo, Plurafac LF404 sendo um álcool com um grau médio de etoxilação de 3,8 e um grau médio de propoxilação de 4,5.
QAS	: R ₂ .N ⁺ (CH ₃) ₂ (C ₂ H ₄ OH) com R ₂ = C ₁₂ -C ₁₄
Silicato	: Silicato de sódio amorfo (razão SiO ₂ :Na ₂ O = 1,6-3,2:1)
<Metassilicato	: metassilicato de sódio (razão SiO ₂ :Na ₂ O = 1,0)
Zeólito A	: Aluminossilicato hidratado de fórmula Na ₁₂ (AlO ₂ SiO ₂) ₁₂ ·27H ₂ O
SKS-6	: Silicato cristalino em camadas de fórmula δ-Na ₂ Si ₂ O ₅
Sulfato	: Sulfato de sódio anidro
STPP	: Tripolifosfato de sódio
MA/AA	: Copolímero aleatório de acrilato/maleato 4:1, peso molecular médio de cerca de 70.000 a 80.000
AA	: Polímero de poliacrilato de sódio de peso molecular médio (MW) 4.500

Abreviação	Ingrediente
policarboxilato	: copolímero compreendendo uma mistura de monômeros carboxilados como, por exemplo, acrilato, maleato e acrilato de metila com um peso molecular na faixa de entre 2.000 a 80.000 como, por exemplo, Sokolan disponível comercialmente junto à BASF, que é um copolímero de ácido acrílico, peso molecular 4.500
BB1	: sulfonato de 3-(3,4-di-hidr-di-hidroisoquinolínio)propano
BB2	1-(3,4-di-hidr-di-hidroisoquinolínio)-decano-2-sulfato
PB1	: perborato de sódio monoidratado
PB4	: perborato de sódio tetraidratado de fórmula nominal $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
percarbonato	: percarbonato sódio de fórmula nominal $2\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}_2$
TAED	: tetra acetil etileno diamina
NOBS	: sulfonato de nonanoiloxibenzeno sob a forma do sal de sódio
DTPA	: ácido dietileno triamina pentaacético
HEDP	: ácido 1,1-hidroxietano difosfônico
DETPMP	: Dietiltriaminapenta(metileno)fosfonato, comercializado pela Monsanto sob o nome comercial de Dequest 2060
EDDS	: ácido etileno diamina-N,N'-dissuccínico, isômero (S,S) sob a forma de seu sal de sódio
Diamina	: dimetilaminopropilamina; 1,6-hexanodiamina; 1,3-propanodiamina; 2-metil-1,5-pentanodiamine; 1,3-pentanodiamina; 1-metil-diaminopropano
DETBCHD	5, 12- dietil-1,5,8,12-tetraazabicyclo [6,6,2] hexadecano, dicloreto, sal de Mn(II)
PAAC	: sal de cobalto(III) de acetato de penta-amina

Abreviação	Ingrediente
parafina	: óleo de parafina vendido sob o nome comercial de Winog 70 pela Wintershall
sulfonato de parafina	: Um óleo ou cera de parafina na qual alguns dos átomos de hidrogênio foram substituídos por grupos sulfonato
Aldose oxidase	: A enzima oxidase vendida sob o nome comercial de Aldose Oxidase pela Novozymes A/S
Galactose oxidase	: Galactose oxidase da Sigma
nprE	: A forma recombinante da metaloprotease neutra expressa em <i>Bacillus subtilis</i> (vide, por exemplo, WO 07/044993)
PMN	: metaloprotease neutra purificada de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
amilase	: Uma enzima amilolítica adequada, como, por exemplo, as vendidas sob as marcas registradas PURAFECT® Ox descrita em WO 94/18314, WO96/05295 vendida pela Genencor; NATALASE®, TERMAMYL®, FUNGAMYI® e DURAMYL™, todas disponíveis junto à Novozymes A/S.
Lipase	: Uma enzima lipolítica adequada como, por exemplo, aquelas vendidas sob as marcas registradas LIPEX®, LIPOLASE®, LIPOLASE® Ultra pela Novozymes A/S e Lipomax™ pela Gist-Brocades.
Celulase	: Uma enzima celulítica adequada como, por exemplo, aquelas vendidas sob as marcas registradas CAREZYME®, CELLUZYME®, e/ou ENDOLASE® pela Novozymes A/S.

Abreviação	Ingrediente
Pectina liase	: Uma pectina liase adequada, como, por exemplo, as vendidas sob as marcas registradas XPECT®, PECTAWAY® e PECTAWASH® disponíveis junto à Novozymes A/S.
PVP	: Polivinilpirrolidona com um peso molecular médio de 60.000
PVNO	: N-óxido de polivinil piridina, com um peso molecular médio de 50.000
PVPVI	: Copolímero de vinilimidazol e vinilpirrolidona, com um peso molecular médio de 20.000
Alvejante 1	: 4,4'-bis(2-sulfostiril)bifenila dissódica
Antiespumant e de silicone	: Controlador de espuma de polidimetilsiloxano com copolímero de siloxano-oxialquilenos como agente dispersante com uma razão entre o dito controlador de espuma e o dito agente dispersante de 10:1 a 100:1
Supressor de espuma	: 12% de silicone/sílica, 18% de álcool estearílico, 70% de amido na forma granular
SRP 1	: Poli ésteres com terminação anionicamente capeada
PEG X	: Polietileno glicol com um peso molecular x
PVP K60®	: Homopolímero de vinilpirrolidona (peso molecular médio de 160.000)
Jeffamine® ED-2001	: Polietileno glicol capeado da Huntsman
Isachem® AS	: Um sulfato de alquila de álcool ramificado da Enichem
MME PEG (2000)	: Polietileno glicol de éter monometílico (MW 2000) da Fluka Chemie AG
DC3225C	: Supressor de espuma de silicone, mistura de óleo de silicone e sílica da Dow Corning
TEPAE	: Etoxilato de tetraetilenopenta-amina
BTA	: Benzotriazol
Betaina	: $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$

Abreviação	Ingrediente
Açúcar	: D-glicose de grau industrial ou açúcar de grau alimentício
CFAA	: C ₁₂ -C ₁₄ alquil n-metil glicamida
TPKFA	: C ₁₂ -C ₁₄ ácidos graxos de corte completo elevado (topped whole cut fatty acids)
Argila	: Um silicato de alumínio hidratado de fórmula geral Al ₂ O ₃ SiO ₂ ·xH ₂ O. Tipos: Caulinita, montmorilonita, atapulgita, illita, bentonita, haloisita
pH	: Medido como uma solução a 1% em água destilada a 20°C

[00353] Para os detergentes líquidos de lavar roupas para tarefas pesadas (HDL) norte-americanos (NA) e da Europa Ocidental (WE), a inativação por calor das enzimas presentes nos detergentes comercialmente disponíveis é feita por colocar o detergente líquido pré-pesado (em um frasco de vidro) em um banho-maria a 95°C durante 2 horas. O tempo de incubação para a inativação por calor dos detergentes para lavagem automática de pratos (ADW) NA e WE é de 8 horas. Tanto com detergentes não aquecidos quanto os aquecidos são testados dentro de 5 minutos após a dissolução do detergente para determinar precisamente a porcentagem desativada. A atividade enzimática é testada pelo teste AAPF.

[00354] Para testar a atividade enzimática em detergentes inativados por calor, soluções de trabalho dos detergentes são feitas a partir dos estoques inativados por calor. As quantidades adequadas de dureza da água (por exemplo, 6 gpg ou 12 gpg) e tampão são adicionados às soluções detergentes para se adequar às condições desejadas. As soluções são misturadas através de vortexação ou inversão dos frascos. A tabela a seguir fornece informações referentes a alguns dos detergentes comercialmente disponíveis e as condições de teste usadas aqui. Em alguns experimentos, detergentes adicionais

e/ou outros detergentes comercialmente disponíveis podem ser usados nos exemplos a seguir.

Tabela 1.1. Condições de lavagem de roupas e louças							
Região	Forma	Dose	Detergente*	Tampão	gpg	pH	T (°C)
Lavanderia (líquido para tarefas pesadas e granular)							
NA	HDL	0,78 g/l	P&G TIDE® 2X	HEPES a 5 mM	6	8,0	20
WE	HDL	5,0 g/L	Henkel PERSIL™	HEPES a 5 mM	12	8,2	40
WE	HDG	8,0 g/L	P&G ARIEL®	Na ₂ CO ₃ a 2 mM	12	10,5	40
JPN	HDG	0,7 g/L	P&G TIDE®	Na ₂ CO ₃ a 2 mM	6	10,0	20
NA	HDG	1,0 g/L	P&G TIDE®	Na ₂ CO ₃ a 2 mM	6	10,0	20
Lavagem de louças automática							
WE	ADW	3,0 g/L	RB CALGONIT™	Na ₂ CO ₃ a 2 mM	21	10,0	40
NA	ADW	3,0 g/L	P&G CASCADE®	Na ₂ CO ₃ a 2 mM	9	10,0	40

[00355] Em alguns aspectos adicionais, as seguintes soluções podem ser usadas:

Tabela 1-2. Soluções detergentes de trabalho						
Detergente	Temp (C)	Detergente g/L	pH	Tampão	gpg	
TIDE® 2X Frio	16	0,98	8	HEPES a 5 mM	6	
TIDE® 2X Frio	32	0,98	8	HEPES a 5 mM	6	
TIDE® 2X Frio	16	0,98	7	MOPS a 5 mM	6	

[00356] Os exemplos, que se destinam a exemplificar a invenção e não devem, portanto, ser considerados como limitadores da invenção em qualquer forma, também descrevem e detalham os aspectos e modalidades da invenção discutidas acima. Os exemplos anteriormente mencionados e a descrição detalhada são oferecidos à título de ilustração mas sem que isto constitua uma limitação.

Parte I

Tabela de detergentes

[00357] As composições dos detergentes usados nos testes nos exemplos da parte I são mostradas na tabela 1-3. As amostras da proteína variante BPN' foram adicionadas às composições detergentes

conforme descrito no exemplo 1 da parte I para testar as várias propriedades testadas.

[00358] Os seguintes são composições detergentes líquidas para lavagem de roupas adequadas para máquinas de lavar automáticas de carregamento superior (1, 2 & 4) e máquinas de lavar de carregamento frontal (3).

Tabela 1-3. Composição de detergentes usada nos testes para testar as variantes BPN'				
Ingrediente	Composição (%, em peso, da composição)			
	1	2	3	4
C ₁₂₋₁₅ Alquiletóxi(1.8)sulfato	14,7	11,6		16,31
Sulfonato de C _{11,8} alquilbenzeno	4,3	11,6	8,3	7,73
sulfato de C ₁₆₋₁₇ alquila ramificada	1,7	1,29		3,09
C ₁₂₋₁₄ alquil-9-etoxilato	0,9	1,07		1,31
óxido de dimetilamina C ₁₂	0,6	0,64		1,03
Ácido cítrico	3,5	0,65	3	0,66
Ácido graxo C ₁₂₋₁₈	1,5	2,32	3,6	1,52
Borato de sódio (Borax)	2,5	2,46	1,2	2,53
C ₁₂₋₁₄ alquiletóxi-3-sulfato de sódio			2,9	
C ₁₄₋₁₅ alquil-7-etoxilato			4,2	
C ₁₂₋₁₄ alquil-7-etoxilato			1,7	
Formiato de Ca	0,09	0,09		0,09
um composto que tem a seguinte estrutura geral: bis((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n)(CH ₃)-N ⁺ -C _x H _{2x} -N ⁺ -(CH ₃)-bis((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n), sendo que n = de 20 a 30, e x = de 3 a 8, ou variantes sulfatadas ou sulfonatadas dos mesmos			1,2	
Copolímero enxertado aleatório ¹		1,46	0,5	
Polietilenoimina etoxilada ²	1,5	1,29		1,44
Ácido dietilenotriamina penta-acético	0,34	0,64		0,34
Dietileno triamina penta(ácido metileno-fosfônico)			0,3	
Tinopal AMS-GX		0,06		
Tinopal CBS-X	0,2	0,17		0,29
Polímero anfifílico alcoxilado para limpeza de gordura ³	1,28	1	0,4	1,93

Tabela 1-3. Composição de detergentes usada nos testes para testar as variantes BPN'

Etanol	2	1,58	1,6	5,4
Propileno glicol	3,9	3,59	1,3	4,3
Dietileno glicol	1,05	1,54		1,15
Polietileno glicol	0,06	0,04		0,1
Monoetanolamina	3,05	2,41	0,4	1,26
NaOH	2,44	1,8		3,01
Cumenossulfonato de sódio			1	
Formiato de sódio		0,11		0,09
Água, estética (corantes, perfumes) e secundários (enzimas, solventes, estruturantes)	q.s.	q.s.	q.s.	

¹Copolímero enxertado aleatório é um copolímero de óxido de polietileno enxertado e acetato de polivinila que tem uma cadeia principal de óxido de polietileno e múltiplas cadeias laterais de acetato de polivinila. O peso molecular da cadeia principal de óxido de polietileno é cerca de 6000 e a razão entre o peso do óxido de polietileno e o peso do acetato de polivinila é cerca de 40 a 60 e não mais que 1 ponto de enxertia por 50 unidades de óxido de etileno.

²Polietilenoimina (MW = 600) com 20 grupos de etoxilato por -NH.

³O polímero anfifílico alcoxilado para limpeza de gordura é uma polietilenoimina (MW = 600) com 24 grupos de etoxilato por -NH e 16 grupos de propoxilato por -NH

Exemplos da Parte I

Exemplo 1

Testes

[00359] Vários testes foram usados, conforme apresentado abaixo. Quaisquer desvios dos protocolos fornecidos abaixo são indicados nos exemplos subsequentes.

A. Teste de TCA para a determinação do teor de proteína em placas de microtitulação de 96 poços

[00360] Para as BPN' e variantes de BPN' estes teste foi iniciado usando o sobrenadante da cultura bacteriana de *B. subtilis* filtrada das placas de microtitulação cultivadas por 3 a 4 dias a 33 37°C com agitação a 230 a 250 rpm e aeração úmida. Uma nova placa de microtitulação (MTP) de 96 poços de fundo plano foi usada para o teste. Primeiro, 100 µL/poço de HCl 0,25 N foi colocado em cada poço. A seguir, 25 µL do caldo da cultura filtrado foi adicionado. A dispersão de luz/absorbância a 405 nm (usando modo de mistura de 5 seg no leitor de placas) foi, então, determinada de modo a fornecer a leitura "em branco". Para o teste, 100 µL/poço de ácido tricloroacético (TCA) 30% (p/v) foram colocados nas placas e incubados durante 10 minutos à temperatura ambiente. A dispersão de luz/absorbância a 405 nm (usando modo de mistura de 5 seg no leitor de placas) foi, então, determinada. O equipamento usado foi um leitor de placas de microtitulação Biomek FX Robot (Beckman Coulter) e SpectraMAX (tipo 340; Molecular Devices); As MTPs eram da Costar (tipo 9017).

[00361] Os cálculos foram feitos por subtrair o branco (sem TCA) da leitura de teste com TCA para fornecer uma medida relativa do teor de proteína nas amostras. Se desejado, uma curva padrão pode ser criada por calibrar as leituras de TCA com testes de AAPF dos clones com fatores de conversão conhecidos. Entretanto, os resultados de TCA são lineares com relação à concentração de proteína de 250 a 2500 microgramas de proteína por ml (ppm) e podem então ser plotados diretamente contra o desempenho da enzima com o propósito de escolher variantes com bom desempenho. O aumento de turvação/dispersão de luz nas amostras está correlacionado com a quantidade total de proteína precipitável no sobrenadante da cultura.

B. Teste AAPF para protease em placas de microtitulação de 96 poços

[00362] De modo a determinar a atividade da protease das proteases e variantes de protease da presente invenção, mediu-se a

hidrólise de N-succinil-L-alanil-L-alanil-L-prolil-L-fenil-p-nitroanilida (suc-AAPF-pNA). As soluções reagentes usadas foram: 100 mM de Tris/HCl, pH 8,6, contendo 0,005% de TWEEN®-80 (tampão de diluição Tris); 100 mM de tampão Tris, pH 8,6, contendo 10 mM de CaCl_2 e 0,005% de TWEEN®-80 (tampão de Tris/Ca); e 160 mM de suc-AAPF-pNA em DMSO (solução de estoque de suc-AAPF-pNA) (Sigma: S-7388). Para preparar uma solução de trabalho de suc-AAPF-pNA, 1 ml de solução de estoque de suc-AAPF-pNA foi adicionada a 100 ml de tampão de Tris/Ca e misturada bem por pelo menos 10 segundos. O teste foi feito pela adição de 10 μl de solução de protease diluída a cada poço, imediatamente seguida da adição de 190 μl de solução de trabalho de suc-AAPF-pNA a 1 mg/ml. As soluções foram misturadas durante 5 seg., e a alteração de absorbância no modo cinético (25 leituras em 5 minutos) foi lida a 405 nm em um leitor MTP, a 25°C. A atividade da protease foi expressa como AU (atividade = $\Delta\text{OD} \cdot \text{min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$).

C. Teste em pequenas amostras de tecido de SLT

[00363] Pequenas amostras de tecido manchadas com sangue, leite e tinta (SLT) e com diâmetro circular de 5,5 milímetros foram obtidos junto à CFT. Antes de cortar as amostras, o tecido (EMPA 116) foi lavado com água. Uma pequena amostra de tecido foi colocada em cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços não ligante (Corning 3641). Os detergentes usados para os testes incluíram a composição detergente 1, a composição detergente 2, e a composição detergente 4. Os detergentes foram diluídos em água Milli-Q (deionizada) até uma concentração de trabalho de 0,788 g/L. Estes detergentes foram tamponados com HEPES 5 mM pH 8,2 ou pH 7,2, que mediante adição ao detergente, tamponam a pH 8 ou pH 7, respectivamente. Adicionalmente, 6 grãos por galão (gpg) de dureza da água (3:1 Ca:Mg - CaCl_2 : $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) foram adicionados. A

solução detergente foi pré-equilibrada em um banho de água gelada para testes a 16°C (temperatura ambiente durante testes a 32°C) e bombeada para um reservatório circulante (Beckman FX). A seguir, 190 µl da solução detergente desejada foram adicionados a cada poço da MTP contendo as pequenas amostras de tecido. A esta mistura, adicionou-se 10 µl da solução de diluição mestre da enzima diluída, fornecendo uma concentração de enzimas aproximada de 0,4 a 0,5 µg/mL. A diluição mestre foi preparada a partir dos sobrenadantes da cultura a 8 µg/mL, na qual as concentrações de enzima aproximadas dos sobrenadantes da cultura e controles de BPN'-v3 ou BPN'-v36 originais foram determinadas usando o teste AAPF de atividade da protease, baseando a concentração em um padrão de BPN'-v3 ou BPN'-v36 purificado de concentração conhecida. A MTP foi lacrada com fita e colocada na incubadora/agitador iEMS (Thermo/Labsystems) pré-ajustada a 16°C em um recipiente para laticínios ou a 32°C sobre a bancada durante 20 minutos, com agitação a 1400 rpm. Após a incubação sob as condições adequadas, a fita de vedação foi removida de cada placa e 125 µl (150 µl caso a pipetagem seja feita à mão para telas menores) da solução de cada poço foram transferidos para uma nova MTP (Corning 9017). A nova MTP contendo 125 µl a 150 µl de solução/poço foi lida a 600 nm (com modo de mistura de 5 seg no leitor de placa) usando um leitor MTP SpectraMax (tipo 340; Molecular Devices). Os controles em branco contendo uma pequena amostra de tecido e o detergente, mas sem enzima também foram incluídos. O valor da absorbância obtido foi corrigido para o valor em branco (substrato sem enzima), fornecendo uma medida da atividade hidrolítica. Para cada amostra (variante), o índice de desempenho foi calculado conforme descrito abaixo. Este teste em amostras de tecido com SLT, executado a 16°C (60°F) e pH 8, é mencionado neste documento como o "método de teste."

D. Teste em pequena amostra de tecido com ovo

[00364] Gema de ovo envelhecida com CS38 pequenas amostras de tecido de algodão coradas com pigmento com diâmetro circular de 5,5 milímetros foram obtidas junta à CFT. Estas amostras não foram pré-enxaguadas em água. Uma pequena amostra de tecido foi colocada em cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poço não ligante (Corning 3641). A composição detergente 4 foi diluída em água Milli-Q (deionizada) até uma concentração de trabalho de 0,788 g/L. Os detergentes foram tamponados com HEPES 5 mM pH 8,2, que mediante adição ao detergente, tamponam a pH 8. Adicionalmente, 6 grãos por galão (gpg) de dureza da água (3:1 Ca:Mg - CaCl_2 : $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) foram adicionados. A solução detergente foi pré-equilibrada em um banho de água gelada para testes a 16°C (temperatura ambiente durante testes a 32°C) e bombeada para um reservatório circulante (Beckman FX). A seguir, 185 µl da solução detergente desejada foram adicionados a cada poço da MTP contendo as pequenas amostras de tecido. A esta mistura, adicionou-se 15 µl da solução de diluição mestre da enzima diluída, fornecendo uma concentração de enzimas aproximada de 0,6 µg/mL na reação. A diluição mestre foi preparada a partir dos sobrenadantes da cultura a 8 µg/mL, na qual a concentração de enzima aproximada dos sobrenadantes da cultura e controles de BPN'-v3 ou BPN'-v36 originais foi determinada usando o teste AAPF de atividade da protease, baseando a concentração em um padrão de BPN'-v3 ou BPN'-v36 purificado de concentração conhecida. A MTP foi lacrada com fita e colocada na incubadora/agitador iEMS (Thermo/Labsystems) pré-ajustada a 16°C em uma caixa para laticínios ou a 32°C sobre a bancada durante 30 minutos, com agitação a 1400 rpm. Após a incubação sob as condições adequadas, a fita de vedação foi removida de cada placa e 125 µl (150 µl caso a pipetagem seja feita à

mão para telas menores) da solução de cada poço foi transferida para uma nova MTP (Corning 9017). A nova MTP contendo 125 µl a 150 µl de solução/poço foi lida a 405 nm (com modo de mistura de 5 seg no leitor de placa) usando um leitor MTP SpectraMax (tipo 340; Molecular Devices). Os controles em branco contendo uma pequena amostra de tecido e o detergente, mas sem enzima também foram incluídos. O valor da absorbância obtido foi corrigido para o valor em branco (substrato sem enzima), fornecendo uma medida da atividade hidrolítica. Para cada amostra (variante), o índice de desempenho foi calculado conforme descrito abaixo.

E. Teste em pequena amostra de tecido com grama

[00365] Amostras de malha de algodão esfregadas com grama Warwick Equest foram obtidas junto à Warwick. Estas amostras foram cortadas em pequenas amostras de tecido com 5,5 milímetros de diâmetro circular usando uma máquina de punção personalizada de 96 poços que colocar uma amostra de tecido em cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poço não ligante (Corning 3641). Após cortar as amostras, o tecido foi lavado nos poços (pré-enxaguado) com 100 µL por poço de 50% de composição detergente 4 na concentração de trabalho diluída em água. Após 20 minutos de pré-enxague, 100 µl de 50% do enxágue de detergente foram removidos por pipetagem manual. A composição detergente 4 foi diluída em água Milli-Q (deionizada) até uma concentração de trabalho de 0,788 g/L. Estes detergentes foram tamponados com HEPES 5 mM pH 8,2, que mediante adição ao detergente, tamponam a pH 8. Adicionalmente, 6 grãos por galão (gpg) de dureza da água (3:1 Ca:Mg - CaCl₂ : MgCl₂·6H₂O) foram adicionados. A solução detergente foi pré-equilibrada em um banho de água gelada para testes a 16°C (temperatura ambiente durante testes a 32°C). A seguir, 180 µl da solução detergente desejada foram adicionados a cada poço da MTP

contendo as pequenas amostras de tecido, imediatamente após o pré-enxague ter terminado. A esta mistura adicionou-se 20 µl da solução de diluição mestre da enzima diluída, fornecendo uma concentração de enzimas aproximada de 0,8 µg/mL na reação. A diluição mestre foi preparada a partir dos sobrenadantes da cultura a 8 µg/mL, na qual a concentração de enzima aproximada dos sobrenadantes da cultura e controles de BPN'-v36 originais foi determinada usando o teste AAPF de protease, baseando a concentração em um padrão de BPN'-v36 purificado de concentração conhecida. A MTP foi lacrada com fita e colocada na incubadora/agitador iEMS (Thermo/Labsystems) pré-ajustada a 16°C em uma caixa para laticínios ou a 32°C sobre a bancada durante 30 minutos, com agitação a 1400 rpm. Após a incubação sob as condições adequadas, a fita de vedação foi removida de cada placa e 125 µl (150 µl caso a pipetagem seja feita à mão para telas menores) da solução de cada poço foi transferida para uma nova MTP (Corning 9017). A nova MTP contendo 125 µl a 150 µl de solução/poço foi lida a 430 nm e a 670 nm (com modo de mistura de 5 seg no leitor de placa) usando um leitor MTP SpectraMax (tipo 340; Molecular Devices). Os controles em branco contendo uma pequena amostra de tecido e o detergente, mas sem enzima também foram incluídos. O valor da absorbância obtido foi corrigido para o valor em branco (substrato sem enzima), fornecendo uma medida da atividade hidrolítica. Para cada amostra (variante), o índice de desempenho foi calculado conforme descrito abaixo.

F. Teste de estabilidade

[00366] A estabilidade das variantes de protease foi determinada na presença da composição detergente 3 concentrada a 40% diluída em água. Os reagentes usados foram a composição detergente 3 diluída para 50% em água Milli-Q, tampão de diluição mestre MES 10 mM 0,01% de TWEEN®-80 pH 5,8, reagentes do teste AAPF: vide o

protocolo do teste AAPF. O equipamento usado foi uma MTP de fundo F (Corning 9017) para diluição da enzima diluída no detergente assim como as placas de suc-AAPF-pNA, Biomek FX (Beckman Coulter), leitor Spectramax Plus 384 MTP (Molecular Devices), incubadora/agitador iEMS (amplitude de 1 mm) (Thermo Electron Corporation), fita de vedação: Nunc (236366), reservatório circulante (Beckman Fx).

[00367] A composição detergente 3 foi diluída inicialmente para 50% em água. Este detergente foi mantido à temperatura ambiente e ciclado através do reservatório circulante. As incubadoras/agitadores iEMS (Thermo/Labsystems) foram pré-ajustados a 43°C. Os sobrenadantes da cultura foram diluídos nas placas contendo tampão de diluição mestre até uma concentração de ~ 20 ppm (placa de diluição mestre). A seguir, 40 µl de amostra da placa de diluição mestre foram adicionados a placas contendo 160 µl da composição detergente 3 a 50% para fornecer uma concentração final de incubação de 4 ppm. Os conteúdos foram misturados e mantidos à temperatura ambiente e testes AAPF em triplicata foram feitos imediatamente nestas placas e registrados como leituras não estressadas. O teste AAPF foi modificado para que 20 µL da amostra da etapa acima fosse adicionado a 190 µL de solução de trabalho de suc-AAPF-pNA. As placas foram cobertas imediatamente com fita de vedação e colocadas em agitadores iEMS a 43°C por 30 min a 650 rpm. Após 30 minutos de incubação, testes AAPF em triplicata foram feitos nestas placas sob estresse e registrados como leituras sob estresse. A estabilidade das amostras foi determinada pelo cálculo da razão entre a atividade de AAPF residual e inicial, da seguinte forma: Atividade residual (%) = $\frac{[\text{mOD} \cdot \text{min}^{-1} \text{ sob estresse}]}{[\text{mOD} \cdot \text{min}^{-1} \text{ sem estresse}]} \times 100$. Para cada amostra (variante), o índice de desempenho foi calculado conforme descrito abaixo.

G. Teste de estabilidade em LAS/EDTA

[00368] A estabilidade das variantes de protease na presença de um tensoativo aniônico representativo (LAS=sulfonato de alquil benzeno linear, especificamente, dodecilbenzenossulfonato de sódio-DOBS) e EDTA dissódico foi medida após incubação sob condições definidas e a atividade residual foi determinada usando o teste AAPF. Os reagentes usados foram sal de sódio de sulfonato de dodecilbenzeno (DOBS, Sigma No. D-2525), TWEEN®-80 (Sigma No. P-8074), EDTA dissódico (Siegfried Handel No. 164599-02), HEPES (Sigma No. H-7523), tampão não submetido a estresse: HEPES 50 mM (11,9 g/l) + 0,005% de TWEEN®-80, pH 8,0, tampão de estresse: HEPES 50 mM (11,9 g/l), 0,1% (p/v) DOBS (1 g/l), EDTA 10 mM (3,36 g/l), pH 8,0, sobrenadantes da cultura da protease de referência e da variante de protease contendo 200 a 400 µg/ml de proteína. O equipamento usado foram MTPs de fundo V ou U como placas de diluição (Greiner 651101 e 650161, respectivamente), MTPs de fundo F (Corning 9017) para tampão não submetido a estresse e também, tampão LAS/EDTA para as placas com suc-AAPF-pNA, Biomek FX (Beckman Coulter), leitor de placas Spectramax Plus 384 (Molecular Devices), incubadora/agitador iEMS (amplitude de 1 mm) (Thermo Electron Corporation), e fita de vedação Nunc (236366).

[00369] A incubadora/agitador iEMS (Thermo/Labsystems) foi ajustada para 29°C. Os sobrenadantes da cultura foram diluídos nas placas contendo tampão não submetido a estresse até uma concentração de ~ 25 ppm (placa de diluição mestre). A seguir, 20 µl de amostra da placa de diluição mestre foram adicionados a placas contendo 180 µl do tampão não submetido a estresse para fornecer uma concentração final de incubação de 2,5 ppm. Os conteúdos foram misturados e mantidos à temperatura ambiente e um teste AAPF foi feito nesta placa. A seguir, 20 µl de amostra da placa de diluição mestre também foram

adicionados às placas contendo 180 µl de tampão de estresse (HE-PES 50 mM (11,9 g/l), 0,1% (p/v) de DOBS (1 g/l), EDTA 10 mM (3,36 g/l), pH 8,0). As soluções foram misturadas e colocadas imediatamente em um agitador iEMS a 29°C durante 30 min a 400 rpm. Após 30 minutos de incubação, um teste AAPF foi feito na placa sob estresse. A estabilidade das amostras foi determinada pelo cálculo da razão entre a atividade de AAPF residual e inicial, da seguinte forma: Atividade residual (%) = $[\text{mOD} \cdot \text{min}^{-1} \text{ sob estresse}] \cdot 100 / [\text{mOD} \cdot \text{min}^{-1} \text{ sem estresse}]$. Para cada amostra (variante), o índice de desempenho foi calculado conforme descrito abaixo.

Índice de desempenho

[00370] O índice de desempenho fornece uma comparação entre o desempenho de uma variante (valor real) e o de uma enzima protease padrão ou de referência (valor teórico) na mesma concentração de proteína. Os valores teóricos podem ser calculados usando os parâmetros de uma curva dose-resposta de desempenho (isto é, usando uma equação de Langmuir para gerar a curva de desempenho) da protease padrão/de referência. Um índice de desempenho (PI) maior que 1 ($\text{PI} > 1$) identifica uma variante melhor em comparação com a protease padrão ou de referência (que pode ser, por exemplo, uma protease selvagem ou outra variante de protease), enquanto que um PI de 1 ($\text{PI} = 1$) identifica uma variante que tem o mesmo desempenho que a protease padrão ou de referência, e um PI menor que 1 ($\text{PI} < 1$) identifica uma variante que tem desempenho pior que a protease padrão ou de referência. Desta forma, o PI identifica vencedores (por exemplo, variantes que têm atividade proteolítica intensificada em comparação à atividade da protease padrão/de referência) assim como variantes que podem ser menos desejáveis para serem usadas sob determinadas circunstâncias (por exemplo, variantes que possuem atividade proteolítica menor que a atividade proteolítica da protease pa-

drão/de referência).

[00371] É importante observar que as variantes de protease da invenção que possuem valores de índice de desempenho menores que os de uma protease de referência ou padrão são, entretanto, úteis nas aplicações e métodos aqui descritos. Por exemplo, as variantes de protease da invenção que possuem valores de índice de desempenho menores que os de uma protease de referência ou padrão possuem atividade proteolítica e, assim, são úteis nas composições da invenção, como, por exemplo, mas não se limitando a composições de limpeza (incluindo, por exemplo, mas sem limitação, composições de limpeza detergentes) para limpar uma variedade de superfícies e itens, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a itens de lavanderia, tecidos, e louças, e em aplicações de cuidados pessoais e composições como descritas em outro local no presente documento; tais variantes de protease também são úteis em produtos e composições para cuidados com tecidos e com a casa e em produtos e composições para cuidados com não tecidos e com a casa descritos em outro local no presente documento e nos métodos da invenção, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a métodos de limpeza, métodos para cuidados pessoais, etc., descritos em outro local no presente documento.

[00372] Vários termos apresentados abaixo são usados para descrever a variante: variantes não prejudiciais possuem um PI $>0,05$; variantes prejudiciais possuem um PI menor que ou igual a $0,05$; variantes combináveis são aquelas para as quais a variante tem valores de índice de desempenho maiores que ou iguais a $0,2$ para pelo menos uma propriedade, e $>0,05$ para todas as propriedades. As variantes combináveis são aquelas que podem ser combinadas para gerar proteínas com índices de desempenho adequados para uma ou mais propriedades desejadas. Estes dados podem ser usados na manipulação

de qualquer subtilisina/subtilase ou protease. Ainda que a subtilase ou protease a ser manipulada tenha um aminoácido diferente do da subtilisina BPN' em uma ou mais posições específicas, estes dados podem ser usados na identificação de substituições de aminoácido que alteram as propriedades desejadas pela identificação das melhores escolhas para substituições, incluindo substituições do aminoácido BPN' selvagem.

Exemplo 2

Construção da biblioteca de BPN' e desempenho de limpeza das variantes de BPN'

a) Descrição do cassete de expressão de BPN'-v3 usado para a construção da biblioteca

[00373] O cassete de expressão de BPN'-v3 (protease BPN' contendo as substituições G097A-G128A-Y217Q) usado para a construção da biblioteca combinatória foi gerado usando o cassete de expressão de BPN', que compreende a sequência líder aprE-BPN' híbrida (isto é, sequência de sinal), sequência pró de BPN' e sequência madura de BPN' de *B. amyloliquefaciens*. A sequência de DNA é mostrada abaixo como SEQ ID n° 1 e codifica a proteína precursora BPN' mostrada abaixo como SEQ ID n° 168.

GTGAGAAGCAAAAAATTGTGGATCAGTTTGCTGTTTGCTTTAGCGT
 TAATCTTTACGATGGCGTTCGGCAGCACATCCTCTGCCCAGGCGG
CAGGGAAATCAAACGGGGAAAAGAAATATATTGTCGGGTTTAAAC
AGACAATGAGCACGATGAGCGCCGCTAAGAAGAAAGATGTCATTT
CTGAAAAAGGCGGGAAAGTGCAAAAGCAATTCAAATATGTAGACG
CAGCTTCAGCTACATTAAACGAAAAAGCTGTAAAAGAATTGAAAAA
AGACCCGAGCGTCGCTTACGTTGAAGAAGATCACGTAGCACATGC
GTACGCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAAATTAAAGCCCC
 TGCTCTGCACTCTCAAGGCTACACTGGATCAAATGTTAAAGTAGC
 GGTTATCGACAGCGGTATCGACTCGAGCCATCCAGATCTTAAAGT

CGCTGGAGGGGCTTCTATGGTGCCGTCCGAAACAAACCCGTTTCA
 AGATAACAATTCTCATGGCACACACGTCGCAGGAACGGTTGCGGC
 GTTAAACAATTCTATTGGCGTGCTTGGTGTAGCCCCGTCTGCTTC
 GCTCTACGCCGTAAAGTTCTTGGCGCAGACGGATCAGGCCAATA
 CTCATGGATTATCAACGGCATCGAATGGGCCATCGCGAATAACAT
 GGATGTAATCAACATGAGCCTGGGAGGACCAAGCGGCAGTGCGG
 CACTTAAAGCAGCAGTTGATAAAGCTGTTGCATCTGGTGTCTGTCG
 TAGTAGCGGCAGCTGGGAATGAGGGAACATCCGGATCATCGAGT
 ACCGTCGGTTATCCAGGCAAGTACCCTTCAGTGATTGCAGTGGGC
 GCTGTAGACTCTTCAAATCAACGTGCCTCTTTTTCTCCGTGGGAC
 CGGAGCTGGATGTCATGGCCCCTGGCGTTTCTATTCAATCGACGC
 TTCCAGGGAACAAGTATGGTGCGTATAACGGGACTTCCATGGCCT
 CGCCGCATGTAGCTGGGGCGGCCGCATTGATTCTTTCTAAGCACC
 CGAACTGGACAAACACTCAAGTCCGCAGCAGTTTAGAAAACACCA
 CTACAAAACCTTGGTGATTCTTTCTACTATGGAAAAGGGCTGATCAA
 CGTACAGGCGGCAGCTCAG (SEQ ID n° 1)

[00374] Na sequência de nucleotídeo da SEQ ID n° 1, a sequência de DNA que codifica a protease madura é mostrada em **negrito**, a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência líder (sequência líder aprE-BPN' híbrida) é mostrada em texto padrão (não sublinhado), e a sequência de nucleotídeo que codifica a pró-sequência (BPN') está sublinhada. Na sequência de aminoácidos (sequência líder aprE-BPN' híbrida, pró-sequência de BPN, e sequência da proteína BPN' madura) da proteína BPN' precursora descrita na SEQ ID n° 168, a porção em **negrito** indica a protease subtilisina BPN' madura.

VRSKKLWISLLFALALIFTMAFGSTSSAQAAGKSNGEKKYIVGFKQTM
 STMSAAKKKDVISEKGGKVQKQFKYVDAASATLNEKAVKELKKDPSV
 AYVEEDHVAHAYAQSVPYGVVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAIDSGI
 DSSHPDLKVAGGASMVPSETNPFQDNNSHGTHVAGTVAALNNSIGV
 LGVAPSASLYAVKVLGADGSGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSLGG

PSGSAALKAAVDKAVASGVVVVAAAGNEGTS GSSSTVGYPGKYPSVI
AVGAVDSSNQRFSSVGPGLDVMAPGVSIQSTLPGNKYGAYNGTS
MASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSLENTTTKLGD SFYYGKGLI
NVQAAAQ (SEQ ID nº 168).

[00375] Desta forma, a sequência de aminoácidos da protease subtilisina BPN' madura é:

AQSVPYGV SQIKAPALHSQGYTGS NVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGG
ASMVPSETNPFQDNNSHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPSASLYAVK
VLGADGSGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSLGGPSGSAALKAAVDK
AVASGVVVVAAAGNEGTS GSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRA
SFSSVGPGLDVMAPGVSIQSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALI
LSKHPNWTNTQVRSSLENTTTKLGD SFYYGKGLINVQAAAQ (SEQ ID
Nº 2).

[00376] A sequência de nucleotídeos do gene de BPN'-v3 maduro é mostrado abaixo (a sequência de sinal e a sequência de pró-peptídeo usada no cassete de expressão de BPN'-v3 são as mesmas usadas para BPN' mostrada na SEQ ID nº 1):

GCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAAATTAAAGCCCCTGCT
CTGCACTCTCAAGGCTACACTGGATCAAATGTTAAAGTAGCGGTT
ATCGACAGCGGTATCGACTCGAGCCATCCAGATCTTAAAGTCGCT
GGAGGGGCTTCTATGGTGCCGTCCGAAACAAACCCGTTTCAAGAT
AACAATTCTCATGGCACACACGTCGCAGGAACGGTTGCGGCGTTA
AACAATTCTATTGGCGTGCTTGGTGTAGCCCCGTCTGCTTCGCTC
TACGCCGTAAAGTTCTTGCAGCAGACGGATCAGGCCAATACTCA
TGGATTATCAACGGCATCGAATGGGCCATCGCGAATAACATGGAT
GTAATCAACATGAGCCTGGGAGCACCAAGCGGCAGTGCGGCACT
TAAAGCAGCAGTTGATAAAGCTGTTGCATCTGGTGTGTCGTAGT
AGCGGCAGCTGGGAATGAGGGAACATCCGGATCATCGAGTACCG
TCGGTTATCCAGGCAAGTACCCTTCAGTGATTGCAGTGGGCGCTG
TAGACTCTTCAAATCAACGTGCCTCTTTTTCCTCCGTGGGACCGG

AGCTGGATGTCATGGCCCCTGGCGTTTCTATTCAATCGACGCTTC
 CAGGGAACAAGTATGGTGCGCAAACGGGACTTCCATGGCCTCG
 CCGCATGTAGCTGGGGCGGCCGCATTGATTCTTTCTAAGCACCCG
 AACTGGACAAACACTCAAGTCCGCAGCAGTTTAGAAAACACCACT
 ACAAACACTTGGTGATTCTTTCTACTATGGAAAAGGGCTGATCAACG
 TACAGGCGGCAGCTCAG (SEQ ID n° 3).

[00377] A sequência de proteína da variante de protease BPN'-v3 madura é mostrada abaixo (a sequência de sinal e a sequência de pró-peptídeo usadas no cassete de expressão de BPN'-v3 são as mesmas da BPN' mostrada na SEQ ID n° 168):

AQSVPYGVVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGG
 ASMVPSETNPFQDNNSHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPSASLYAVK
 VLAADGSGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSLGAPSGSAALKA AVDK
 AVASGVVVVAAAGNEGTS GSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRA
 SFSSVGPELDVMAPGVSIQSTLPGNKYGAQNGTSMASPHVAGAAALI
 LSKHPNWTNTQVRSSLENTTTKLGD SFYYGKGLINVQAAAQ (SEQ ID
 n° 4).

b) Construção da biblioteca combinatória com o uso do plasmídio pHPLT-BPN'-v3

[00378] O plasmídio pHPLT-BPN'-v3 (vide figura 1) contendo o cassete de expressão de BPN'-v3 descrito acima serviu como um DNA molde para a clonagem para fornecer variantes derivadas de BPN'-v3. O vetor pHPLT (figura 4 na patente U.S. N° 6.566.112) contém o promotor LAT de *B. licheniformis* ("Plat"); uma sequência que codifica o peptídeo de sinal LAT ("preLAT"). Elementos plasmidiais adicionais do plasmídio pUB110 apresentados em McKenzie et al., *Plasmid* 15(2): 93-103 (1986): "ori-pUB" é a origem de replicação de pUB110; "neo" é o gene de resistência à neomicina/canamicina de pUB110; "Terminador" é o terminador transcricional da amilase de *B. licheniformis*.

[00379] Uma biblioteca combinatória de DNA foi sintetizada pela empresa DNA 2.0 e entregue como reações de ligação individuais. Em alguns casos, para uma transformação eficaz de *B. subtilis*, o DNA das misturas da reação de ligação foi amplificado por amplificação por círculo rolante (RCA) usando o kit Illustra Templiphi (GE Healthcare). A reação foi feita de acordo com o protocolo do fabricante. Um microlitro de um DNA amplificado diluído dez vezes foi usado para transformar 50 µL de células de *B. subtilis* competentes (Δ aprE, Δ nprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo). A mistura de transformação foi agitada a 37°C durante 1 hora. Alíquotas de dez microlitros da mistura de transformação foram plaqueadas sobre placas de ágar Luria com leite desnatado (1,6%) suplementado com 10 µg/ml de neomicina (Teknova).

[00380] Os transformantes que formaram halos sobre as placas de leite desnatado foram selecionados e colocados em placas de microtitulação contendo 150 µl de caldo Luria (LB) suplementado com 10 µg/ml de neomicina. As placas foram cultivadas de um dia para o outro a 37°C com agitação a 250 a 300 rpm e 70 a 80% de umidade com o uso de tampas EnzyScreen para placas de microtitulação (EnzyScreen). Usando uma ferramenta de replicação de 96 pinos (EnzyScreen), a placa cultivada de um dia para o outro foi usada para inocular uma nova placa de microtitulação contendo 180 µl de meio MBD (um meio definido à base de MOPS) com 2,5 µg/ml de neomicina. O meio MBD foi preparado essencialmente conforme conhecido na técnica (vide Neidhardt et al., J. Bacteriol. 119:736-747 [1974]), exceto que NH_4Cl_2 , FeSO_4 , e CaCl_2 foram omitidos do meio base, K_2HPO_4 3 mM foi usado, e o meio base foi suplementado com ureia 60 mM, e 100 ml de uma solução feita de 210 g/L de glicose, e 350 g/L de maltodextrina. 1 g/L de BD extrato Bacto-levedura foi adicionado a o pH foi ajustado para 7,4 com KOH. Os micronutrientes

foram supridos como uma solução de estoque 100X contendo em um litro, 400 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mg de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 10 ml de 1 M CaCl_2 , e 10 ml de citrato de sódio 0,5 M. As placas de microtitulação contendo meio MBD foram cultivadas durante 64 horas a 37°C, 250 a 300 rpm, e 70 a 80% de umidade usando tampas EnzyScreen (EnzyScreen) para a expressão da variante de protease. No dia seguinte, as culturas foram filtradas através de uma placa de microfiltro (0,22 μm ; Millipore) e os filtrados resultantes contendo as variantes de protease foram usados para análise bioquímica.

[00381] As variantes de protease foram testadas para o desempenho de limpeza usando um teste em amostras de tecido com SLT na composição detergente 1 a 16°C e pH 8 e um teste em amostras de tecido com SLT na composição detergente 2 a 16°C e pH 8. O teor de proteína foi determinado usando o teste TCA. Os testes foram feitos conforme descrito no exemplo 1 e os índices de desempenho foram calculados em relação a BPN'-v3 (com um valor de PI de 1,0).

[00382] Determinou-se que a seguinte variante de protease subtilisina BPN' tem um valor de PI maior que 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2 a cerca de 5, ou de maios de 1,0 a cerca de 5 em relação a BPN'-v3 (SEQ ID n° 4) em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 1 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID n° 2) compreendendo o conjunto de substituições de aminoácido G097A-G128A-P210S-Y217Q, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID n° 2. Tal variante tem um valor

de PI de 1,1 em relação a BPN'-v3 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, e atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) neste teste, a variante tendo uma sequência de aminoácidos que compreende as substituições de aminoácido G097A-G128A-P210S-Y217Q, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Também está incluída neste teste uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a SEQ ID nº 2, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 e compreendendo as substituições de aminoácido G097A-G128A-P210S-Y217Q, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência da SEQ ID nº 2. Também é fornecida uma variante de protease subtilisina que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' e/ou um valor de PI maior que o da BPN' (SEQ ID nº 2) e/ou BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a SEQ ID nº 2, sendo que a variante compreende as substituições X097A-X128A-X210S-X217Q, sendo que as posições da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2 e sendo que, opcionalmente, a variante compreende pelo menos uma substituição selecionada a partir do grupo de G097A, G128A, P210S, e Y217Q. Tal variante de protease pode ser uma variante de protease isolada, recombinante, substancialmente pura, ou que não tem oco-

rrência natural. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza compreendendo tal variante de protease e métodos para limpeza utilizando tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00383] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 1 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID n° 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em G097A-G128A-Y217Q, G097A-G128A-E156S-P210S-Y217Q, G097A-G128A-P210S-Y217Q-N218A, G097A-G128A-P210S-Y217Q-N218S, e G097A-Y104F-G128A-E156S-P210I-Y217Q, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID n° 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID n° 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID n° 2) ou um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID n° 2 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID n° 2. Também é fornecida uma variante da protease subtilisina que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' e/ou um valor de PI de cerca de

1,0 em comparação a BPN'-v3 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com SEQ ID nº 2, sendo que a variante compreende pelo menos uma substituição selecionada a partir do grupo de X097A, X104F, X128A, X156A/S, X210I/S, X217Q, X218A/S, e, opcionalmente, pelo menos uma substituição selecionada a partir do grupo de G097A, Y104F, G128A, E156A/S, P210I/S, Y217Q, e N218A/S, sendo que as posições da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00384] Determinou-se que as seguintes variantes BPN' possuem um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 1 em pH 8 e 16°C: A sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID nº 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em G097A-G128A-E156A-P210S-Y217Q-N218S e G097A-G128A-Y217Q-N218A, sendo que as posições da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica, um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v3, e/ou atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 e pelo

menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00385] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem um valor de PI maior que 1,0 a cerca de 5 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 2 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos BPN' (SEQ ID nº 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em G097A-G128A-P210S-Y217Q-N218A e G097A-G128A-P210S-Y217Q, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e/ou um valor de PI maior que 1,0 a cerca de 5 em relação a BPN'-v3 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. Também é fornecida uma variante da protease subti-

lisina que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' e/ou um valor de PI maior que 1, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9 a cerca de 5 em comparação a BPN'-v3 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a SEQ ID nº 2, sendo que a variante compreende pelo menos uma substituição selecionada a partir do grupo de X097A, X104F, X128A, X156A/S, X210I/S, X217Q, X218A/S, e opcionalmente, pelo menos uma substituição selecionada a partir do grupo de G097A, Y104F, G128A, E156A/S, P210I/S, Y217Q, e N218A/S, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a posição da sequência de SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00386] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 2 em pH 8 e 16°C: A sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID nº 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em G097A-G128A-Y217Q (isto é, BPN'-v3), G097A-G128A-E156S-P210S-Y217Q, e G097A-G128A-P210S-Y217Q-N218S, em que as posições da variante são numeradas por correspondência com a sequência de SEQ ID nº 2.

Tais variantes possuem atividade proteolítica e atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica, um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3, e/ou atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID n° 2 e pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência SEQ ID n° 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00387] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 2 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos BPN' (SEQ ID n° 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em G097A-G128A-E156A-P210S-Y217Q-N218S, G097A-G128A-Y217Q-N218A, e G097A-Y104F-G128A-E156S-P210I-Y217Q, sendo que as posições da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID n° 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica, um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v3, e/ou atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%,

85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 e pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

Exemplo 3

Geração de bibliotecas combinatórias e desempenho de limpeza das variantes

BPN'-v3 + S78N

a) Descrição da variante BPN'-v3 + S78N e sequências gênicas sintéticas derivadas desta variante

[00388] Gene Oracle sintetizou e clonou oito genes no plasmídio original pHPLT-BPN'-v3 + S78N (BPN'-S78N-G97A-G128A-Y217Q) (vide figura 2). Alguns destes genes foram usados como moldes (parentais) para criar bibliotecas combinatórias. A variante BPN'-v3 + S78N foi gerada usando métodos de biologia molecular padrão conhecidos na técnica. A sequência de nucleotídeo que codifica a variante BPN'-v3 + S78N é mostrada abaixo:

```
GCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAAATTAAAGCCCCTGCT
CTGCACTCTCAAGGCTACACTGGATCAAATGTTAAAGTAGCGGTT
ATCGACAGCGGTATTGATTGAGCCATCCAGATCTTAAAGTCGCT
GGAGGGGCTTCTATGGTGCCGTCCGAAACAAACCCGTTTCAAGAT
AACAATTCTCATGGCACACACGTCGCAGGAACGGTTGCGGCGTTA
AACAATAATATTGGCGTGCTTGGTGTAGCCCCGTCTGCTTCGCTC
TACGCCGTAAAGTTCTTGCAGCAGACGGATCAGGCCAATACTCA
```


TGGATTATCAACGGCATCGAATGGGCCATCGCGAATAACATGGAT
 GTAATCAACATGAGCCTGGGAGCACCAAGCGGCAGTGCGGGCACT
 TAAAGCAGCAGTTGATAAAGCTGTTGCATCTGGTGTCTCGTAGT
 AGCGGCAGCTGGGAATGAGGGAACATCCGGATCATCGAGTACCG
 TCGGTTATCCAGGCAAGTACCCTTCAGTGATTGCAGTGGGCGCTG
 TAGACTCTTCAAATCAACGTGCCTCTTTTTCTCCGTGGGACCGG
 AGCTGGATGTCATGGCCCCTGGCGTTTCTATTCAATCGACGCTTC
 CAGGGAACAAGTATGGTGCGCAAACGGGACTTCCATGGCCTCG
 CCGCATGTAGCTGGGGCGGCCGCATTGATTCTTTCTAAGCACCCG
 AACTGGACAAACACTCAAGTCCGCAGCAGTTTAGAAAACACCACT
 ACAAACCTTGGTGATTCTTTCTACTATGGAAAAGGGCTGATCAACG
 TACAGGCGGCAGCTCAG (SEQ ID nº 7).

[00389] A sequência de aminoácidos da variante BPN'-v3 + S78N é mostrada abaixo:

AQSVPYGVSIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGG
 ASMVPSETNPFQDNNSHGTHVAGTVAALNNNIGVLGVAPSASLYAVK
 VLAADGSGQYSWIINGIEWAIAANNMDVINMSLGAPSGSAALKA AVDK
 AVASGVVVVAAAGNEGTS GSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRA
 SFSSVGPELDVMAPGVSIQSTLPGNKYGAQNGTSMASPHVAGAAALI
 LSKHPNWTNTQVRSSLENTTTKLGD SFYYGKGLINVQAAAQ (SEQ ID
 nº 8).

[00390] As sequências de nucleotídeo e proteína dos genes GcM90-96 e GcM100 são mostradas abaixo. A sequência de nucleotídeo do gene GcM90 sintetizado é:

GCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAAATTAAAGCCCCTGCT
 CTGCACTCTCAAGGCTACACTGGATCAAATGTTAAAGTAGCGGTT
 ATCGACAGCGGTATCGACTCGAGCCATCCAGATCTTAAAGTCGCT
 GGAGGGGCTTCTATGGTGCCGGGAGAAACAAACCCGTTTCAAGA
 TAACAATTCTCATGGCACACACGCAGCAGGAACGGTTGCGGGCGTT
 AAACAATAATATTGGCGTGCTTGGTGTAGCCCCGTCTGCTTCGCT

CTACGCCGTTAAAGTTCTTGCAGCAGACGGATCAGCACAATACTC
 ATGGATTATCAACGGCATCGAATGGGCCATCGCGAATAACATGGA
 TGTAAATCAACATGAGCCTGGGAGCAACAAGCGGCAGTGCGGCAC
 TTAAAGCAGCAGTTGATAAAGCTGTTGCATCTGGTGTCTGTCGTAG
 TAGCGGCAGCTGGGAATGAGGGAACATCCGGATCATCGAGTACC
 GTCGGTTATCCAGGCAAGTACCCTTCAGTGATTGCAGTGGGCGCT
 GTAGACTCTTCAAATACACGTGCCTCTTTTTCTCCGTGGGACCG
 GAGCTGGATGTCATGGCCCCTGGCGTTTCTATTCAATCGACGCTT
 CCAGGGAACAAGTATGGTGCGCAAAACGGGACTTCCATGGCCTC
 GCCGCATGTAGCTGGGGCGGCCGCATTGATTCTTTCTAAGCACCC
 GAACTGGACAAACACTCAAGTCCGCAGCAGTTTAGAAAACACCAC
 TACAAAACCTTGGTGATTCTTTCTACTATGGAAAAGGGCTGATCAAC
 GTACAGGCGGCAGCTCAGTAA (SEQ ID n° 9)

[00391] A sequência de aminoácidos de GcM90 é fornecida abaixo:
 AQSVPYGVVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPLDKVAGG
 ASMVPGETNPFQDNNSHGTHAAGTVAALNNNIGVLGVAPSASLYAV
 KVLAADGSAQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSLGATSGSAALKA AVDK
 AVASGVVVVAAAGNEGTS GSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNTRA
 SFSSVGPELDVMAPGVSIQSTLPGNKYGAQNGTSMASPHVAGAAALI
 LSKHPNWTNTQVRSSLENTTTKLGD SFYYGKGLINVQAAAQ (SEQ ID
 n° 10)

[00392] A sequência de nucleotídeo do gene GcM91 sintetizado é fornecida abaixo:

GCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAAATTAAAGCCCCTGCT
 CTGCACTCTCAAGGCTACACTGGATCAAATGTTAAAGTAGCGGTT
 ATCGACAGCGGTATCGACTCGAGCCATCCAGATCTTAAAGTCGCT
 GGAGGGGCTTCTATGGTGCCGTCCGAAACAAACCCGTTTGTCGAT
 AACAATTCTCATGGCACACACGTCGCAGGAACGGTTGCGGCGTTA
 AACAATAATATTGGCGTGCTTGGTGTAGCCCCGTCTGCTTCGCTC
 TACGCCGTTAAAGTTCTTGCAGCAGACGGATCAGGCCAATACTCA

TGGATTGTCAACGGCATCGAATGGGCCATCGCGAATAACATGGAT
 GTAATCAACATGAGCCTGGGAGCACCAAGCGGCAGTGCGGGCACT
 TAAAGCAGCAGTTGATAAAGCTGTTGCATCTGGTCAAGTCGTAGT
 AGCGGCAGCTGGGAATGAGGGAACATCCGGATCATCGAGTACCG
 TCGGTTATCCAGGCAAGTACCCTTCAGTGATTGCAGTGGGCGCTG
 TAGACTCTTCAAATCAACGTGCCTCTTTTTCTCCGTGGGACCGG
 AGCTGGATGTCATGGCCCCTGGCGTTTCTATTCAATCGACGCTTC
 CAGCAAACAAGTATGGTGCGCAAAACGGGACTTCCATGGCCTCG
 CCGCATGTAGCTGGGGCGGCCGCATTGATTCTTTCTAAGCACCCG
 AACTGGACAAACACTCAAGTCCGCAGCAGTTTAGAACAACCACT
 ACAAACCTTGGTGATTCTTTCTACTATGGAAAAGGGCTGATCAACG
 TACAGGCGGCAGCTCAGTAA (SEQ ID nº 11)

[00393] A sequência de aminoácidos de GcM91 é fornecida abaixo:
 AQSVPYGVVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGG
 ASMVPSETNPFVDNNSHGTHVAGTVAALNNNIGVLGVAPSASLYAVK
 VLAADGSGQYSWIVNGIEWAIANNMDVINMSLGAPSGSAALKA AVDK
 AVASGQVVVAAAGNEGTS GSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRA
 SFSSVGP EL DVMAPGVSIQSTLPANKYGAQNGTSMASPHVAGAAALI
 LSKHPNWTNTQVRSSLEQTTTKLGDSFYYGKGLINVQAAAQ (SEQ ID
 nº 12)

[00394] A sequência de nucleotídeo do gene GcM92 sintetizado é fornecida abaixo:

GCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAAAT-
 TAAAGCCCCTGCTCTGCACTCTCAAGGCTACACTGGATCAA-
 ATGTTAAAGTAGCGGTTATCGACAGCGGTATCGACTCGAGC-
 CATCCAGATCTTAAAGTCGCTGGAGGGGCTTCTA-
 TGGTGCCGTCCGAAACAAACCCGTTTCAAGATGCAAATTCT-
 CATGGCACACACGTCGCAGGAACGGTTGCGGCGTTAAACAATAA-
 TATTGGCGTGCTTGGTGTAGCCCCGGAA-
 GCTTCGCTCTACGCCGTTAAAGTTCTTGCAGCAGACGGATCA-

GGCCAATACTCATGGATTATCAACGGCATCGAATGGGC-
 CATCGCGAATAACATGGATGTAATCAACATCAGCCTGGGAGCAC-
 CAAGCGGCAGTGCGGCACTTAAAGCAGCAGTTGATAAAGCTGTT-
 GCATCTGGTGTCGTCGTAGTAGCGGCAGCTGGGAATGAGGGAA-
 CATCCGGACCTTCGAGTACCGTCGGTTATCCAGGCAAGTAC-
 CCTTCAGTGATTGCAGTGGGCGCTGTAGACTCTTCAAATCAA-
 CGTGCCTCTTTTTCCTCCGTGGGACCGGAGCTGGATGT-
 CATGGCCCCTGGCGTTTCTATTCAATCGACGCTTCCAGGGAACA-
 AGTATGGTGCGCAAACGGGACTTCCATGGCCGCAC-
 CGCATGTAGCTGGGGCGGCCGCATTGATTCTTTCTAAGCAC-
 CCGAACTGGACAAACACTCAAGTCCGCAGCAGTTTAGAAAACAC-
 CACTACAAAACCTTGGTGATTCTTTCTACTATGGAAAAGGGCTGAT-
 CAACGTACAGGCGGCAGCTCAGTAA (SEQ ID n° 13)

[00395] A sequência de aminoácidos de GcM92 é fornecida abaixo:

AQSVPYGVVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAG-
 GASMVPSETNPFQDANSHGTHVAGTVAALNNNIGVLGVAPEAS-
 LYAVKVLAADGSGQYSWIINGIEWAIAANNMDVINISLGAPSGSAAL-
 KAAVDKAVASGVVVVAAAGNEGTSGPSSTVGYPGKYPSVIA-
 VGAVDSSNQRFSSVGPELDVMAPGVSIQSTLPGNKYGAQNGTS-
 MAAPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSLEN-
 TTTKLGD SFYYGKGLINVQAAAQ (SEQ ID n° 14)

[00396] A sequência de nucleotídeo do gene GcM93 sintetizado é fornecida abaixo:

GCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAAT-
 TAAAGCCCCTGCTCTGCACTCTCAAGGCTACACTGGATCAA-
 ATGTTAAAGTAGCGGTTATCGACAGCGGTATCGACTCGAGC-
 CATCCAGATCTTAAAGTCGCTGGAGGGGCTTCTA-
 TGGTGCCGTCCGAAACAAACCCGTTTCAAGATAACCAATCT-
 CATGGCACACACGTCGCAGGAACGGTTGCGGCGTTAAACAATAA-
 TATTGGCGTGCTT-

GGTGTAGCCCCGTCTGCTTCGCTCTACGCCGTTAAAGTTCTT-
 GCAGCAGACAACTCAGGCCAATACTCATGGATTATCAA-
 CGGCATCGAATGGGCCATCGCGAATAACATGGATGTAATCAACA-
 TGGCACTGGGAGCACCAAGCGGCAGTGCGGCACTTAAAGCA-
 GCAGTTGATAAAGCTGTT-
 GCATCTGGTGTCGTCGTAGTAGCGGCAGCTGGGAATGAGGGAA-
 CAGATGGATCATCGAGTACCGTCGGTTATCCAGGCAAGTAC-
 CCTTCAGTGATTGCAGTGGGCGCTGTAGACTCTTCAAATCAA-
 CGTGCCTCTTTTTCTCCGTGGGACCGGAGCTGGATGT-
 CATGGCCCCTGGCGTTTCTATTCAATCGACGCTTCCAGGGAACA-
 AGTATGGTGCGCAAAACGGGACTTC-
 CATGGCCTCGCCGCATGTAGCTGGGGCGGCCGCATT-
 GATTCTTTCTAAGCACCCGTCATGGACAAACACTCAAGTCCGCA-
 GCAGTTTAGAAAACACCACTACAAAACCTTGGTGATTCTTTCTAC-
 TATGGAAAAGGGCTGATCAACGTACAGGCGGCAGCTCAGTAA
 (SEQ ID nº 15)

[00397] A sequência de aminoácidos de GcM93 é fornecida abaixo:
 AQSVPYGVVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAG-
 GASMVPSETNPFQDNQSHGTHVAGTVAALNNNIGVLGVAPSAS-
 LYAVKVLAADNSGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMALGAPSGSAAL-
 KAAVDKAVASGVVVVAAAGNEGTDGSSSTVGYPGKYPSVIA-
 VGAVDSSNQRFSSVGPELDVMAPGVSIQSTLPGNKYGAQNGTS-
 MASPHVAGAAALILSKHPSWTNTQVRSSLEN-
 TTTKLGD SFYYGKGLINVQAAAQ (SEQ ID nº 16)

[00398] A sequência de nucleotídeo do gene GcM94 sintetizado é fornecida abaixo:
 GCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAAAT-
 TAAAGCCCCTGCTCTGCACTCTCAAGGCTACACTGGATCAA-
 ATGTTAAAGTAGCGGTTATCGACAGCGGTATCGACTCGAGC-
 CATCCAGATCTTAAAGTCGCTGGAGGGGCTTCTA-

TGGTGCCGTCCGAAACAAACCCGTTTCAAGATAACAATACA-
 CATGGCACACACGTCGCAGGAACGGTTGCGGCGTTAAACAATAA-
 TATTGGCGTGCTT-
 GGTGTAGCCCCGTCTGCTTCGCTCTACGCCGTTAAAGTTCTT-
 GCAGCAGACGGAGCAGGCCAATACTCATGGATTATCAA-
 CGGCATCGAATGGGCCATCGCGAATAACATGGATGTAATCAACA-
 TGAGCGTCGGAGCACCAAGCGGCAGTGCGGCACTTAAAGCA-
 GCAGTTGATAAAGCTGTT-
 GCATCTGGTGTCGTCGTAGTAGCGGCAGCTGGGAATGAGGGAA-
 CATCCGGATCATCGAGTACCGTCGGTTATCCAGGCAAGTAC-
 CCTTCAGTGATTGCAGTGGGCGCTGTAGACTCTACAAATCAA-
 CGTGCCTCTTTTTCTCCTCCGTGGGACCGGAGCTGGATGT-
 CATGGCCCCTGGCGTTTCTATTCAATCGACGCTTCCAGGGAACA-
 AGTATGGTGCGCAAAACGGGACTTC-
 CATGGCCTCGCCGCATGTAGCTGGGGCGGCCGCATT-
 GATTCTTTCTAAGCACCCGAACCTGGACAAACAACCAAGTCCGCA-
 GCAGTTTAGAAAACACCACTACAAAACCTTGGTGATTCTTTCTAC-
 TATGGAAAAGGGCTGATCAACGTACAGGCGGCAGCTCAGTAA
 (SEQ ID n° 17)

[00399] A sequência de aminoácidos de GcM94 é fornecida abaixo:
 AQSVPYGVVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAIDSGIDSSHPDLKVAG-
 GASMVPSETNPFQDNNTGTHVAGTVAALNNNIGVLGVAPSAS-
 LYAVKVLAAAGAGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSVGAPSGSAAL-
 KAAVDKAVASGVVVVAAAGNEGTS GSSSTVGYPGKYPSVIA-
 VGAVDSTNQRASFSSVGPELDVMAPGVSIQSTLPGNKYGAQNGTS-
 MASPHVAGAAALILSKHPNWTNNQVRSSLEN-
 TTTKLGD SFYYGKGLINVQAAAQ (SEQ ID n° 18)

[00400] A sequência de nucleotídeo do gene GcM 95 sintetizado é fornecida abaixo:
 GCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAAAT-

TAAAGCCCCTGCTCTGCACTCTCAAGGCTACACTGGATCAA-
 ATGTTAAAGTAGCGGTTATCGACAGCGGTATCGACTCGAGC-
 CATCTGGATCTTAAAGTCGCTGGAGGGGCTTCTATGGTGCCGG-
 GAGAAACAAACCCGTTTGTCTGATGCACAAACACATGGCACA-
 CACGTCTGCAGGAACGGTTGCGGGCGTTAAACAATAATATT-
 GCGGTGCTTGGTGTAGCCCCGGAAGCTTCGCTCTACGCCGT-
 TAAAGTTCTTGCAGCAGACAACGCAGCACAATACTCATGGATT-
 GTCAACGGCATCGAATGGGCCATCGCGAATAACATGGATGTAAT-
 CAACATGAGCCTGGGAGCACCAAGCGGCAGTGCGGGCACT-
 TAAAGCAGCAGTTGATAAAGCTGTT-
 GCATCTGGTGTCTGTCGTAGTAGCGGCAGCTGGGAATGAGGGAA-
 CATCCGGATCATCGAGTACCGTCGGTTATCCAGGCAAGTAC-
 CCTTCAGTGATTGCAGTGGGCGCTGTAGACTCTTCAAATCAA-
 CGTGCCTCTTTTTCTCCGTGGGACCGGAGCTGGATGT-
 CATGGCCCCTGGCGTTTCTATTCAATCGACGCTTCCAGGGAACA-
 AGTATGGTGCGCAAAACGGGACTTC-
 CATGGCCTCGCCGCATGTAGCTGGGGCGGCCGCATT-
 GATTCTTTCTAAGCACCCGAACCTGGACAAACACTCAAGTCCGCA-
 GCAGTTTGTAGAAAACACCACTACAAAACCTTGGTGATTCTTTCTAC-
 TATGGAAAAGGGCTGATCAACGTACAGGCGGCAGCTCAGTAA
 (SEQ ID n° 19)

[00401] A sequência de aminoácidos de GcM 95 é fornecida abaixo:
 AQSVPYGVVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHLDLKVAG-
 GASMVPGETNPFVDAQTHGTHVAGTVAALNNNIGVLGVAPEAS-
 LYAVKVLADNAAQYSWIVNGIEWAIANNMDVINMSLGAPSGSAAAL-
 KAAVDKAVASGVVVVAAAGNEGTS GSSSTVGYPGKYPSVIA-
 VGAVDSSNQ RASFSSVGPELDV MAPGVSIQSTLP GNKYGAQNGTS-
 MASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSLEN-
 TTTKLGD SFYYGKGLINVQAAAQ (SEQ ID n° 20)

[00402] A sequência de nucleotídeo do gene GcM96 sintetizado é

forneceida abaixo:

GCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAAAT-
TAAAGCCCCTGCTCTGCACTCTCAAGGCTACACTGGATCAA-
ATGTTAAAGTAGCGGTTATCGACAGCGGTATCGACTCGAGC-
CATCCAGATCTTAAAGTCGCTGGAGGGGCTTCTA-
TGGTGCCGTCCGAAACAAACCCGTTTCAAGATAACAATTCT-
CATGGCACACACGTCGCAGGAACGGTTGCGGCGTTAAACAATAA-
TATTGGCGTGCTT-
GGTGTAGCCCCGTCTGCTTCGCTCTACGCCGTTAAAGTTCTT-
GCAGCAGACGGATCAGGCCAATACTCATGGATTATCAA-
CGGCATCGAATGGGCCATCGCGAATAACATGGATGTAATCAACA-
TGAGCCTGGGAGCAACAAGCGGCAGTGCGGCACTTAAAGCA-
GCAGTTGATAAAGCTGTTGCATCTGGTCAA-
GTCGTAGTAGCGGCAGCTGGGAATGAGGGAACAGATGGAC-
CTTCGAGTACCGTCGGTTATCCAGGCAAGTACCCTTCAGTGATT-
GCAGTGGGCGCTGTAGACTCTACAAATA-
CACGTGCCTCTTTTTCTCCGTGGGACCGGAGCTGGATGT-
CATGGCCCCTGGCGTTTCTATTCAATCGACGCTTCAGCAAACA-
AGTATGGTGCGCAAAACGGGACTTCCATGGCCGCAC-
CGCATGTAGCTGGGGCGGCCGCATTGATTCTTTCTAAGCAC-
CCGTCATGGACAAACAACCAAGTCCGCAGCAGTTTAGAACAAC-
CACTACAAAACCTTGGTGATTCTTTCTACTATGGAAAAGGGCTGAT-
CAACGTACAGGCGGCAGCTCAGTAA (SEQ ID nº 21)

[00403] A sequência de aminoácidos de GcM96 é fornecida abaixo:

AQSVPYGVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAIDSGIDSSHPDLKVAG-
GASMVPSETNPFQDNNSHGTHVAGTVAALNNNIGVLGVAPSAS-
LYAVKVLAAADGSGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSLGATSGSAAL-
KAAVDKAVASGQVVVAAAGNEGTDGPSSTVGYPGKYPSVIA-
VGAVDSTNTRASFSVGPELDVMAPGVSIQSTLPANKYGAQNGTS-
MAAPHVAGAAALILSKHPSWTNNQVRSSLE-

QTTTKLGDSFYYGKGLINVQAAQ (SEQ ID nº 22)

[00404] A sequência de nucleotídeo do gene GcM100 sintetizado é fornecida abaixo:

GCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAAAT-
TAAAGCCCCTGCTCTGCACTCTCAAGGCTACACTGGATCAA-
ATGTTAAAGTAGCGGTTATCGACAGCGGTATCGACTCGAGC-
CATCCAGATCTTAAAGTCGCTGGAGGGGCTTCTA-
TGGTGCCGTCCGAAACAAACCCGTTTCAAGATAACAATTCT-
CATGGCACACACGCAGCAGGAACGGTTGCGGCGTTAAACAATAA-
TATTGGCGTGCTT-
GGTGTAGCCCCGTCTGCTTCGCTCTACGCCGTTAAAGTTCTT-
GCAGCAGACGGATCAGCACAATACTCATGGATTATCAA-
CGGCATCGAATGGGCCATCGCGAATAACATGGATGTAATCAACA-
TGGCACTGGGAGCACCAAGCGGCAGTGCGGCACTTAAAGCA-
GCAGTTGATAAAGCTGTT-
GCATCTGGTGTCGTCGTAGTAGCGGCAGCTGGGAATGAGGGAA-
CATCCGGATCATCGAGTACCGTCGGTTATCCAGGCAAGTAC-
CCTTCAGTGATTGCAGTGGGCGCTGTAGACTCTTCAAATCAA-
CGTGCCCTCTTTTTCTCCTCCGTGGGACCGGAGCTGGATGT-
CATGGCCCCTGGCGTTTCTATTCAATCGACGCTTCCAGCAAACA-
AGTATGGTGCGCAAAACGGGACTTC-
CATGGCCTCGCCGCATGTAGCTGGGGCGGCCGCATT-
GATTCTTTCTAAGCACCCGAACCTGGACAAACACTCAAGTCCGCA-
GCAGTTTAGAAAACACCACTACAAAACCTTGGTGATTCTTTCTAC-
TATGGAAAAGGGCTGATCAACGTACAGGCGGCAGCTCAGTAA

(SEQ ID nº 23)

[00405] A sequência de aminoácidos de GcM100 é fornecida abaixo:

AQSVPYGVVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAG-
GASMVPSETNPFQDNNSHGTHAAGTVAALNNNIGVLGVAPSAS-

LYAVKVLAAADGSAQYSWIINGIEWAIANNMDVINMALGAPSGSAAL-
 KAAVDKAVASGVVVVAAAGNEGTSGSSSTVGYPGKYPSVIA-
 VGAVDSSNQRFSSVGPELDVMAPGVSIQSTLPANKYGAQNGTS-
 MASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSLEN-
 TTTKLGD SFYYGKGLINVQAAAQ (SEQ ID n° 24)

b) Construção das bibliotecas combinatórias CG1-CG5 e CG8 usando os genes sintéticos GcM90-94 e GcM100

Tabela 3-1. Lista de possíveis substituições introduzidas e iniciadores usados para a construção das bibliotecas combinatórias CG1-CG5 e CG8				
Genes sinteti- zados (molde ou original)	Nome da biblioteca	Substituições introduzidas	Nome do iniciador	Sequência do iniciador
GcM90	CG1	G53S	1 S53 f	/5Phos/CTTCTATGGTGCCG TCCGAAACAAACCCGTTTC AAG (SEQ ID n° 25)
		A68V	1 V68 f	/5Phos/TCATGGCACACACG TCGCAGGAACGGTTGCGG CG (SEQ ID n° 26)
		A102G	1 G102 f	/5Phos/AGCAGACGGATCAG GCCAATACTCATGGATTAT CAAC (SEQ ID n° 27)
		T129P	1 P129 f	/5Phos/TGAGCCTGGGAGCA CCAAGCGGCAGTGC GGCA CTTAAAG (SEQ ID n° 28)
		T185Q	1 Q185 f	/5Phos/TAGACTCTTCAAATC AACGTGCCTCTTTTTCCTC CGTG (SEQ ID n° 29)
GcM91	CG2	V59Q	2 Q59 f	/5Phos/GAAACAAACCCGTT TCAAGATAACAATTCTCATG (SEQ ID n° 30)
		V108I	2 I108 f	/5Phos/ATACTCATGGATTAT CAACGGCATCGAATGGGC CATC (SEQ ID n° 31)
		Q147V	2 V147 f	/5Phos/TGTTGCATCTGGTG TCGTCTAGTAGCGGCAG CTGG (SEQ ID n° 32)
		A211G	2 G211 f	/5Phos/ATCGACGCTTCCAG GGAACAAGTATGGTGCGCA AAAC (SEQ ID n° 33)
		Q252N	2 N252 f	/5Phos/CAGCAGTTTAGAAA ACACCACTACAAA ACTTG TG (SEQ ID n° 34)

Tabela 3-1. Lista de possíveis substituições introduzidas e iniciadores usados para a construção das bibliotecas combinatórias CG1-CG5 e CG8

Genes sinteti- zados (molde ou original)	Nome da biblioteca	Substituições introduzidas	Nome do iniciador	Sequência do iniciador
GcM92	CG3	A61N	3 N61 f	/5Phos/CAAACCCGTTTCAA GATAACAATTCTCATGGCA CACAC (SEQ ID n° 35)
		E87S	3 S87 f	/5Phos/TTGGTGTAGCCCCG TCTGCTTCGCTCTACGCCG TTAAAG (SEQ ID n° 36)
		I124M	3 M124 f	/5Phos/TGGATGTAATCAAC ATGAGCCTGGGAGCACCA AGCG (SEQ ID n° 37)
		P161S	3 S161 f	/5Phos/AGGGAACATCCGGA TCATCGAGTACCGTCGGTT ATCCAG (SEQ ID n° 38)
		A224S	3 S224 f	/5Phos/GACTTCCATGGCCT CGCCGCATGTAGCTGGGG CGGC (SEQ ID n° 39)
GcM93	CG4	Q62N	4 N62 f	/5Phos/GTTTCAAGATAACA ATTCTCATGGCACACACGT CGC (SEQ ID n° 40)
		N100G	4 G100 f	/5Phos/GTTCTTGCAGCAGA CGGATCAGGCCAATACTCA TG (SEQ ID n° 41)
		A125S	4 S125 f	/5Phos/ATGTAATCAACATG AGCCTGGGAGCACCAAGC GGCAG (SEQ ID n° 42)
		D159S	4 S159 f	/5Phos/GGAATGAGGGAACA TCCGGATCATCGAGTACCG TCGG (SEQ ID n° 43)
		S240N	4 N240 f	/5Phos/CTTTCTAAGCACCC GAACTGGACAAACACTCAA GTCCG (SEQ ID n° 44)
GcM94	CG5	T63S	5 S63 f	/5Phos/TCAAGATAACAATTC TCATGGCACACACGTCGCA GG (SEQ ID n° 45)
		A101S	5 S101 f	/5Phos/TGCAGCAGACGGAT CAGGCCAATACTCATGGAT TATC (SEQ ID n° 46)
		V126L	5 L126 f	/5Phos/AATCAACATGAGCC TGGGAGCACCAAGCGGCA GTG (SEQ ID n° 47)

Tabela 3-1. Lista de possíveis substituições introduzidas e iniciadores usados para a construção das bibliotecas combinatórias CG1-CG5 e CG8

Genes sintetizados (molde ou original)	Nome da biblioteca	Substituições introduzidas	Nome do iniciador	Sequência do iniciador
		T183S	5 S183 f	/5Phos/CGCTGTAGACTCTTCAAATCAACGTGCCTCTTTTCC (SEQ ID n° 48)
		N244T	5 T244 f	/5Phos/GAACTGGACAAACACTCAAGTCCGCAGCAGTTTAG (SEQ ID n° 49)
GcM100	CG8	A68V	1 V68 f	/5Phos/TCATGGCACACACGTCGCAGGAACGGTTGCGGCG (SEQ ID n° 50)
		A102G	1 G102 f	/5Phos/AGCAGACGGATCAGGCCAATACTCATGGATTATCAAC (SEQ ID n° 51)
		A211G	2 G211 f	/5Phos/ATCGACGCTTCCAGGGAACAAGTATGGTGCGCAAAAC (SEQ ID n° 52)
		A125S	4 S125 f	/5Phos/ATGTAATCAACATGAGCCTGGGAGCACCAAGCGGCAG (SEQ ID n° 53)

[00406] Cada gene sintetizado foi construído na molécula original pHPLT-BPN'-S78N-G97A-G128A-Y217Q. Os plasmídios resultantes contendo os seis genes sintetizados GcM90-94, e GcM100 serviram como moldes para fazer bibliotecas combinatórias nas respectivas posições (tabela 3-1). Dois genes adicionais, GcM95 e GcM96, também foram sintetizados para análise, mas não serviram como DNA parental para as bibliotecas. Estes genes possuem, cada, nove mutações acima da molécula pHPLT-BPN'-S78N-G97A-G128A-Y217Q original.

[00407] Os plasmídios originais (DNA molde) contendo os genes sintéticos GcM90-94, e GcM100 foram metilados usando dois microgramas de DNA e metilase (NEB), de acordo com o protocolo de NEB. O DNA metilado foi, então, purificado usando o kit DNA Clean and Concentrator (Zymo Research). As bibliotecas combinatórias CG1-5 e CG8 foram feitas usando um kit de mutagênese multi sítio-dirigida QUIKCHANGE® ("kit QCMS"; Stratagene) de acordo com o protocolo

do fabricante (vide Tabela 3-1 para as respectivas combinações de molde e iniciador), com a exceção das bibliotecas CG3 e CG4, que usaram 86,5 ng de cada iniciador em vez dos 50 ng sugeridos no protocolo. Todos os iniciadores usados para introduzir as substituições desejadas em cada biblioteca são mostrados na tabela 3-1. Eles foram sintetizados e fornecidos pela empresa Integrated DNA Technologies. Após as reações de QCMS terem terminado para cada biblioteca, o DNA molde foi digerido pela adição de 0,5 a 1 µl de *DpnI* (do kit QCMS) e incubado a 37°C durante 1 a 4 hours, seguido de outra adição de 0,5 a 1 µl de *DpnI* e outra incubação a 37°C durante 1 a 4 horas. Para a transformação eficaz de *B. subtilis*, o DNA das misturas de reação QCMS foram amplificados antes da transformação e os transformantes foram cultivados conforme descrito no exemplo 2.

[00408] Variantes adicionais de BPN'-v3+S78N foram produzidas por DNA2.0. Todas as substituições a seguir foram introduzidas individualmente na molécula original BPN'-v3+S78N: Q59G, N62Q, V68A, S89Y, A92G, I108V, I115V, M124T, P129L, A138T, V147L, S161P, Y167A, P172V, G211T, L267V, e A273S.

[00409] Todas as variantes da biblioteca combinatória descritas acima e as variantes sintetizadas no DNA2.0 foram testadas quanto ao desempenho de limpeza usando um teste em amostras de tecido com SLT na composição detergente 1 a 16°C e pH 8 e um teste em amostras de tecido com SLT na composição detergente 2 a 16°C e pH 8. O teor de proteína foi determinado usando o teste TCA. Os testes foram feitos conforme descrito no exemplo 1 e os índices de desempenho foram calculados em relação a BPN'-v3 (com um valor de PI de 1,0).

[00410] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem um valor de PI maior que 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, maior que

1,0 até cerca de 10, maior que 1,0 até cerca de 8, ou de mais que 1,0 a cerca de 5 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 1 a pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos BPN' (SEQ ID nº 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em S063T-S078N-G097A-S101A-G128A-S183T-Y217Q-T244N, N061A-S078N-G097A-G128A-Y217Q-S224A, S053G-S078N-G097A-G128A-P129T-Q185T-Y217Q, S063T-S078N-G097A-S101A-G128A-S183T-Y217Q, S063T-S078N-G097A-S101A-G128A-Y217Q, S063T-S078N-G097A-S101A-G128A-Y217Q-T244I, e S078N-G097A-G128A-P129T-Y217Q, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e um valor de PI maior que o de BPN' e BPN'-v3 neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e/ou um valor de PI maior que 1 a cerca de 5 em relação a BPN'-v3 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00411] Também é fornecida uma variante da protease subtilisina que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' e/ou um valor de PI maior que 1,0 a cerca de 5 em relação a BPN'-v3 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com SEQ ID nº 2, sendo que a variante compreende pelo menos uma substituição selecionada a partir do grupo de X040E, X053G, X059V, X061A, X062H/Q, X068A, X078N, X087E, X101A, X102A, X108V, X124I, X125A, X126V, X129T, X147Q, X159D, X183T, X185T, X211A, X224A, X244I/N, X252Q, e X274D, e, opcionalmente, pelo menos uma substituição selecionada a partir do grupo de X040E, X053G, X059V, X061A, X062H/Q, X068A, X078N, X087E, X101A, X102A, X108V, M124I, S125A, L126V, P129T, V147Q, S159D, S183T, Q185T, G211A, S224A, T244I/N, N252Q, e A274D, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência de SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00412] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 1 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos BPN' (SEQ ID nº 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em G097A-G128A-Y217Q, N061A-S078N-S087E-G097A-G128A-Y217Q-S224A, Q059V-S078N-G097A-G128A-G211A-Y217Q, Q059V-S078N-G097A-G128A-V147Q-

Y217Q, Q059V-S078N-G097A-G128A-Y217Q, Q059V-S078N-G097A-I108V-G128A-Y217Q-N252Q, S053G-S078N-G097A-G128A-P129T-Y217Q, S078N-G097A-G128A-G211A-Y217Q, S078N-G097A-G128A-Q185T-Y217Q, S078N-G097A-G128A-V147Q-Y217Q, S078N-G097A-G128A-Y217Q, S078N-G097A-G128A-Y217Q-S224A, e S078N-G097A-G128A-Y217Q-S224A-A274D, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e/ou um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00413] Determinou-se que a seguinte variante de BPN' possui um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 1 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID nº 2) compreendendo o conjunto de substituições de aminoácido S078N-

G097A-I108V-G128A-V147Q-Y217Q, sendo que as posições da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica, um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v3, e/ou atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência de SEQ ID nº 2 e compreendendo o dito conjunto de substituições de aminoácido acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00414] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que 0,9 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 1 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID nº 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em Q059V-S078N-G097A-I108V-G128A-V147Q-G211A-Y217Q-N252Q, S078N-G097A-I108V-G128A-V147Q-G211A-Y217Q, S078N-G097A-I108V-G128A-V147Q-G211A-Y217Q-N252Q, S078N-G097A-I108V-G128A-V147Q-Y217Q-N252Q, e S078N-S087E-G097A-M124I-G128A-Y217Q-S224A, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica.

A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência de SEQ ID nº 2 e pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00415] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem um valor de PI maior que 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, maior que 1,0 até cerca de 10, maior que 1,0 até cerca de 8, ou de mais que 1,0 a cerca de 5 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 2 a pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos BPN' (SEQ ID nº 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em S063T-S078N-G097A-S101A-G128A-S183T-Y217Q, S063T-S078N-G097A-S101A-G128A-S183T-Y217Q-T244N, S063T-S078N-G097A-S101A-G128A-Y217Q, e S063T-S078N-G097A-S101A-G128A-Y217Q-T244I, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma

variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e/ou um valor de PI maior que cerca de 1,0 a cerca de 5 em relação a BPN'-v3 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00416] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 2 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos BPN' (SEQ ID nº 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em G097A-G128A-Y217Q, N061A-S078N-G097A-G128A-Y217Q-S224A, N061A-S078N-S087E-G097A-G128A-Y217Q-S224A, Q059V-S078N-G097A-G128A-G211A-Y217Q, Q059V-S078N-G097A-G128A-V147Q-Y217Q, Q059V-S078N-G097A-G128A-Y217Q, Q059V-S078N-G097A-I108V-G128A-Y217Q-N252Q, S053G-S078N-G097A-G128A-P129T-Q185T-Y217Q, S053G-S078N-G097A-G128A-P129T-Y217Q, S078N-G097A-G128A-G211A-Y217Q, S078N-G097A-G128A-P129T-Y217Q, S078N-G097A-G128A-Q185T-Y217Q, S078N-G097A-G128A-Y217Q, S078N-G097A-G128A-Y217Q-S224A, e S078N-G097A-G128A-Y217Q-S224A-

A274D, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e/ou um valor de PI de cerca de 1 em relação a BPN'-v3 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00417] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 2 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID nº 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em S078N-G097A-G128A-V147Q-Y217Q e S078N-G097A-I108V-G128A-V147Q-Y217Q, sendo que as posições da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de

protease que tem atividade proteolítica, um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v3, e/ou atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 e pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpar um item ou superfície que precisa ser limpa utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00418] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que 0,9 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 2 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos BPN' (SEQ ID nº 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em Q059V-S078N-G097A-I108V-G128A-V147Q-G211A-Y217Q-N252Q, S078N-G097A-I108V-G128A-V147Q-G211A-Y217Q, S078N-G097A-I108V-G128A-V147Q-G211A-Y217Q-N252Q, S078N-G097A-I108V-G128A-V147Q-Y217Q-N252Q, e S078N-S087E-G097A-M124I-G128A-Y217Q-S224A, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98%

de identidade com a sequência de SEQ ID nº 2 e pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpar um item ou superfície que precisa ser limpa utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

Exemplo 4

Geração e desempenho de limpeza das variantes de BPN'

Geração das variantes de BPN' LC1-LC4 através de mutagênese multi-sítio-dirigida QUIKCHANGE®

[00419] Variantes de BPN' foram construídas a partir de diferentes plasmídios originais usando kits de mutagênese multi-sítio-dirigida QUIKCHANGE®. Os plasmídios originais (tabela 4-1) foram metilados usando um kit de Dam metilase da NEB em uma reação contendo 77,5 µL de H₂O + 10 µL de tampão 10X + 0,25 µL de SAM + 2 µL de DAM metilase + 10 µL de DNA miniprep (~150 ng/µL) a 37°C de um dia para o outro. O DNA plasmidial metilado foi purificado usando um kit de purificação por PCR QIAGEN®. Reações de mutagênese multi-sítio-dirigida QUIKCHANGE® foram estabelecidas para cada um dos moldes de DNA em uma mistura de reação contendo 2,5 µL de tampão 5X + 0,5 µL de iniciador 1 (25 µM) + 0,5 µL de iniciador 2 (25 µM) + 1 µL de dNTP's + 1 µL de mistura de enzima + 18 µL de H₂O + 1,5 µL de DNA. O programa de PCR usado foi: 95°C durante 1 minuto; (95°C durante 1 minuto, 53°C durante 1 minuto, 65°C durante 9:39 min) x 29 ciclos; 65°C durante 10 minutos, manutenção a 4°C. As sequências dos iniciadores são mostradas na tabela 4-2. Em todas as reações, a PCR foi feita usando um termociclador MJ Research PTC-200 Peltier. O DNA parental

das amostras de PCR foi removido pela adição de 1 µL de *DpnI* às reações de mutagênese multi sítio-dirigida QUIKCHANGE® a 37°C de um dia para o outro. Para aumentar a frequência de transformação, as reações digeridas por *DpnI* foram amplificadas usando amplificação por círculo rolante (RCA) com o uso do kit Illustra TempliPhi de acordo com o protocolo do fabricante. Células de *B. subtilis* ($\Delta aprE$, $\Delta nprE$, $amyE::xylRPxylAcomK-phleo$) foram transformadas com 1 µL de cada reação de RCA e as células transformadas foram plaqueadas sobre placas de LA + 1,6% de leite desnatado contendo 10 ppm de neomicina e incubadas a 37°C de um dia para o outro. Colônias da cultura de um dia para o outro foram selecionadas para a execução de PCR de colônia para sequenciamento usando "puReTaq Ready-To-Go PCR Beads" (Amersham). Os iniciadores usados para a reação de PCR e de sequenciamento foram pHPLT F1 (/5PHOS/TACATATGAGTTATGCAGTTTG (SEQ ID n° 54)) e pHPLT seq R1 (/5PHOS/TTATCCTTTACCTTGTCTC (SEQ ID N° 55)). Os clones com as sequências adequadas foram congelados. Proteínas variantes de BPN' foram produzidas pelo cultivo de transformantes de *B. subtilis* em placas de microtitulação de 96 poços a 37°C durante 68 horas em um meio á base de MOPS contendo ureia conforme descrito no exemplo 2.

Tabela 4-1. Plasmídios originais e iniciadores usados para a geração das variantes de BPN' LC1-LC4		
Plasmídio original	Mutações introduzidas	Iniciadores usados
BPN'-G097A-G128A-Y217Q-S024G-N025G-N061P-S101N (chamado LC1)	A128S	A128Sf, A128Sr
BPN'-G097A-G128A-Y217Q-S053G-N061P-S101N-V203Y (chamado LC2)	A128S	A128Sf, A128Sr
BPN'-G097A-G128A-Y217Q-S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-S101N-V203Y (chamado LC3)	A128S	A128Sf, A128Sr
BPN'-G097A-G128A-Y217Q-S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-S101N-V203Y (chamado LC4)	P55T	P55Tf, P55Tr

Tabela 4-2. Sequências dos iniciadores usados para as reações de mutagênese multissítio-dirigida QUIKCHANGE® para fazer as variantes de BPN' LC1-LC4	
Nome do iniciador	Sequência do iniciador (5' para 3')
A128Sf	/5Phos/CAACATGAGCCTGGGATCACCAAGCGGCAGTG CGG (SEQ ID n° 56)
A128Sr	/5Phos/CCGCACTGCCGCTTGGTGATCCCAGGCTCATG TTG (SEQ ID n° 57)
P55Tf	/5Phos/CTATGGTGCCGGGCGAAACAAACCCGTTTCAA GATCCG (SEQ ID n° 58)
P55Tr	/5Phos/CGGATCTTGAAACGGGTTTGTTCGCCCGGCA CCATAG (SEQ ID n° 59)

Geração das variantes de BPN' LC5-LC37 adicionais

[00420] 33 variantes de BPN' adicionais chamadas sucessivamente de LC5 a LC37 foram produzidas pela empresa DNA 2.0 usando do ácido nucleico de BPN' como o gene original contido no plasmídio de expressão "pHPLT-BPN' parcial opt" (vide figura 3). As variantes de BPN' LC5 a LC37 são as seguintes, respectivamente: BPN'-P52L-V68A-G97A-I111V, BPN'-I111V-M124V-Y167A-Y217Q, BPN'-Y104N-G128A-Y217Q, BPN'-M124V-Y167A-Y217Q, BPN'-I111V-M124V-Y217Q, BPN'-P52L-V68A-G97A, BPN'-G97A-I111V-M124V, BPN'-V68A-A92G-G97A, BPN'-G97A-I111V-M124V-Y167A-Y217Q, BPN'-P52L-V68A-I111V-Y217Q, BPN'-P52L-V68A-I111V, BPN'-V68A-A92G-I111V, BPN'-P52L-V68A-G97A-I111V-Y217Q, BPN'-V68A-G97A-I111V, BPN'-G97A-I111V-Y217Q, BPN'-G97A-I111V-M124V-Y167A, BPN'-S89Y-I111V-M124V, BPN'-V68A-S89Y-I111V, BPN'-V68A-A92G-Y217Q, BPN'-I111V-Y167A-Y217Q, BPN'-G97A-I111V-Y167A-Y217Q, BPN'-G97A-I111V-M124V-Y217Q, BPN'-V68A-I111V-Y167A-Y217Q, BPN'-I111V-G128A-Y217Q, BPN'-G97A-M124V-Y217Q, BPN'-V68A-Y167A-Y217Q, BPN'-I111V-M124V-Y167A, BPN'-N62Q-G97A-I111V, BPN'-G97A-M124V-Y167A-Y217Q, BPN'-G97A-L126A-Y217Q, BPN'-V68A-I111V-Y217Q, BPN'-S89Y-M124V-Y217Q, e BPN'-L96T-G97A-

Y217Q. O plasmídio pHPLT-BPN' parcial opt também foi criado pela empresa DNA 2.0.

[00421] Os transformantes foram selecionados em placas de microtitulação e cultivados conforme descrito no Exemplo 2. As variantes foram testadas quanto ao desempenho de limpeza usando de um teste em amostras de tecido com SLT na composição detergente 2 a 16°C e pH 8. O teor de proteína foi determinado usando o teste TCA. Os testes foram feitos conforme descrito no exemplo 1 e os índices de desempenho foram calculados em relação a BPN'-v3 (com um valor de PI de 1,0).

[00422] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem um valor de PI maior que 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, maior que 1,0 até cerca de 10, maior que 1,0 até cerca de 8, ou de mais que 1,0 a cerca de 5 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 2 a pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID n° 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em G097A-I111V-M124V-Y217Q, G097A-I111V-Y167A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-G097A-S101N-G128S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128S-V203Y-Y217Q, e V068A-A092G-Y217Q, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID n° 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID n° 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID n° 2) e/ou um valor de

PI maior que 1,0 a cerca de 5 em relação a BPN'-v3 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também é fornecida uma variante de protease subtilisina que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' e/ou um valor de PI maior que 1,0 a cerca de 5 em comparação a BPN'-v3 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com SEQ ID nº 2, sendo que a variante compreende pelo menos uma substituição selecionada a partir do grupo de X024G, X025G, X052L, X053G, X055P, X061P, X062Q, X068A, X089Y, X092G, X096T, X097A, X101N, X104N, X111V, X124V, X126A, X128A/S, X167A, X203Y, e X217Q, e, opcionalmente, pelo menos uma substituição selecionada a partir do grupo de S024G, N025G, P052L, S053G, T055P, N061P, N062Q, V068A, S089Y, A092G, L096T, G097A, S101N, Y104N, I111V, M124V, L126A, G128A/S, Y167A, V203Y, e Y217Q, e sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência de SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00423] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 2 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID nº 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em G097A-G128A-Y217Q, G097A-G128S-Y217Q, G097A-I111V-Y217Q, I111V-G128A-Y217Q, I111V-M124V-Y167A, I111V-M124V-Y217Q, L096T-G097A-Y217Q, N062Q-G097A-I111V, S053G-N061P-G097A-S101N-G128S-V203Y-Y217Q, S089Y-M124V-Y217Q, e V068A-I111V-Y217Q, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e/ou um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2), um valor de PI maior que o de BPN', e um valor de PI de cerca de 1,0 em comparação a BPN'-v3 neste teste. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente

documento.

[00424] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 2 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID n° 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em G097A-I111V-M124V, G097A-L126A-Y217Q, G097A-M124V-Y217Q, I111V-Y167A-Y217Q, M124V-Y167A-Y217Q, P052L-V068A-G097A, S089Y-I111V-M124V, V068A-A092G-G097A, V068A-A092G-I111V, V068A-G097A-I111V, V068A-S089Y-I111V, e Y104N-G128A-Y217Q, sendo que as posições da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID n° 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica, um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v3, e/ou atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID n° 2 e pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência SEQ ID n° 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00425] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que 0,9 em

relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 2 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID nº 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em G097A-M124V-Y167A-Y217Q, V068A-Y167A-Y217Q, G097A-I111V-M124V-Y167A, I111V-M124V-Y167A-Y217Q, V068A-I111V-Y167A-Y217Q, G097A-I111V-M124V-Y167A-Y217Q, e P052L-V068A-I111V, sendo que as posições da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência de SEQ ID nº 2 e pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

Exemplo 5

Desempenho de limpeza das variantes de BPN'

[00426] Variantes com base em BPN' original foram feitas pela empresa DNA 2.0. As variantes foram cultivadas conforme descrito no exemplo 2 e testadas quanto ao desempenho de limpeza no teste em amostras de tecido com SLT na composição detergente 1 a 16°C e pH 8, no teste em amostras de tecido com SLT na composição detergente

4 a 16°C e pH 8, e no teste em pequena amostra de tecido com ovo na composição detergente 4 a 16°C e pH 8. O teor de proteína foi determinado usando o teste TCA. Os testes foram feitos conforme descrito no exemplo 1 e os índices de desempenho foram calculados em relação a BPN'-v3 (com um valor de PI de 1,0).

[00427] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem um valor de PI maior que 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, maior que 1,0 até cerca de 10, maior que 1,0 até cerca de 8, ou de mais que 1,0 a cerca de 5 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 a pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID n° 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-G128S-Y217Q, e S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-I111V-G128S-Y217Q, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID n° 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID n° 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID n° 2) e/ou um valor de PI maior que 1,0 a cerca de 5 em relação a BPN'-v3 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID n° 2 e compreendendo pelo menos um conjunto

de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00428] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID nº 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em G097A-G128A-Y217Q, G097A-G128A-P210S-Y217Q, G097A-G128S-P210S-Y217Q, G097A-I111V-M124I-Y217Q, G097A-I111V-M124V-P210S-Y217Q, G097A-N123Q-P210S-Y217Q, G097A-N123Q-Y217Q, N061P-G097A-G128A-P210S-Y217Q, N061P-G097A-G128S-Y217Q, N061P-G097A-I111V-M124V-Y217Q, N061P-G097A-N123Q-Y217Q, N061P-G097A-S101N-I111V-M124V-Y217Q, N061P-G097A-S101N-N123Q-Y217Q, N061P-G102A-P129S-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100N-S101N-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100N-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100Q-P210S-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-I111V-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-S101N-I111V-Y217Q, N061P-S078N-G097A-I111V-M124I-Y217Q, N061P-S078N-G102A-I111V-P129S-Y217Q, N062Q-G097A-I111V-P210S-Y217Q, N062Q-G097A-I111V-Y217Q, N062Q-S078N-G097A-I111V-Y217Q, S024G-N025G-N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-I111V-M124V-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-N123Q-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-N062Q-

G097A-G100N-S101N-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-N062Q-G097A-S101N-I111V-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S101N-G102A-P129S-Y217Q, S053G-N061P-G097A-G128S-Y217Q, S053G-N061P-G097A-M124I-Y217Q, S053G-N061P-G097A-S101N-I111V-M124V-Y217Q, S053G-N061P-G102A-P129S-P210S-Y217Q, S053G-N061P-G102A-P129S-Y217Q, S053G-N061P-N062Q-G097A-G100N-S101N-Y217Q, S053G-N061P-N062Q-G097A-S101N-I111V-Y217Q, S053G-N061P-S101N-G102A-P129S-Y217Q, S053G-S078N-G097A-I111V-G128S-Y217Q, S078N-G097A-G128S-Y217Q, e S078N-G097A-I111V-M124V-Y217Q, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e/ou um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00429] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' pos-

suem um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID nº 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em N061P-G097A-M124I-Y217Q, N061P-G097A-M124V-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100D-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100Q-S101N-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100Q-Y217Q, N061P-N062Q-G100N-G102A-Y217Q, N061P-N062Q-S078N-G097A-G100N-I111V-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-M124I-Y217Q, S053G-N061P-G097A-S101N-M124I-Y217Q, e S053G-N061P-G097A-S101N-N123Q-Y217Q, sendo que as posições da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica, um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v3, e/ou atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 e pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00430] Também é fornecida uma variante de protease subtilisina que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' e/ou um valor de PI maior que 1,0 a cerca de 5 em comparação a

BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 1 ou 4 em pH 8 e 16°C, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com SEQ ID n° 2, sendo que a variante compreende pelo menos uma substituição selecionada a partir do grupo de X024G, X025G, X053G, X061P, X062Q, X078N, X097A, X100D/N/Q, X101N, X102A, X111V, X123A/Q/V, X124I/V, X128A/S, X129S, X210S, X217Q, e, opcionalmente, pelo menos uma substituição selecionada a partir do grupo de S024G, N025G, S053G, N061P, N062Q, S078N, G097A, G100D/N/Q, S101N, G102A, I111V, N123A/Q/V, M124I/V, G128A/S, P129S, P210S, e Y217Q, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência de SEQ ID n° 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID n° 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00431] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que 0,9 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID n° 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em G097A-N123A-Y217Q, G097A-N123V-Y217Q, N061P-G102A-G128S-Y217Q, N061P-S101N-G102A-G128S-Y217Q, Y217Q, S078N-G097A-I111V-N123Q-Y217Q, e G102A-N123Q-Y217Q, sendo que as posições da variante são numeradas por correspondência com as po-

sições da sequência SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência de SEQ ID nº 2 e pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00432] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem um valor de PI maior que 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, maior que 1,0 até cerca de 10, maior que 1,0 até cerca de 8, ou de mais que 1,0 a cerca de 5 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 1 a pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID nº 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em N061P-G097A-G128S-Y217Q, N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-S101N-I111V-Y217Q, S024G-N025G-N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-G128S-Y217Q, e S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-I111V-G128S-Y217Q, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais va-

riantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e/ou um valor de PI maior que 1,0 a cerca de 5 em relação a BPN'-v3 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00433] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 1 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID nº 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em G097A-G128A-Y217Q, G097A-G128A-P210S-Y217Q, G097A-G128S-P210S-Y217Q, G097A-I111V-M124I-Y217Q, G097A-I111V-M124V-P210S-Y217Q, G097A-N123Q-P210S-Y217Q, G097A-N123Q-Y217Q, N061P-G097A-G128A-P210S-Y217Q, N061P-G097A-I111V-M124V-Y217Q, N061P-G097A-M124V-Y217Q, N061P-G097A-N123Q-Y217Q, N061P-G097A-S101N-I111V-M124V-Y217Q, N061P-G102A-P129S-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100N-S101N-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100Q-

Y217Q, N061P-N062Q-G097A-I111V-Y217Q, N061P-N062Q-S078N-G097A-G100N-I111V-Y217Q, N061P-S078N-G097A-I111V-M124I-Y217Q, N061P-S078N-G102A-I111V-P129S-Y217Q, N062Q-G097A-I111V-P210S-Y217Q, N062Q-G097A-I111V-Y217Q, N062Q-S078N-G097A-I111V-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-I111V-M124V-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-N123Q-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-N062Q-G097A-G100N-S101N-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-N062Q-G097A-S101N-I111V-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S101N-G102A-P129S-Y217Q, S053G-N061P-G097A-G128S-Y217Q, S053G-N061P-G102A-P129S-P210S-Y217Q, S053G-N061P-G102A-P129S-Y217Q, S053G-N061P-N062Q-G097A-S101N-I111V-Y217Q, S053G-N061P-S101N-G102A-P129S-Y217Q, S053G-S078N-G097A-I111V-G128S-Y217Q, S078N-G097A-G128S-Y217Q, e S078N-G097A-I111V-M124V-Y217Q, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e/ou um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo

pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00434] Determinou-se que as seguintes variantes BPN' possuem um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 1 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID nº 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em N061P-G097A-M124I-Y217Q, N061P-G097A-S101N-N123Q-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100N-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100Q-P210S-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100Q-S101N-Y217Q, N061P-N062Q-G100N-G102A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-M124I-Y217Q, S053G-N061P-G097A-M124I-Y217Q, S053G-N061P-G097A-S101N-I111V-M124V-Y217Q, S053G-N061P-G097A-S101N-M124I-Y217Q, S053G-N061P-G097A-S101N-N123Q-Y217Q, e S053G-N061P-N062Q-G097A-G100N-S101N-Y217Q, sendo que as posições da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica, um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v3, e/ou atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 e pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza,

compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00435] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que 0,9 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 1 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID nº 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em G097A-N123A-Y217Q, G097A-N123V-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100D-Y217Q, N061P-S101N-G102A-G128S-Y217Q, Y217Q, N061P-G102A-G128S-Y217Q, S078N-G097A-I111V-N123Q-Y217Q, e G102A-N123Q-Y217Q, sendo que as posições da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência de SEQ ID nº 2 e pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00436] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem um valor de PI maior que 1,0 a cerca de 5 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza em pequena amostra de tecido com

ovo na composição detergente 4 a 16°C e pH 8: Sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID nº 2) compreendendo o conjunto de substituições de aminoácido N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e/ou um valor de PI maior que 1,0 a cerca de 5 em relação a BPN'-v3 neste teste de limpeza em pequena amostra de tecido com ovo, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade à sequência da SEQ ID nº 2 e compreendendo as substituições de aminoácido N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00437] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza em pequena amostra de tecido com ovo na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID nº 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em G097A-G128A-Y217Q, N061P-G102A-P129S-Y217Q, N062Q-G097A-I111V-P210S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-G128A-

P210S-Y217Q, S024G-N025G-N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q, N061P-G097A-G128A-P210S-Y217Q, G097A-G128S-P210S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-I111V-G128S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-G128S-Y217Q, N061P-G097A-G128S-Y217Q, e G097A-G128A-P210S-Y217Q, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e/ou um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3 neste teste de limpeza de amostras de tecido com ovo, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00438] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem um valor de PI igual a ou maior que 0,5 e igual a ou menor que 0,9 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza em pequena amostra de tecido com ovo na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID nº 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do

grupo que consiste em N061P-G097A-M124I-Y217Q, S053G-N061P-G097A-S101N-N123Q-Y217Q, S053G-N061P-G102A-P129S-P210S-Y217Q, G097A-I111V-M124V-P210S-Y217Q, G097A-N123Q-P210S-Y217Q, S053G-N061P-S101N-G102A-P129S-Y217Q, S053G-N061P-N062Q-G097A-S101N-I111V-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-S101N-I111V-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-I111V-Y217Q, N062Q-G097A-I111V-Y217Q, N061P-G097A-S101N-I111V-M124V-Y217Q, G097A-N123Q-Y217Q, N061P-G097A-I111V-M124V-Y217Q, S078N-G097A-I111V-M124V-Y217Q, S053G-S078N-G097A-I111V-G128S-Y217Q, S078N-G097A-G128S-Y217Q, S053G-N061P-G097A-G128S-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100N-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-N123Q-Y217Q, N061P-G097A-S101N-N123Q-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100Q-P210S-Y217Q, N061P-G097A-N123Q-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-M124I-Y217Q, S053G-N061P-G097A-S101N-M124I-Y217Q, S053G-N061P-G097A-M124I-Y217Q, N061P-S078N-G097A-I111V-M124I-Y217Q, N061P-G097A-M124V-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-N062Q-G097A-G100N-S101N-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S101N-G102A-P129S-Y217Q, N061P-S078N-G102A-I111V-P129S-Y217Q, S053G-N061P-G102A-P129S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-N062Q-G097A-S101N-I111V-Y217Q, N062Q-S078N-G097A-I111V-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-I111V-M124V-Y217Q, S053G-N061P-G097A-S101N-I111V-M124V-Y217Q, G097A-I111V-M124I-Y217Q, Y217Q, N061P-N062Q-G100N-G102A-Y217Q, S053G-N061P-N062Q-G097A-G100N-S101N-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100N-S101N-Y217Q, N061P-N062Q-S078N-G097A-G100N-I111V-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100Q-Y217Q, N061P-S101N-G102A-G128S-Y217Q, G097A-N123V-Y217Q, G097A-N123A-Y217Q, G102A-N123Q-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100Q-S101N-Y217Q, S078N-G097A-I111V-N123Q-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100D-Y217Q, e

N061P-G102A-G128S-Y217Q, sendo que as posições da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica e/ou um valor de PI igual a ou maior que 0,5 e igual a ou menor que 0,9 em relação a BPN'-v3 neste teste de limpeza em pequena amostra de tecido com ovo, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 e pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00439] Também é fornecida uma variante de protease subtilisina que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' e/ou um valor de PI maior que 1,0 a cerca de 5 em comparação a BPN'-v3 neste teste de limpeza em pequena amostra de tecido com ovo na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com SEQ ID nº 2, sendo que a variante compreende pelo menos uma substituição selecionada a partir do grupo de X024G, X025G, X053G, X061P, X062Q, X078N, X097A, X100D/N/Q, X101N, X102A, X111V, X123A/Q/V, X124I/V, X128A/S, X129S, X210S, e X217Q, e, opcionalmente, pelo menos uma substituição selecionada a partir do grupo de S024G, N025G, S053G, N061P, N062Q, S078N, G097A,

G100D/N/Q, S101N, G102A, I111V, N123A/Q/V, M124I/V, G128A/S, P129S, P210S, e Y217Q, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência de SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

Exemplo 6

Construção e desempenho de limpeza das variantes de BPN'

[00440] Uma biblioteca combinatória de BPN' com base na BPN' original foi produzida através de DNA2.0 e entregue como uma reação de ligação. Para a transformação eficaz de *B. subtilis*, o DNA das misturas de reação de ligação foi amplificado antes da transformação e os transformantes foram cultivados conforme descrito no exemplo 2. Estas variantes foram testadas quanto ao desempenho usando o teste em amostras de tecido com SLT na composição detergente 1 e na composição detergente 4 a 16°C e pH 8 assim como no teste em pequena amostra de tecido com ovo na composição detergente 4 a 16°C e pH 8. O teor de proteína foi determinado usando o teste de TCA a atividade da protease foi testado usando o teste AAPF. Os testes foram feitos conforme descrito no exemplo 1 e os índices de desempenho foram calculados em relação a BPN'-v3 (com um valor de PI de 1,0).

[00441] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem um valor de PI maior que 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, maior que

1,0 até cerca de 10, maior que 1,0 até cerca de 8, ou de mais que 1,0 a cerca de 5 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 1 a pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID nº 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S038G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-N061P-S078N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N061P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-N061P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-S053G-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-T055P-N061P-G097A-G128A-Y217Q, S053G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S053G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q-S249N, S053G-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S053G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S053G-T055P-G097A-

S101N-G128A-Y217Q, S053G-T055P-N061P-S101N-G128A-Y217Q, S053G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, e T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e/ou um valor de PI maior que 1,0 a cerca de 5 em relação a BPN'-v3 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2.

[00442] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 1 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID nº 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em G097A-G128S-Y217Q, G097A-G128A-Y217Q, N025G-S078N-G097A-G128A-Y217Q, N025G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-I035V-T055P-N061P-S078N-G097A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A, S024G-N025G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-G128A-

S130G-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-Y217Q, S024G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S038G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A, S024G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S101N-G128A-Y217Q, T055P-N061P-G097A-A116S-G128A, e T055P-N061P-S078N-G128A-Y217Q, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e/ou um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por

exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

Também é fornecida uma variante de protease subtilisina que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' e/ou um valor de PI maior que 1,0 a cerca de 5 em comparação a BPN'-v3 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 1 at pH 8 e 16°C, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com SEQ ID nº 2, sendo que a variante compreende pelo menos uma substituição selecionada a partir do grupo de X024G, X025G, X035V, X038G, X053G, X055P, X061P, X078N, X097A, X101N, X116S, X128A/S, X130G, X216Q, X217Q, e X249N, e, opcionalmente, pelo menos uma substituição selecionada a partir do grupo de S024G, N025G, I035V, S038G, S053G, T055P, N061P, S078N, G097A, S101N, A116S, G128A/S, S130G, Y216Q, Y217Q, e S249N, e sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência de SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00443] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem um valor de PI maior que 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, maior que 1,0 até cerca de 10, maior que 1,0 até cerca de 8, ou de mais que 1,0

a cerca de 5 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 a pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID n° 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em S024G-N025G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S053G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, e T055P-N061P-S078N-G128A-Y217Q, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID n° 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID n° 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID n° 2) e/ou um valor de PI maior que 1,0 a cerca de 5 em relação a BPN'-v3 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID n° 2 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID n° 2.

[00444] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'

(SEQ ID nº 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em G097A-G128S-Y217Q, G097A-G128A-Y217Q, N025G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S038G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-N061P-S078N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S078N-G097A-G128A-Y217Q, N025G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, N061P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-I035V-T055P-N061P-S078N-G097A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A, S024G-N025G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-G128A-S130G-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S038G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-N061P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-S053G-N061P-

S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-S053G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-T055P-N061P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A, S024G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S053G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q-S249N, S053G-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S053G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S053G-T055P-N061P-S101N-G128A-Y217Q, S053G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S101N-G128A-Y217Q, T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, e T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e/ou um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo

menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00445] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID nº 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em T055P-N061P-G097A-A116S-G128A e S024G-N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-Y217Q, sendo que as posições da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica e podem ter atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica, um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v3, e/ou atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 e pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00446] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem um valor de PI maior que 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo

menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de maios que 1,0 a cerca de 10, de maios que 1,0 a cerca de 8, ou de maios que 1,0 a cerca de 5 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza em pequena amostra de tecido com ovo na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID n° 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N061P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-N061P-S078N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S053G-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, e S024G-N025G-S053G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID n° 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID n° 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID n° 2) e/ou um valor de PI maior que 1,0 a cerca de 5 em relação a BPN'-v3 neste teste de limpeza de amostras de tecido com ovo, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID n° 2 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas

por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2.

[00447] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza em pequena amostra de tecido com ovo na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID nº 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em G097A-G128S-Y217Q, G097A-G128A-Y217Q, S024G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S053G-T055P-N061P-S101N-G128A-Y217Q, S053G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, T055P-N061P-S078N-G128A-Y217Q, N025G-S038G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, T055P-N061P-G097A-A116S-G128A, S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S053G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q,

N025G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-Y217Q, e S024G-I035V-T055P-N061P-S078N-G097A-Y217Q, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID n° 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID n° 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID n° 2) e/ou um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3 neste teste de limpeza de amostras de tecido com ovo, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID n° 2 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID n° 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza compreendendo utilizar pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00448] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza em pequena amostra de tecido com ovo na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID n° 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em S101N-G128A-Y217Q, S024G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A, S024G-N025G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A, S024G-T055P-N061P-

S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S053G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q-S249N, N025G-S053G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-N061P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-T055P-N061P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-S038G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S053G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S078N-G097A-G128A-Y217Q, e S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-G128A-S130G-Y217Q, sendo que as posições da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica, um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v3, e/ou atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 e pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00449] Determinou-se que a seguinte variante BPN' tem um valor de PI de cerca de 0,8 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza em pequena amostra de tecido com ovo na composição detergente 4

em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID nº 2) compreendendo as substituições de aminoácido S024G-S053G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, sendo que as posições da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica, um valor de PI de cerca de 0,8 em relação a BPN'-v3, e/ou atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 e compreendendo as substituições de aminoácido S024G-S053G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00450] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem um valor de PI maior que 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de mais que 1,0 a cerca de 10, de mais que 1 a cerca de 12, de mais que 4 a cerca de 12, de mais que 1,0 a cerca de 8, ou de mais que 1,0 a cerca de 5 em relação a BPN'-v3 em um teste AAPF proteolítico: Sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID nº 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em S024G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S101N-G128A-Y217Q, N025G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S053G-T055P-N061P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-T055P-N061P-G097A-

S101N-G128A, S053G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A, N061P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-S101N-G128A-Y217Q, N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, T055P-N061P-S078N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S038G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G128A-Y217Q, N025G-S053G-N061P-S078N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S053G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q-S249N, N025G-S053G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, T055P-N061P-G097A-A116S-G128A, S024G-N025G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, G097A-G128S-Y217Q, S024G-S053G-N061P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-

N061P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S053G-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-T055P-N061P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-S038G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S053G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S053G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, N025G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-S053G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S078N-G097A-G128A-Y217Q, e S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-G128A-S130G-Y217Q, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID n° 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação à protease BPN' (SEQ ID n° 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID n° 2) e/ou um valor de PI maior que 1,0 a cerca de 5 em relação a BPN'-v3 neste teste AAPF, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID n° 2 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID n° 2.

[00451] Determinou-se que a seguinte variante de BPN' tem um va-

lor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3 em um teste AAPF proteolítico: Sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID n° 2) compreendendo as substituições de aminoácido G097A-G128A-Y217Q, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID n° 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação à protease de BPN' (SEQ ID n° 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID n° 2) e/ou um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3 neste teste AAPF, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID n° 2 e compreendendo as substituições de aminoácido G097A-G128A-Y217Q, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID n° 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

Exemplo 7

Construção de bibliotecas de avaliação de sítio de BPN'-v36 e Desempenho de limpeza das variantes de BPN'-v36

Construção de bibliotecas de avaliação de sítio de BPN'-v36

[00452] A sequência de aminoácidos de BPN'-v36 está descrita na SEQ ID n° 6 abaixo:

AQSVPYGVVSQIKAPALHSQGYTGGNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGG
ASMVPGETNPFQDNNSHGTHVAGTVAALNNNIGVLGVAPSASLYAV
KVLGADGNGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSLGAPSGSAALKAAVD

KAVASGVVVVAAAGNEGTS GSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQR
 ASFSSVGPELDVMAPGVSIQSTLPGNKYGAQNGTSMASPHVAGAAA
 LILSKHPNWTNTQVRSSLENTTTKLGD SFYYGKGLINVQAAAQ (SEQ
 ID n° 6)

[00453] A sequência de ácido nucleico que codifica a variante de protease de BPN'-v36 é:

Gcgagtcgctgccttacggcgatcacaaattaaagccccctgctctgcactctcaaggctacact
 ggaggcaatgttaaagtagcgggtatcgacagcgggtatcgactcgagccatccagatcttaaagt
 cgctggaggggcttctatggtgccggggaacaaacccgttcaagataacaattctcatggca
 cacacgtcgaggaacgggtgcggcggttaaacaataattggcgtgcttggtgtagccccgtctg
 ctctgctctacgccgttaaagttcttgccgcagacggaaatggccaatactcatggattatcaacgg
 catcgaatgggcatcgcaataacatggatgtaatacaatgagcctgggagcaccaagcgg
 cagtgcggcacttaaagcagcagttgataaagctgttgcatctggtgtcgtagtagcggcagc
 tgggaatgagggaacatccggatcatcgagtaccgtcggttatccaggcaagtacccttcagtga
 ttgcagtgggctgtagactcttcaaatcaacgtgcctcttttctccgtgggaccggagctggat
 gtcatggcccctggcggttctattcaatcgacgcttccagggaacaagtatggtgcgcaaacggg
 acttccatggcctcgccgatgtagctggggcgggccgcatgtattcttctaagcaccggaactgga
 caaacactcaagtccgcagcagtttagaaaacaccactacaaaacttggtgattcttctactatgg
 aaaagggtgatcaacgtacaggcggcagctcag (SEQ ID n° 5)

[00454] A sequência de aminoácidos de BPN'-v36 pode ser representada por referência à sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' da SEQ ID n° 2. Isto é, BPN'-v36 pode ser representada como a sequência de subtilisina BPN' de SEQ ID n° 2 com as seis substituições de aminoácido S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q. A sequência de aminoácidos de BPN'-v36 pode ser designada convenientemente como BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q ou BPN'+S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q. Por todo este relatório descritivo, exceto onde indicado em contrário, cada posição de aminoácido de uma sequência de aminoácidos é numerada de acordo com a numeração de uma posição de aminoácido corres-

pondente na sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada na SEQ ID nº 2 conforme determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante com a sequência de aminoácidos da subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[00455] Bibliotecas de avaliação de sítio (SEs) foram criadas em cada posição de aminoácido única na proteína de BPN'-v36 madura (isto é, BPN'-S24G-S53G-S78N-S101N-G128A-Y217Q) por fusão por PCR.

[00456] Para cada códon a ser mutado na protease BPN'-v36, desenhou-se um par de iniciadores complementares parcialmente coincidentes (iniciadores de sentido direto (forward) e reverso (reverse) mutagênicos). Cada iniciador mutagênico continha o códon mutagênico NNS (N=A,C,G, ou T e S=G ou C) no centro flanqueado por pelo menos 15 nucleotídeos de cada lado. Para criar uma biblioteca em uma dada posição, duas reações de PCR foram executadas usando um iniciador comum de sentido direto flanqueador do gene (P4974, GCCTCACATTTGTGCCACCTA; SEQ ID Nº 60) e um iniciador de sentido reverso mutagênico de NNS, ou o iniciador comum de sentido reverso flanqueador do gene (P4976, CCTCTCGGTTATGAGTTAGTTC; SEQ ID Nº 61) e um iniciador de sentido direto de NNS mutagênico. Estas reações de PCR geraram dois fragmentos de PCR, um codificando a metade 5' do gene BPN'-v36 mutante (fragmento 5' do gene) e o outro codificando a metade 3' do gene de BPN'-v36 mutante (fragmento 3' do gene).

[00457] Cada reação de amplificação por PCR continha 30 pmol de cada iniciador e 100 ng do DNA molde original de BPN'-v36 (plasmídeo pHPLT-BPN'-v36, vide a figura 4). As amplificações foram executadas usando a Vent DNA polimerase (NEB). A reação de PCR (20 µL) foi inicialmente aquecida a 95°C durante 2,5 min, seguido de 30 ciclos de

desnaturação a 94°C durante 15 seg., anelamento a 55°C durante 15 seg. e extensão a 72°C durante 40 seg. Após a amplificação, os fragmentos 5' e 3' do gene foram purificados em gel pelo kit de purificação de bandas em gel QIAGEN®, misturados (50 ng de cada fragmento), misturados e amplificados por PCR novamente usando os iniciadores P4973 (AAAGGATCCTAATCGGCGCTTTTC; SEQ ID N° 62) e P4950 (CTTGTCTCCAAGCTTAAAATAAAA; SEQ ID N° 63) para gerar o fragmento do gene de extensão completa. As condições da PCR foram as mesmas descritas acima, com a exceção da fase de extensão, que foi executada a 72°C durante 2 minutos. O fragmento de DNA de extensão completa foi purificado em gel pelo kit de purificação de bandas em gel QIAGEN®, digerido pelas enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III e ligado com o vetor pHPLT-BPN' parcial opt que também foi digerido com as mesmas enzimas de restrição. As misturas de ligação foram amplificadas usando amplificação por círculo rolante em um kit Illustra Templiphi de acordo com a recomendação do fabricante (GE Healthcare) para gerar DNA multimérico para a transformação em *Bacillus subtilis*. Para este propósito, 1 µl da mistura de ligação foi misturado com 5 µl do tampão de amostra, aquecido até 95°C durante 3 min e resfriado sobre gelo. A seguir, 5 µl do tampão de reação e 0,2 µl da enzima foram adicionados a cada tubo, seguido de incubação a 30°C durante 10 horas. Os produtos da amplificação por círculo rolante foram diluídos 100 vezes e usados para transformar células de *B. subtilis* (Δ aprE, Δ nprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo). Uma alíquota da mistura de transformação foi plaqueada sobre placas de meio LB contendo 1,6% de leite desnatado e 10 µg/mL de neomicina e a placa foi incubada de um dia para o outro a 37°C. Subsequentemente, as colônias com halos foram inoculadas em 150 µl de meio LB contendo 10 µg/mL de neomicina. No dia seguinte, as culturas foram congeladas com 15% de glicerol ou foram cultivadas em meio MBD para análise bioquímica,

conforme descrito no exemplo 2.

Desempenho de limpeza das variantes de BPN'-v36

[00458] As variantes de proteína da SEL de BPN'-v36 foram testadas quanto ao desempenho de limpeza usando um teste em amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 a 16°C e pH 8 e no teste em pequena amostra de tecido com ovo na composição detergente 4 a 16°C e pH 8. O teor de proteína foi determinado usando o teste TCA. Os testes foram feitos conforme descrito no exemplo 1 e os índices de desempenho foram calculados em relação a BPN'-v36 (isto é, BPN'-S24G-S53G-S78N-S101N-G128A-Y217Q) (com um valor de PI de 1,0).

[00459] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI maior que 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, maior que 1,0 até cerca de 10, maior que 1,0 até cerca de 8, ou maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 a pH 8 e 16°C: BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID n° 6) (isto é, BPN'-v36) compreendendo pelo menos uma substituição de aminoácido selecionada do grupo que consiste em A116V, G160S, I111L, I115V, N109S, N117M, P005G, Q059V, T164S, Y262M, A015Q, A015S, A098E, A098N, A098S, A098T, A098V, A098Y, A114S, A114T, A116G, A116L, A116S, A116T, A116W, A133G, A133H, A133T, A133V, A137G, A137I, A137L, A137S, A137T, A138S, A216E, A216F, A216V, D099S, D181E, F261A, F261Q, G024F, G024I, G024Q, G024Y, G097S, G160T, G211L, G211V, H017F, H017W, H039V, H226A, I031V, I111V, I268V, K170R, K265R, L016Q, L016T, L135M, L209T, L209V, L233M, L257T, L257V, L267A, L267V, N025A, N025I, N025Q, N025R, N025T, N025V, N101I, N101Q, N101S,

N109A, N109G, N109H, N109L, N109M, N109Q, N109T, N117Q, N184A, N184L, N184T, N184W, N212G, N212L, N212V, N243P, N252G, N252M, P005T, P014S, P040G, P040L, P040Q, P129A, P129S, P172G, P172S, P194Q, P210A, P210S, Q185F, Q185G, Q185I, Q185M, Q185N, Q185S, Q275H, R186K, S009A, S009G, S009H, S009M, S018T, S130T, S132N, S145K, S159T, S161I, S161K, S161N, S161T, S162I, S162M, S162Y, S163G, S182F, S182G, S182V, S182W, S183F, S183L, S183M, S183T, S183V, S183W, S224A, S236T, S249V, T022A, T022G, T022Q, T022V, T208V, T242S, T253N, T253S, T254A, T254S, T255L, T255S, T255V, V004A, V004P, V004W, V084C, V139C, V165M, V203F, Y021K, Y021N, Y021T, Y021V, Y167F, Y171F, Y214F, Y262F, e Y262T, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID n° 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID n° 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID n° 2), atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN'-v3 e BPN'-v36, um valor de PI maior que o de BPN'-v3, e/ou um valor de PI maior que 1 a cerca de 5 em relação a BPN'-v36 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a sequência da SEQ ID n° 2 ou SEQ ID n° 6 e compreendendo pelo menos uma, duas, três, quatro, cinco, seis ou mais substituições de aminoácido selecionadas a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID n° 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se

limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00460] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID n° 6) compreendendo pelo menos uma substituição de aminoácido selecionada do grupo que consiste em A001G, A001Y, A013G, A013V, A015F, A015G, A015K, A015M, A015P, A015T, A015W, A015Y, A029G, A073S, A088C, A088I, A088L, A088T, A088V, A098D, A098K, A098P, A098R, A098W, A116D, A116E, A116R, A128S, A133L, A133M, A133S, A134G, A134S, A137N, A137V, A144M, A144Q, A144S, A144T, A144V, A151C, A176S, A176T, A179S, A216G, A216L, A216P, A216Q, A216S, A216T, A216Y, A228T, A230C, A231C, A272I, A272L, A272Q, A272S, A272T, A272W, A273S, A274G, A274L, A274Q, A274T, A274V, D041E, D099G, D099N, D120A, D120K, D120Q, D120R, D120S, D140E, D181S, D259E, E054D, E156D, E156T, E251V, F261G, F261H, F261L, F261R, F261S, F261T, F261V, F261W, G007A, G007S, G020A, G020D, G020S, G024N, G024R, G024S, G024T, G024V, G024W, G053H, G053K, G053N, G053T, G097A, G097D, G097T, G131A, G131H, G131P, G131Q, G131T, G131V, G160H, G160P, G166A, G166S, G166T, G211A, G211D, G211M, G211N, G211P, G211Q, G211R, G211W, G215A, G215N, G215V, H017L, H017M, H017T, H017V, H017Y, H039A, H039C, H039N, H226F, H226I, H226M, H226S, H226V, H226Y, I035V, I079A, I079S, I079T, I079V, I079W, I108V, I115L, I122A, I234L, I234V, K012R, K027R, K136R, K141F, K213W, K237R,

K256R, K265Q, L016A, L016F, L016I, L016S, L016V, L042I, L075A, L075M, L075Q, L075V, L075Y, L082K, L082M, L082Q, L082V, L090I, L196I, L196V, L209Q, L209W, L233A, L233Q, L233V, L235I, L235K, L250I, L257A, L257H, L257Q, L257S, L257Y, L267Q, L267R, L267S, L267T, M199V, N025F, N025G, N025H, N025K, N025L, N025M, N025S, N025Y, N061F, N061H, N061P, N061S, N061T, N061V, N061W, N076G, N076W, N078S, N078T, N078V, N101A, N101H, N101L, N101T, N109K, N109R, N117A, N117E, N117H, N117K, N118G, N184G, N184H, N184I, N184S, N184V, N212A, N212F, N212I, N212K, N212P, N212Q, N212S, N212Y, N218A, N218H, N218L, N218S, N240E, N240H, N240L, N240R, N240T, N243A, N243Q, N243T, N243V, N252A, N252K, N252L, N252Q, N252R, N252S, N252T, N269Q, N269S, P014G, P014Q, P014T, P040A, P040H, P040S, P040T, P040V, P040Y, P086A, P086C, P086F, P086H, P086S, P129D, P129G, P129K, P129T, P172A, P172Q, P194A, P194G, P194L, P194M, P194S, P194V, P194Y, P210G, P210R, P210V, Q002A, Q002S, Q010A, Q010F, Q010H, Q010I, Q010L, Q010N, Q010S, Q010T, Q019A, Q019G, Q019N, Q019S, Q019T, Q019V, Q019W, Q059I, Q103L, Q103S, Q185A, Q185H, Q185L, Q185T, Q185Y, Q206P, Q206S, Q206Y, Q217I, Q217N, Q217S, Q217T, Q245K, Q275D, Q275S, Q275W, S003A, S003G, S003H, S003M, S003P, S003Q, S003T, S003V, S009I, S009L, S009P, S009T, S009W, S018A, S018G, S018I, S018L, S018M, S018N, S018P, S018V, S018W, S033T, S037Q, S037T, S037V, S038G, S038H, S038K, S038Q, S038T, S063K, S063N, S063Q, S063T, S087A, S087F, S087G, S087Q, S087T, S089L, S089M, S089N, S089Q, S089T, S089W, S130A, S130F, S130G, S130L, S130V, S145A, S145H, S145M, S145V, S159A, S159G, S159H, S159Q, S159R, S161A, S161G, S161H, S161L, S161M, S161P, S161Q, S161W, S162A, S162F, S162G, S162L, S162N, S162P, S162R,

S162V, S163P, S173A, S173G, S182A, S182H, S182K, S182L, S182N, S182P, S182Q, S182T, S183A, S183G, S183H, S183Q, S188A, S188G, S188T, S188V, S191A, S204A, S204I, S204L, S204Q, S204V, S224C, S236A, S236N, S236Q, S248A, S248F, S248G, S248I, S248K, S248L, S248M, S248N, S248Q, S248T, S248V, S249A, S249C, S249H, S249Q, S249T, S249W, S249Y, S260H, S260N, S260P, S260T, T022H, T022K, T022N, T022R, T022S, T022Y, T055A, T055G, T055L, T055N, T055P, T055Q, T071S, T158H, T158S, T164N, T208C, T208L, T220S, T242N, T244A, T244G, T244H, T244I, T244Q, T244S, T244V, T244W, T253A, T253G, T253H, T253Q, T254V, T255A, T255G, T255H, T255I, T255Q, T255Y, V004G, V004N, V004R, V008A, V008C, V008M, V026I, V044I, V044L, V045H, V045K, V045L, V045M, V045Q, V045S, V045V, V045W, V045Y, V051I, V081L, V081Q, V081T, V084A, V084S, V084T, V093I, V121I, V143N, V143S, V143Y, V147C, V147I, V147L, V147T, V180I, V180L, V180T, V192A, V192S, V192T, V198I, V198L, V198M, V203H, V203I, V203L, V203N, V203Q, V203T, V203W, V203Y, V270A, V270S, V270T, W241M, W241Y, Y006G, Y006H, Y006I, Y006K, Y006L, Y006P, Y006Q, Y006T, Y006V, Y006W, Y021A, Y021D, Y021E, Y021L, Y021Q, Y021R, Y021S, Y104F, Y104I, Y214L, Y214V, Y214W, Y262A, Y262G, Y262L, Y262N, Y262S, Y262W, Y263G, e Y263W, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID n° 2. Desta forma, por exemplo, a invenção inclui a sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID n° 6) compreendendo a substituição A128S, por exemplo, BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128S-Y217Q. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID n° 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada

em comparação a BPN' (SEQ ID n° 2), um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3, e/ou um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v36 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a sequência da SEQ ID n° 2 ou SEQ ID n° 6 e compreendendo pelo menos uma, duas, três, quatro, cinco, seis ou mais substituições de aminoácido selecionadas a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID n° 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00461] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID n° 6) compreendendo pelo menos uma substituição de aminoácido selecionada do grupo que consiste em A001F, A001K, A001L, A001M, A001Q, A001R, A001S, A001T, A001V, A013C, A013S, A015D, A015E, A015L, A015R, A048S, A073N, A073T, A074G, A074S, A085C, A085G, A085S, A085V, A088M, A088S, A092S, A098G, A114G, A133P, A137E, A137H, A144G, A144H, A144K, A144L, A144N, A153S, A153V, A176C, A179G, A187G, A187S, A200G, A216W, A223S, A228S, A230T, A230V, A231V, A232C, A232V, A272E, A272G, A272K, A272P, A273G, A273L, A273V, A274M, A274R, D036E, D099A, D099Q, D120E, D181A, D181G, D259A,

D259G, D259Q, D259T, E156A, E156S, E251I, E251L, E251Q, E251T, F058Y, F261C, F261D, F261K, F261P, G020E, G020F, G020H, G020L, G020N, G020Q, G020R, G020T, G020Y, G024A, G024P, G053A, G053D, G053E, G053F, G053L, G053Q, G053S, G053Y, G097K, G097M, G157A, G157S, G160A, G160L, G166C, G166I, G166Q, G169A, G211K, G215H, G215L, G215S, G215T, G215W, G258S, H017I, H039S, H226L, H238N, H238Y, I011L, I011V, I031L, I079F, I079K, I079L, I079M, I079Q, I205A, I205V, I268L, I268M, K012G, K043F, K043H, K043I, K043N, K043Q, K043T, K141A, K141R, K141W, K170A, K213A, K213G, K213H, K213I, K213L, K213N, K213Q, K213R, K213S, K213T, K213V, K237A, K237H, K237I, K237L, K237N, K237S, K256A, K256G, K256H, K256M, K256P, K256Q, K256W, K265H, L016E, L042V, L075G, L075H, L075I, L075T, L082A, L082F, L082H, L082R, L082S, L082T, L090M, L135F, L196M, L209C, L209H, L209S, L233S, L235M, L235R, L235W, L257C, L257G, L267F, M050Y, M119C, M119I, M124L, N025C, N025E, N025P, N061A, N061G, N061I, N061K, N061L, N061Q, N061R, N062S, N062T, N076A, N076P, N076Q, N076S, N076T, N076V, N078G, N078H, N078K, N078P, N078Q, N078R, N101F, N117R, N117S, N118D, N118H, N118Q, N118R, N118S, N118T, N184C, N184E, N184R, N212D, N212R, N212W, N218F, N218G, N218M, N218P, N218T, N218V, N218W, N240A, N240G, N240Q, N240S, N240W, N243C, N243G, N243S, N252V, N269H, P005A, P005D, P005M, P005Q, P014A, P014M, P014R, P014V, P040F, P040R, P040W, P129E, P129R, P172E, P172K, P194H, P194R, P194W, P201A, P201G, P210L, P239K, P239R, Q002D, Q002E, Q002G, Q002I, Q002P, Q002V, Q010D, Q010R, Q019C, Q019D, Q019E, Q019H, Q019L, Q019P, Q019R, Q059A, Q059E, Q059L, Q059S, Q059T, Q103W, Q185D, Q185K, Q185R, Q185W, Q206G, Q206H, Q206L, Q206V, Q206W, Q217E, Q217F, Q217H, Q217L, Q217V, Q245M,

Q271A, Q271D, Q271G, Q271L, Q271P, Q271T, Q271Y, Q275F, Q275L, Q275P, Q275R, S003D, S003F, S003K, S003R, S009K, S018D, S018R, S037A, S037G, S037K, S037L, S037P, S038M, S063A, S063F, S063G, S063M, S063R, S063Y, S087C, S087K, S087L, S087M, S087N, S087Y, S089A, S089D, S089F, S089G, S089H, S089I, S089K, S089R, S089V, S089Y, S130D, S130E, S130K, S130W, S145G, S145L, S145R, S145T, S159D, S159L, S159W, S161E, S161R, S162C, S162E, S162W, S163A, S182E, S182R, S183C, S183D, S183P, S183R, S188D, S188P, S204G, S204Y, S207G, S224G, S224T, S236C, S236G, S248D, S248H, S248R, S249E, S249L, S249R, S260A, S260G, S260K, S260Q, S260V, S260Y, T022L, T055D, T055E, T055I, T055K, T055M, T055S, T055Y, T158A, T158G, T158L, T158Q, T158V, T164K, T164Q, T208S, T244D, T244E, T244R, T253E, T253R, T253Y, T254G, T255D, T255E, T255K, T255R, V026A, V028I, V028L, V030I, V044C, V044P, V045E, V045G, V045N, V072L, V081A, V081G, V081H, V081S, V084I, V084M, V095A, V095C, V143A, V143F, V143H, V143Q, V143T, V143W, V147A, V147Q, V147S, V148I, V148L, V149C, V149I, V149L, V165L, V180A, V180C, V180M, V192C, V192F, V192I, V192Q, V192Y, V203A, V203G, V203K, V203S, V270C, V270L, V270P, W241F, Y006A, Y006M, Y006N, Y006R, Y006S, Y021C, Y091W, Y104V, Y104W, Y262C, Y262D, Y262E, Y262H, Y262I, Y262R, e Y262V, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes podem ter atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e/ou um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica e/ou um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v36 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%,

80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos uma, duas, três, quatro, cinco, seis ou mais substituições de aminoácido selecionadas a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00462] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que 0,9 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S24G-S53G-S78N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos uma substituição de aminoácido selecionada do grupo que consiste em A001D, A001H, A001N, A015C, A048C, A048E, A085T, A133R, A137R, A142C, A144D, A144R, A152S, A153G, A187P, A187Q, A187T, A187V, A216R, A230S, A272R, A273H, A273T, A274H, D036N, D036S, D181H, D181T, D259N, D259P, D259S, E156G, E156H, E156L, E156Q, E156V, E251C, F189S, F189T, F189W, F189Y, F261E, G020C, G024D, G053M, G053R, G097R, G131D, G131R, G157N, G160R, G160V, G166L, G166W, G211E, G215D, G258A, G258D, G258P, I011T, I031C, I079E, I079R, I175L, I205C, K012H, K012N, K027A, K027N, K027S, K043A, K043D, K043E, K043G, K043L, K043M, K043P, K043V, K043W, K043Y, K136H, K141H, K141L, K141M, K141N, K141Q, K141T, K141V, K170G, K170S, K237T, K237V, K256D, K256S, K256T, K256V, K265N, K265S, L042F, L042M, L082E, L209A,

L209E, L209G, L209R, L233G, L235V, L257D, L257E, L257P, L257R, L257W, L267E, M050L, N056D, N056S, N061C, N061D, N062A, N062H, N062L, N062V, N062Y, N076D, N076L, N076M, N078D, N078F, N101D, N101R, N118A, N212C, N212E, N218C, N218D, N218E, N252D, N252E, P014F, P014K, P057A, P057W, P172R, P194E, P201T, P210E, Q059C, Q059D, Q059R, Q185E, Q206D, Q217A, Q217K, Q217R, Q245A, Q245D, Q245E, Q245H, Q245R, Q271E, Q271F, Q271R, Q271W, Q275G, Q275I, R186I, R186L, R186V, R186W, S003E, S009C, S009E, S018C, S037D, S037E, S037H, S037R, S037Y, S038D, S038P, S038R, S038Y, S063L, S087D, S087R, S089C, S089E, S130C, S130R, S145D, S159C, S159P, S161C, S173T, S182C, S188E, S188F, S188K, S188L, S188R, S188W, S190A, S190G, S190T, S204R, S236D, S236E, S248C, S248E, S260C, S260E, S260R, T022P, T055C, T055W, T071A, T158D, T158E, T158P, T158R, T158Y, T164R, T242D, T242G, T255C, V004E, V004T, V045C, V045D, V045R, V045T, V051H, V081R, V143C, V143E, V143G, V192G, V203C, V203D, V203E, V203M, V203R, V270G, W241L, Y214H, Y214Q, A001E, A133E, A187L, A187N, A216C, A216H, A273Q, D099H, D259H, E156C, E195G, F189H, G131C, G146A, G166V, G215C, G215E, I107L, K012A, K012S, K012T, K043C, K170C, K256C, K256E, K265G, K265Y, L233E, M222F, M222S, N062Q, N076E, N078E, N184P, N218R, P005V, P014D, Q002K, Q002L, Q002R, Q010W, Q271C, R186H, S049C, S063C, S063D, S105T, S188C, S190C, S204E, T055R, T164G, V004D, V044T, V045I, V165C, V180S, Y006C, Y006D, Y006E, Y104T, A001C, A187C, A230G, A273D, A273P, D036Q, F189G, F189L, F189R, G157T, G178A, I031F, I111M, K012F, K012L, K027T, K043R, K136G, K141G, K170Q, M222A, M222L, N062R, N117G, N269C, P005W, P129V, P239A, P239H, P239T, Q059W, Q217G, Q275A, R186A, S191G, T164A, T220A, A001P, A187F,

A187W, A273R, D041C, D060G, D197T, F189A, G046D, G157P, K012C, K012E, K012W, L042C, M222T, N062C, P239G, P239N, Q217C, R186M, S049T, S089P, S125A, S173V, e V044A, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica e/ou um valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que 0,9 em relação a BPN'-v36 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos uma, duas, três, quatro, cinco, seis ou mais substituições de aminoácido selecionadas a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00463] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI maior que 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, maior que 1,0 até cerca de 10, maior que 1,0 até cerca de 8, ou maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza em pequena amostra de tecido com ovo na composição detergente 4 a 16°C e pH 8: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo

menos uma substituição de aminoácido selecionada do grupo que consiste em A216E, L090I, A098R, A098W, A098Y, A116G, A116R, A116S, A133M, I107L, I115V, M124L, N101I, N109H, N109S, N109T, N117R, P005G, Q185L, S089V, V095A, A015Y, A029G, A098D, A098E, A098G, A098N, A098S, A098T, A098V, A114S, A114T, A116E, A116L, A116T, A116V, A133H, A133L, A133S, A137G, A137I, A137L, A137S, A137V, A138S, A144S, A144V, A176S, A176T, A187T, A216F, A216P, A216Q, A216R, A216S, A216T, A216V, A216Y, D041E, D120A, D120E, D120Q, D120R, D120S, D181S, G020A, G020S, G024A, G097A, G097D, G097S, G131Q, G160S, G166I, G211L, G215N, H039N, H238N, I111L, I111V, I122A, L075I, L075Q, L135M, L209T, L209V, L233V, L235M, L235R, L257A, M119I, N025A, N025G, N025T, N061K, N101F, N101H, N101L, N101Q, N101R, N101S, N101T, N109A, N109G, N109K, N109L, N117E, N117H, N117K, N117S, N212G, N212S, N218F, N218G, N218H, N218L, N218S, N218W, N240Q, N252M, N252R, N252S, P005T, P040A, P040G, P040T, P129D, P129S, P194S, P210R, Q019R, Q019W, Q103L, Q103W, Q185A, Q185G, Q185M, Q185R, Q185T, Q206G, Q206Y, Q217A, Q217E, Q217R, Q217S, Q217T, S003Q, S009H, S018M, S033T, S130A, S130F, S130G, S130T, S130V, S145T, S159A, S161N, S161T, S162V, S162Y, S182L, S182W, S183F, S183L, S183V, S183W, S188K, S188W, S236Q, S236T, S248L, T022H, T022K, T208C, T253H, T255V, V044I, V121I, V139C, V143H, V143Q, V143T, V143W, V143Y, Y006K, Y021A, Y104W, A001F, A001G, A001H, A001K, A001L, A001Q, A001S, A001Y, A013V, A015G, A015K, A015R, A015S, A015T, A015W, A048S, A073N, A073S, A092S, A098K, A098P, A116D, A116W, A128S, A133P, A133T, A133V, A134G, A134S, A137H, A137N, A137T, A144D, A144K, A144L, A144M, A144N, A144R, A179G, A179S, A187V, A216G, A216L, A216W, A223S, A230C, A272K, A272L, A272P,

A272S, A272T, A272W, A273G, A273S, A274G, A274M, A274T, D120K, D140E, D181A, D181E, D181G, D181H, D181T, D259E, D259N, D259Q, E054D, E156D, E156T, E251L, E251T, E251V, F058Y, F189W, F261K, F261Q, F261R, G007A, G007S, G020F, G020H, G020N, G020Q, G020T, G020Y, G024F, G024Q, G024R, G024T, G024V, G024W, G024Y, G053T, G097K, G097M, G097R, G097T, G131A, G131H, G131P, G131R, G131T, G131V, G160H, G160T, G166C, G166Q, G166S, G166T, G211A, G211D, G211K, G211M, G211N, G211Q, G211R, G211V, G211W, G215S, G215T, G215W, H017T, H017W, H017Y, H039V, H226A, H226F, H226I, H226L, H226M, H226V, I035V, I079A, I079S, I108V, I205V, I234L, I234V, I268V, K012S, K043P, K136H, K136R, K141A, K141F, K141T, K141W, K170A, K170G, K170R, K213A, K213R, K213S, K237A, K237H, K237L, K237S, K237V, K256A, K256G, K256H, K256M, K256P, K256Q, K256R, L016A, L016Q, L016T, L016V, L042V, L075M, L075T, L082M, L082V, L135F, L196I, L209H, L209Q, L209R, L209S, L209W, L233A, L233M, L233Q, L235I, L235K, L250I, L257S, L257T, L257V, L267A, L267Q, L267T, L267V, M119C, M199V, N025C, N025E, N025F, N025I, N025K, N025L, N025M, N025Q, N025V, N025Y, N061F, N061P, N061S, N061T, N076G, N078S, N101A, N109M, N109Q, N109R, N117A, N117M, N117Q, N118D, N118G, N118H, N118Q, N118R, N118S, N184A, N184C, N184G, N184L, N184R, N184S, N184T, N184V, N184W, N212C, N212F, N212I, N212K, N212L, N212P, N212Q, N212R, N212V, N212W, N212Y, N218A, N218P, N218T, N240A, N240E, N240G, N240H, N240L, N240R, N240S, N240T, N243C, N243Q, N243T, N243V, N252A, N252G, N252K, N252Q, P014G, P014Q, P014R, P014S, P014T, P040F, P040L, P040Q, P040S, P040V, P086C, P086H, P086S, P129A, P129E, P129G, P129K, P129R, P172A, P172K, P172Q, P172S, P194A, P194G, P194H, P194L, P194M, P194Q, P194R,

P194V, P194W, P194Y, P210A, P210G, P210L, P210S, P239K, P239R, Q002A, Q002S, Q010A, Q010N, Q010R, Q010T, Q019A, Q019C, Q019D, Q019G, Q019S, Q019T, Q019V, Q059I, Q059V, Q103S, Q185F, Q185H, Q185I, Q185K, Q185N, Q185S, Q185Y, Q206H, Q206L, Q206P, Q206W, Q217F, Q217H, Q217I, Q217K, Q217L, Q217N, Q217V, Q271G, Q271R, Q271T, Q275F, Q275P, Q275R, R186A, R186I, R186K, S003A, S003F, S003G, S003H, S003K, S003R, S003T, S009T, S018N, S018T, S037G, S037T, S037V, S038G, S038Q, S063N, S063Q, S063T, S089M, S089N, S130K, S130L, S130R, S130W, S132N, S145G, S145K, S145M, S145R, S145V, S159C, S159H, S159L, S159Q, S159R, S159T, S159W, S161A, S161C, S161G, S161H, S161I, S161K, S161P, S161Q, S161R, S162F, S162G, S162I, S162L, S162M, S162N, S162P, S162R, S163G, S173A, S173G, S182F, S182G, S182K, S182N, S182Q, S182V, S183A, S183M, S183Q, S183R, S183T, S188A, S188F, S188G, S188P, S188R, S188T, S188V, S190C, S204A, S204G, S204I, S204L, S204Q, S204R, S204V, S207G, S224A, S224T, S236C, S236D, S236E, S236G, S236N, S248A, S248F, S248K, S248M, S248T, S249A, S249R, S249T, S249V, S249W, S249Y, S260G, S260H, S260K, S260N, T022A, T022G, T022Q, T022S, T022V, T022Y, T055A, T055K, T158A, T158S, T208L, T208S, T208V, T220S, T242D, T242N, T242S, T244E, T244G, T244I, T244R, T244V, T244W, T253A, T253G, T253N, T253S, T254S, T254V, T255H, T255I, T255K, T255L, T255Q, T255R, T255S, T255Y, V004A, V004N, V004P, V004W, V008A, V008M, V026I, V045S, V045W, V051I, V081Q, V081T, V084C, V093I, V095C, V143A, V143E, V143F, V143N, V143S, V147I, V147L, V147S, V147T, V148I, V149C, V149I, V165M, V180A, V180C, V180I, V180L, V180T, V192A, V192C, V192I, V192S, V192T, V192Y, V198L, V203A, V203F, V203K, V203L, V203M, V203N, V203Y, W241Y, Y006A, Y006G, Y006H, Y006L,

Y006N, Y006P, Y006Q, Y006T, Y021E, Y021K, Y021L, Y021N, Y021Q, Y021R, Y021S, Y021T, Y104F, Y104I, Y104V, Y171F, Y214F, Y214L, Y214W, Y262F, e Y262S, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2), atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN'-v3 e BPN'-v36, um valor de PI maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v3, e/ou um valor de PI maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v36 neste teste de limpeza em pequena amostra de tecido com ovo, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos uma, duas, três, quatro, cinco, seis ou mais substituições de aminoácido selecionadas a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00464] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza em pequena amostra de tecido com ovo na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6)

compreendendo pelo menos uma substituição de aminoácido selecionada do grupo que consiste em A001D, A001M, A001N, A001R, A001T, A001V, A013C, A013G, A013S, A015D, A015F, A015L, A015M, A015P, A015Q, A074G, A074S, A085S, A085T, A085V, A088C, A088L, A088S, A088T, A088V, A133E, A133G, A133R, A137E, A144G, A144H, A144Q, A144T, A151C, A152S, A153G, A153S, A153V, A176C, A187G, A187Q, A187S, A200G, A228S, A228T, A230T, A230V, A231C, A231V, A232C, A232V, A272E, A272G, A272I, A272Q, A272R, A273L, A273V, A274L, A274Q, A274R, A274V, D036E, D259A, D259G, D259P, D259S, D259T, E156A, E156S, E156V, E195G, E251C, E251I, E251Q, F189Y, F261A, F261G, F261H, F261L, F261P, F261S, F261T, F261V, F261W, G020C, G020D, G020E, G020L, G020R, G024D, G024I, G024N, G024P, G024S, G053A, G053D, G053F, G053H, G053K, G053N, G053S, G053Y, G157A, G157S, G160A, G160L, G160P, G160R, G166A, G166L, G166V, G166W, G169A, G211E, G211P, G215A, G215D, G215E, G215H, G215V, G258D, G258S, H017F, H017I, H017L, H017M, H017V, H039C, H226S, H226Y, I011T, I011V, I031C, I031L, I031V, I079F, I079K, I079L, I079M, I079Q, I079R, I079T, I079V, I079W, I115L, I205A, I205C, I268L, K012R, K012T, K027R, K043A, K043E, K043F, K043H, K043I, K043M, K043N, K043Q, K043T, K043V, K043Y, K141H, K141Q, K141V, K170S, K213G, K213H, K213I, K213L, K213N, K213Q, K213T, K213W, K237I, K237N, K237R, K237T, K256C, K256E, K256S, K256T, K256V, K256W, K265H, K265R, L016E, L016F, L016I, L016S, L042I, L042M, L075A, L075H, L075Y, L082K, L082Q, L082T, L196M, L196V, L209A, L209C, L209E, L209G, L235W, L257C, L257H, L257Q, L257Y, L267E, L267F, L267R, L267S, M050Y, N025H, N025P, N025S, N056D, N061A, N061C, N061D, N061G, N061H, N061I, N061L, N061Q, N061R, N061V, N061W, N062A, N062S, N062V, N076A, N076E, N076L, N076M,

N076Q, N076S, N076T, N076W, N078G, N078H, N078K, N078P, N078Q, N078T, N101D, N118A, N118T, N184E, N184H, N184I, N212A, N212D, N212E, N218C, N218D, N218E, N218M, N218R, N218V, N240W, N243A, N243G, N243P, N243S, N252D, N252E, N252L, N252T, N252V, N269S, P005A, P005D, P005M, P005Q, P014A, P014D, P014F, P014M, P014V, P040H, P040R, P040W, P040Y, P086A, P129T, P172E, P172G, P172R, P194E, P201A, P201G, P210E, P210V, Q002E, Q002G, Q010D, Q010F, Q010H, Q010I, Q010L, Q010S, Q019E, Q019H, Q019N, Q059A, Q059L, Q059R, Q059S, Q059T, Q185D, Q185E, Q206D, Q206S, Q206V, Q217G, Q245D, Q245E, Q245K, Q245M, Q245R, Q271A, Q271F, Q271P, Q271Y, Q275D, Q275H, Q275I, Q275L, Q275S, Q275W, R186H, R186L, R186V, R186W, S003D, S003E, S003M, S003P, S003V, S009A, S009E, S009G, S009I, S009K, S009M, S009P, S009W, S018A, S018G, S018I, S018L, S018P, S018R, S018V, S018W, S037A, S037D, S037Q, S037R, S037Y, S038D, S038H, S038K, S038M, S038R, S038T, S063A, S063G, S063K, S063M, S063R, S087A, S087D, S087F, S087G, S087Q, S087T, S089A, S089C, S089H, S089I, S089K, S089L, S089Q, S089R, S089T, S089Y, S130D, S130E, S145A, S145H, S145L, S159G, S161E, S161L, S161M, S161W, S162A, S162C, S162E, S162W, S163P, S173T, S182A, S182C, S182E, S182H, S182R, S182T, S183C, S183D, S183G, S183H, S188C, S188D, S188E, S188L, S190T, S191A, S204Y, S224C, S236A, S248C, S248D, S248G, S248I, S248N, S248Q, S248R, S248V, S249C, S249H, S249L, S249Q, S260A, S260C, S260E, S260P, S260Q, S260R, S260T, T022L, T022N, T022R, T055C, T055D, T055G, T055I, T055L, T055N, T055Q, T055S, T055V, T055Y, T071A, T071S, T158G, T158H, T158L, T158P, T158Q, T158R, T158V, T158Y, T164N, T164S, T244A, T244D, T244H, T244Q, T244S, T253Q, T253R, T253Y, T254A, T254G, T255A, T255D, T255E,

V004E, V004G, V004R, V008C, V026A, V028L, V030I, V044C, V045D, V045E, V045H, V045M, V045Q, V045Y, V072L, V081L, V081S, V084A, V084I, V084M, V084T, V143C, V147C, V147Q, V149L, V165L, V180M, V192F, V192G, V192Q, V198I, V198M, V203C, V203E, V203H, V203I, V203Q, V203R, V203T, V203W, V270A, V270L, V270T, W241F, W241M, Y006C, Y006D, Y006E, Y006I, Y006M, Y006R, Y006S, Y006V, Y006W, Y021C, Y021D, Y021V, Y091W, Y167F, Y214V, Y262A, Y262C, Y262I, Y262M, Y262R, Y262T, Y262V, e Y262W, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2), um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3, e/ou um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v36 neste teste de limpeza de amostras de tecido com ovo, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos uma, duas, três, quatro, cinco, seis ou mais substituições de aminoácido selecionadas a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00465] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36

possuem um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza em pequena amostra de tecido com ovo na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos uma substituição de aminoácido selecionada do grupo que consiste em A001E, A015C, A015E, A048C, A048E, A073T, A085C, A085G, A088I, A088M, A114G, A137R, A187L, A187N, A187P, A187W, A216C, A230S, A273D, A273H, A273T, D036N, D099N, D259H, E156C, E156G, E156H, E156Q, F189H, F189R, F189S, F189T, F261C, F261D, F261E, G053E, G053M, G053Q, G131C, G131D, G157N, G160V, G215C, G215L, G258A, H039A, I011L, I079E, I268M, K012A, K012G, K012H, K012N, K027N, K043C, K043D, K043G, K043L, K043W, K136G, K141G, K141L, K141M, K141N, K141R, K170C, K170Q, K213V, K256D, K265G, K265N, K265Q, K265S, L082A, L082F, L082H, L082R, L082S, L090M, L233S, L235V, L257E, L257G, L257R, L257W, M222S, N025R, N062H, N062T, N076D, N076P, N078D, N078E, N078F, N078R, N078V, N269H, N269Q, P014K, P057A, P086F, P201T, Q002D, Q002I, Q002P, Q002V, Q019L, Q019P, Q059C, Q059D, Q059E, Q185W, Q271C, Q271D, Q271E, Q271L, Q271W, Q275G, R186M, S009C, S009L, S018D, S037E, S037H, S037K, S037L, S037P, S038P, S063C, S063D, S063F, S063L, S063Y, S087L, S087N, S087R, S087Y, S089D, S089F, S089G, S089W, S105T, S125A, S130C, S159D, S159P, S163A, S182P, S183P, S190A, S190G, S204E, S224G, S248E, S248H, S249E, S260V, S260Y, T055M, T055R, T055W, T158D, T158E, T164G, T164K, T164Q, T220A, T242G, T253E, T255C, T255G, V004D, V044L, V044P, V045C, V045G, V045L, V045N, V045R, V045V, V081A, V081G, V081H, V084S, V147A, V203D, V203G, V270C, V270P, V270S, W241L, Y104T, Y214Q, Y262D, Y262E, Y262G, Y262H, Y262L,

Y262N, Y263G, e Y263W, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2), e/ou um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v36 neste teste de limpeza em pequena amostra de tecido com ovo, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos uma, duas, três, quatro, cinco, seis ou mais substituições de aminoácido selecionadas a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00466] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que 0,9 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com ovo na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos uma substituição de aminoácido selecionada do grupo que consiste em A001C, A142C, A187C, A216H, A273Q, A274H, D036Q, D036S, D099S, D197T, E156L, F189A, F189L, G053L, G053R, G157P, G178A, G258P, H039S, H238Y, K012C, K012E, K012L, K012W, K136E, K265Y, L075G, L075V, L082E, L126W, L257D, L257P, M050L, M222A, M222F, M222L,

N056S, N062C, N062L, N062Y, N269C, P057W, Q002K, Q002L, Q217C, Q245A, Q245H, S018C, S038Y, S049C, S087C, S087K, S145D, S191G, T022P, T055E, T164A, T164R, V045K, V051H, V081R, V143G, V148L, V180S, V203S, V270G, Y214H, A187F, A273P, F189G, G046D, G146A, G157T, I031F, I175L, K012F, K027T, L042F, L233E, L233G, M222T, N062R, N184P, P005V, P005W, P129V, P239N, P239T, Q010W, Q059W, Q275A, V004T, V165C, A128H, A230G, D041C, H067T, K027S, K043R, L090T, N062Q, N117G, P225G, P225S, P239G, P239H, Q002R, S089E, V044A, V045I, A001P, A273R, D041N, D099A, D099H, D099Q, F058G, I111M, L042C, N118L, P239A, S049N, S089P, S173V, T242P, V044T, e V045T, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica e/ou um valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que 0,9 em relação a BPN'-v36 neste teste de limpeza de amostras de tecido com ovo, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos uma, duas, três, quatro, cinco, seis ou mais substituições de aminoácido selecionadas a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

Exemplo 8

Desempenho de limpeza de variantes combinatórias adicionais com base em BPN'-v36 original

[00467] Variantes combinatórias adicionais com base em BPN'-v36 original (BPN'-S24G-S53G-S78N-S101N-G128A-Y217Q) foram feitas e fornecidas pela DNA 2.0. Estas variantes foram testadas quanto ao desempenho de limpeza usando o teste em amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 a 16°C e pH 8, o teste em amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 a 16°C e pH 7, o teste em pequena amostra de tecido com ovo na composição detergente 4 a 16°C e pH 8, e o teste em amostras de tecido com grama na composição detergente 4 a 16°C e pH 8. O teor de proteína foi determinado usando o teste de TCA a atividade da protease foi testado usando o teste AAPF. Todos os testes foram feitos conforme descrito no exemplo 1 e os índices de desempenho foram calculados em relação a BPN'-v36 (com um valor de PI de 1,0).

[00468] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI maior que 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, maior que 1,0 até cerca de 10, maior que 1,0 até cerca de 8, ou maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 a pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID n° 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em A088T-L257G, A116T-A128S, N061S-N109G-A128S-N243V-S260P, S009T-N109G-A128S-K141R-N243V, S009T-S018T-Y021N-N109G-A128S-K141R, e S162G-K256R, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID n° 2. Tais variantes possuem atividade

proteolítica intensificada em comparação a BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36, e um valor de PI maior do que o de BPN', BPN'-v3 e BPN'-v36 neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36, um valor de PI maior que 1,0 a cerca de 5 em relação a BPN'-v3, e/ou um valor de PI maior que 1,0 a cerca de 5 em relação a BPN'-v36 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2.

[00469] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em A088T, A088T-A116T, A088T-G131H, A088T-K256R, A088T-N109G, A088T-N243V, A088T-Q103H, A088T-S162G, A088T-S248N, A088T-S249A, A088T-T158S, A116T, A116T-G131H, A116T-K256R, A116T-L257G, A116T-N243V, A116T-S162G, A116T-S248N, A116T-S249A, A116T-T158S, A128S-K256R, A128S-L257G, A128S-N243V-S248N-K256R, A128S-S162G, A128S-S248N, A128S-S249A, A128S-T158S, G024E-A116T, G024E-K256R, G024E-L257G, G024E-N109G, G024E-N243V, G024E-T158S, G131H, G131H-K256R, G131H-L257G, G131H-N243V-K256R, G131H-S162G, G131H-S248N, G131H-S249A,

G131H-T158S, K043Y-A088T, K043Y-K256R, K043Y-N243V, K256R, K256R-L257G, L257G, N061G-N109G-N243V, N061P-N109G-G131H-N243V, N061P-N109G-N243V, N061S-A128S-N243V-S260P, N061S-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R-S260P, N061S-N109G-A128S-S260P, N061S-N109G-N243V, N076D-K256R, N076D-L257G, N076D-N109G, N076D-T158S, N109A-A128S-N243V-K256R, N109G, N109G-A116T, N109G-A128S, N109G-A128S-G131H-N243V-S248N-K256R, N109G-A128S-N243V-K256R, N109G-A128S-N243V-S248A, N109G-A128S-N243V-S248A-K256R, N109G-A128S-N243V-S248N, N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, N109G-A128S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A128S-S162G-N243V-S248N-K256R, N109G-A128S-S248N-K256R, N109G-A128S-T158S-N243V-S248N-K256R, N109G-G131H, N109G-K256R, N109G-L257G, N109G-N218S, N109G-N243P-S248A-K256R, N109G-N243P-S248N-K256R, N109G-N243V, N109G-N243V-K256R, N109G-N243V-S248A-K256R, N109G-N243V-S248N, N109G-N243V-S248N-K256R, N109G-S162G, N109G-S248N-K256R, N109G-S249A, N109G-T158S, N109Q-A128S-N243V-K256R, N109S-A128S-N243V-K256R, N218S-N243V, N243V, N243V-K256R, N243V-L257G, N243V-S248N, N243V-S248N-K256R, N243V-S249A, P040A-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, Q103H-A116T, Q103H-A128S, Q103H-G131H, Q103H-K256R, Q103H-L257G, Q103H-N109G, Q103H-N218S, Q103H-N243V, Q103H-S162G, Q103H-S248N, Q103H-S249A, Q103H-T158S, S009T-A128S-K141R-N243V, S009T-N109G-A128S-K141R, S009T-N109G-A128S-K141R-N243V-S248N-K256R, S009T-S018T-Y021N-A128S-K141R-N243V, S018T-Y021N-A128S-N243V, S018T-Y021N-N061S-A128S-N243V-S260P, S018T-Y021N-N061S-N109G-A128S-S260P, S018T-Y021N-N109G-A128S, S018T-Y021N-N109G-A128S-N243V, S018T-Y021N-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, S033T-N109G-A128S-N243P-S248N-K256R, S033T-N243V, S033T-Q103H, S033T-T158S, S063G, S063G-

A088T, S063G-A128S, S063G-K256R, S063G-L257G, S063G-N076D, S063G-N109G, S063G-Q103H, S063G-S162G, S063G-S248N, S063G-T158S, S162G, S162G-L257G, S162G-N243V, S162G-S248N, S248N, S248N-L257G, S249A, T158S, T158S-L257G, T158S-N218S, T158S-N243V, T158S-S248N, e T158S-S249A, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID n° 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID n° 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID n° 2), um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3, e um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v36 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID n° 2 ou da SEQ ID n° 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID n° 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00470] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID n° 6)

compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em A001E-A088T, A001E-A116T, A001E-A128S-G131H-N243V, A001E-G131H-G169A-N243V, A001E-K256R, A001E-N109G, A001E-N243V, A001E-S033T, A001E-S033T-N109G-N218S, A001E-S033T-N109G-N243V, A001E-S162G, A001E-T158S, A088T-A128S, A088T-G169A, A088T-N218S, A088T-Q206D, A116T-G169A, A116T-N218S, A116T-Q206D, A128S, A128S-G131H, A128S-G169A, A128S-N218S, A128S-N243V, A128S-Q206D, G024E, G024E-A088T, G024E-A128S, G024E-G131H, G024E-K043Y, G024E-N218S, G024E-Q103H, G024E-S033T, G024E-S063G, G024E-S162G, G024E-S248N, G024E-S249A, G131H-G169A, G131H-N218S, G131H-N243V, G131H-Q206D, G169A, G169A-K256R, G169A-L257G, G169A-N218S, G169A-N243V, G169A-Q206D, G169A-S248N, G169A-S249A, K043Y, K043Y-A116T, K043Y-A128S, K043Y-G131H, K043Y-G169A, K043Y-L257G, K043Y-N109G, K043Y-N218S, K043Y-Q103H, K043Y-S063G, K043Y-S162G, K043Y-S248N, K043Y-S249A, K043Y-T158S, N076D, N076D-A088T, N076D-A128S, N076D-G131H, N076D-N218S, N076D-N243V, N076D-Q103H, N076D-S162G, N076D-S248N, N076D-S249A, N109G-G169A, N109G-Q206D, N109G-S248N, N218S, N218S-K256R, N218S-L257G, N218S-S248N, N218S-S249A, P040E-N109G-A128S-G131H, Q103H, Q103H-G169A, Q206D, Q206D-K256R, Q206D-L257G, Q206D-N218S, Q206D-N243V, Q206D-S248N, Q206D-S249A, S018T-Y021N-S033T-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, S033T, S033T-A088T, S033T-A116T, S033T-A128S, S033T-A128S-G131H-N243V, S033T-G131H, S033T-K043Y, S033T-K256R, S033T-L257G, S033T-N076D, S033T-N076D-A128S-N218S, S033T-N076D-N109G-A128S-N218S-N243V-S248N-K256R, S033T-N109G, S033T-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, S033T-N218S, S033T-P040E-Q103H-N109G, S033T-Q103H-A128S-G131H, S033T-Q206D, S033T-

S063G, S033T-S162G, S033T-S248N, S033T-S249A, S063G-A116T, S063G-G131H, S063G-G169A, S063G-N109G-A128S-G131H, S063G-N218S, S063G-N243V, S063G-Q206D, S063G-S249A, S162G-G169A, S162G-N218S, S162G-Q206D, S162G-S249A, S248N-K256R, S248N-S249A, S249A-K256R, S249A-L257G, T158S-G169A, T158S-K256R, T158S-Q206D, e T158S-S162G, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2), e/ou um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v36 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00471] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que 0,9 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de

aminoácido selecionado do grupo que consiste em A001E, A001E-A128S, A001E-G024E, A001E-G131H, A001E-G169A, A001E-L257G, A001E-N218S, A001E-Q103H, A001E-S063G, A001E-S248N, A001E-S249A, G024E-N076D, K043Y-N076D, K043Y-Q206D, N076D-A116T, N076D-G169A, N076D-Q206D, Q103H-Q206D, S033T-G169A, S033T-S063G-Q103H-N109Q-A128S-G131H-G169A-N243P, S033T-S063G-Q103H-N109Q-A128S-G131H-G169A-N243V, A001E-K043Y, A001E-N076D, A001E-N076D-N109G-A128S, A001E-Q206D, e G024E-Q206D, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica e/ou um valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que 0,9 em relação a BPN'-v36 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00472] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI maior que 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, maior

que 1,0 até cerca de 10, maior que 1,0 até cerca de 8, ou maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 a pH 7 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em A116T, A088T-N243V, G024E-A116T, K043Y, N076D-A116T, N218S-S248N, S033T-N243V, S033T-S063G, S248N-L257G, A001E-S249A, A088T-A116T, A088T-A128S, A088T-G131H, A088T-L257G, A088T-N109G, A088T-S248N, A088T-S249A, A116T-N243V, A116T-T158S, A128S, A128S-K256R, A128S-L257G, A128S-N243V, A128S-S248N, A128S-T158S, G024E-A088T, G024E-A128S, G024E-G131H, G024E-K256R, G024E-L257G, G024E-N218S, G024E-N243V, G024E-S162G, G024E-S249A, G024E-T158S, G131H, G131H-K256R, G131H-S249A, K043Y-A088T, K043Y-A116T, K256R, N076D-K256R, N109G, N109G-A116T, N109G-A128S, N109G-A128S-N243V-K256R, N109G-A128S-N243V-S248A, N109G-G131H, N109G-K256R, N109G-L257G, N109G-N218S, N109G-N243V, N109G-S248N, N218S-L257G, N243V, N243V-K256R, N243V-L257G, N243V-S248N, N243V-S249A, Q103H-A128S, Q103H-G131H, Q103H-K256R, Q103H-L257G, Q103H-N243V, Q103H-S248N, Q103H-S249A, Q103H-T158S, Q206D-N243V, S033T-A128S, S033T-K256R, S033T-N076D, S033T-N218S, S033T-S248N, S033T-T158S, S063G-A128S, S063G-K256R, S063G-N243V, S063G-S162G, S063G-T158S, S162G-K256R, S248N-K256R, S249A, T158S-N243V, e T158S-S249A, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36, e um valor de PI maior que o de BPN', BPN'-v3 e BPN'-v36 neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade pro-

teolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2), atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36, um valor de PI maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v3, e/ou um valor de PI maior que 1,0 a cerca de 5 em relação a BPN'-v36 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00473] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 7 e 16°C: Sequência de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em A001E-A128S, A001E-G131H, A001E-K256R, A001E-N218S, A001E-N243V, A001E-S033T, A001E-S063G, A001E-S162G, A088T, A088T-K256R, A088T-N218S, A088T-Q103H, A088T-S162G, A088T-T158S, A116T-A128S, A116T-G131H, A116T-K256R, A116T-L257G, A116T-S162G, A116T-S248N, A116T-S249A, A128S-G169A, A128S-N218S, A128S-S162G, A128S-S249A, G024E, G024E-N109G, G024E-Q103H, G024E-S033T,

G024E-S063G, G024E-S248N, G131H-L257G, G131H-N243V, G131H-S162G, G131H-T158S, G169A, G169A-L257G, G169A-S248N, K043Y-A128S, K043Y-G131H, K043Y-K256R, K043Y-L257G, K043Y-N109G, K043Y-N243V, K043Y-Q103H, K043Y-S063G, K043Y-S162G, K043Y-S248N, K043Y-S249A, K043Y-T158S, K256R-L257G, L257G, N061G-N109G-N243V, N061S-A128S-N243V-S260P, N061S-N109G-A128S-N243V-S260P, N061S-N109G-A128S-S260P, N076D-A088T, N076D-A128S, N076D-G169A, N076D-N218S, N076D-N243V, N076D-S162G, N076D-S248N, N076D-T158S, N109A-A128S-N243V-K256R, N109G-A128S-G131H-N243V-S248N-K256R, N109G-A128S-N243V-S248A-K256R, N109G-A128S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A128S-S162G-N243V-S248N-K256R, N109G-A128S-T158S-N243V-S248N-K256R, N109G-Q206D, N109G-S162G, N109G-S249A, N109G-T158S, N109Q-A128S-N243V-K256R, N109S-A128S-N243V-K256R, N218S, N218S-K256R, N218S-N243V, P040A-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, Q103H, Q103H-A116T, Q103H-G169A, Q103H-N109G, Q103H-N218S, Q103H-S162G, S009T-A128S-K141R-N243V, S009T-N109G-A128S-K141R, S009T-N109G-A128S-K141R-N243V, S009T-S018T-Y021N-N109G-A128S-K141R, S018T-Y021N-N109G-A128S, S018T-Y021N-N109G-A128S-N243V, S018T-Y021N-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, S033T-A088T, S033T-A116T, S033T-G131H, S033T-K043Y, S033T-L257G, S033T-N109G, S033T-Q103H, S033T-Q206D, S033T-S162G, S033T-S249A, S063G, S063G-A088T, S063G-A116T, S063G-L257G, S063G-N076D, S063G-N109G, S063G-N218S, S063G-Q103H, S063G-S248N, S063G-S249A, S162G, S162G-G169A, S162G-L257G, S162G-N218S, S162G-N243V, S162G-S248N, S162G-S249A, S248N, S248N-S249A, S249A-K256R, S249A-L257G, T158S, T158S-G169A, T158S-K256R, T158S-L257G, T158S-N218S, e T158S-S248N, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a

sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação à protease BPN' (SEQ ID nº 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2), um valor de PI de 1,0 em relação a BPN'-v3, e um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v36 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00474] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 7 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em A001E, A001E-A088T, A001E-A116T, A001E-G169A, A001E-L257G, A001E-N109G, A001E-S033T-N109G-N243V, A001E-T158S, A088T-G169A, A088T-Q206D, A116T-N218S, A128S-G131H, A128S-N243V-S248N-K256R, A128S-Q206D, G024E-K043Y, G024E-N076D, G024E-Q206D, G131H-G169A,

G131H-N218S, G131H-N243V-K256R, G131H-Q206D, G131H-S248N, G169A-K256R, G169A-N218S, G169A-N243V, G169A-Q206D, K043Y-N076D, K043Y-N218S, N061P-N109G-G131H-N243V, N061P-N109G-N243V, N061S-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R-S260P, N061S-N109G-N243V, N076D, N076D-G131H, N076D-L257G, N076D-N109G, N076D-Q103H, N076D-S249A, N109G-A128S-N243V-S248N, N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, N109G-A128S-S248N-K256R, N109G-N243P-S248A-K256R, N109G-N243P-S248N-K256R, N109G-N243V-K256R, N109G-N243V-S248A-K256R, N109G-N243V-S248N, N109G-N243V-S248N-K256R, N109G-S248N-K256R, N218S-S249A, N243V-S248N-K256R, Q103H-Q206D, Q206D, Q206D-K256R, Q206D-N218S, Q206D-S248N, Q206D-S249A, S009T-N109G-A128S-K141R-N243V-S248N-K256R, S009T-S018T-Y021N-A128S-K141R-N243V, S018T-Y021N-A128S-N243V, S018T-Y021N-N061S-A128S-N243V-S260P, S018T-Y021N-N061S-N109G-A128S-S260P, S018T-Y021N-S033T-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, S033T, S033T-G169A, S033T-N076D-A128S-N218S, S033T-N076D-N109G-A128S-N218S-N243V-S248N-K256R, S033T-N109G-A128S-N243P-S248N-K256R, S033T-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, S063G-G131H, S063G-G169A, S162G-Q206D, e T158S-S162G, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica e/ou um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v36 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo aci-

ma, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00475] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que 0,9 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 7 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em A001E-A128S-G131H-N243V, A001E-G024E, A001E-G131H-G169A-N243V, A001E-Q103H, A001E-S033T-N109G-N218S, A001E-S248N, A116T-G169A, A116T-Q206D, G169A-S249A, K043Y-G169A, N109G-G169A, P040E-N109G-A128S-G131H, Q206D-L257G, S033T-A128S-G131H-N243P, S033T-A128S-G131H-N243V, S033T-P040E-Q103H-N109G, S033T-Q103H-A128S-G131H, S063G-N109G-A128S-G131H, S063G-Q206D, T158S-Q206D, A001E-K043Y, A001E-N076D, A001E-Q206D, S033T-S063G-Q103H-N109Q-A128S-G131H-G169A-N243P, S033T-S063G-Q103H-N109Q-A128S-G131H-G169A-N243V, A001E-N076D-N109G-A128S, K043Y-Q206D, e N076D-Q206D, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica e/ou um valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que 0,9 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%,

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00476] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI maior que 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de mais que 1,0 a cerca de 10, de mais que 1,0 a cerca de 8, ou de mais que 1,0 a cerca de 5 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza em pequena amostra de tecido com ovo na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q sequência de aminoácidos (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em A088T-L257G, G024E-K256R, G024E-L257G, N109G-A116T, N109G-L257G, N243V-K256R, S033T-N109G, S033T-T158S, S063G-L257G, A001E-L257G, A088T-A128S, A088T-G169A, A088T-K256R, A088T-N109G, A088T-N218S, A088T-N243V, A088T-S248N, A088T-T158S, A116T, A116T-A128S, A116T-G131H, A116T-K256R, A116T-L257G, A116T-N218S, A116T-S162G, A116T-T158S, A128S, A128S-G169A, A128S-K256R, A128S-L257G, A128S-N218S, G024E, G024E-A128S, G024E-G131H, G024E-N109G, G024E-N243V, G024E-S033T, G024E-S063G, G024E-S248N, G024E-S249A, G024E-

T158S, G131H, G131H-G169A, G131H-K256R, G131H-N218S, G131H-S249A, G169A, G169A-L257G, G169A-N243V, K043Y-A088T, K043Y-N109G, K256R, K256R-L257G, N061G-N109G-N243V, N076D-N109G, N109G, N109G-A128S, N109G-G131H, N109G-K256R, N109G-N218S, N109G-S162G, N109G-S248N, N109G-S249A, N109G-T158S, N218S, N218S-K256R, N218S-L257G, N218S-S248N, N243V, N243V-L257G, N243V-S248N, N243V-S249A, P040A-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, Q103H-K256R, Q103H-L257G, Q103H-N109G, S009T-S018T-Y021N-N109G-A128S-K141R, S033T-A088T, S033T-A116T, S033T-A128S, S033T-G131H, S033T-K043Y, S033T-K256R, S033T-L257G, S033T-N076D, S033T-N218S, S033T-N243V, S033T-Q103H, S033T-S063G, S033T-S162G, S033T-S248N, S033T-S249A, S063G, S063G-A088T, S063G-A116T, S063G-A128S, S063G-G131H, S063G-K256R, S063G-N109G, S063G-N218S, S063G-N243V, S063G-S248N, S063G-S249A, S063G-T158S, S162G-K256R, S162G-N218S, S162G-N243V, S162G-S248N, S162G-S249A, S248N, S249A, S249A-L257G, T158S, T158S-L257G, e T158S-N243V, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36, e um valor de PI maior que o de BPN', BPN'-v3 e BPN'-v36 neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2), atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36, um valor de PI maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v3, e/ou um valor de PI maior que 1,0 a cerca de 5 em relação a BPN'-v36 neste teste de limpeza de amostras de tecido com ovo, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a se-

quência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00477] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza em pequena amostra de tecido com ovo na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q sequência de aminoácidos (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em A001E, A001E-A116T, A001E-G131H, A001E-G169A, A001E-K256R, A001E-N109G, A001E-S033T-N109G-N243V, A001E-S063G, A001E-S248N, A001E-S249A, A001E-T158S, A088T, A088T-A116T, A088T-G131H, A088T-Q103H, A088T-Q206D, A088T-S162G, A088T-S249A, A116T-G169A, A116T-N243V, A116T-S248N, A116T-S249A, A128S-G131H, A128S-N243V, A128S-S162G, A128S-S248N, A128S-S249A, A128S-T158S, G024E-A088T, G024E-A116T, G024E-K043Y, G024E-N076D, G024E-N218S, G024E-Q103H, G024E-S162G, G131H-L257G, G131H-N243V, G131H-N243V-K256R, G131H-S162G, G131H-S248N, G131H-T158S, G169A-K256R, G169A-N218S, G169A-Q206D, G169A-S248N, G169A-S249A, K043Y, K043Y-A116T, K043Y-A128S, K043Y-G169A, K043Y-K256R, K043Y-L257G, K043Y-N076D, K043Y-N218S, K043Y-N243V, K043Y-S063G, K043Y-S248N, K043Y-S249A, K043Y-T158S, L257G, N061P-N109G-G131H-N243V, N061P-N109G-

N243V, N061S-A128S-N243V-S260P, N061S-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R-S260P, N061S-N109G-A128S-S260P, N061S-N109G-N243V, N076D, N076D-A088T, N076D-A116T, N076D-G131H, N076D-G169A, N076D-K256R, N076D-L257G, N076D-N218S, N076D-N243V, N076D-Q103H, N076D-S249A, N076D-T158S, N109A-A128S-N243V-K256R, N109G-A128S-G131H-N243V-S248N-K256R, N109G-A128S-N243V-K256R, N109G-A128S-N243V-S248A, N109G-A128S-N243V-S248A-K256R, N109G-A128S-N243V-S248N, N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, N109G-A128S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A128S-S162G-N243V-S248N-K256R, N109G-G169A, N109G-N243P-S248A-K256R, N109G-N243V-K256R, N109G-N243V-S248A-K256R, N109G-N243V-S248N, N109G-N243V-S248N-K256R, N109G-S248N-K256R, N109Q-A128S-N243V-K256R, N109S-A128S-N243V-K256R, N218S-N243V, N218S-S249A, Q103H, Q103H-A116T, Q103H-A128S, Q103H-G131H, Q103H-G169A, Q103H-N218S, Q103H-N243V, Q103H-S162G, Q103H-S248N, Q103H-S249A, Q103H-T158S, Q206D, Q206D-L257G, Q206D-N218S, S009T-A128S-K141R-N243V, S009T-N109G-A128S-K141R, S009T-N109G-A128S-K141R-N243V, S009T-N109G-A128S-K141R-N243V-S248N-K256R, S009T-S018T-Y021N-A128S-K141R-N243V, S018T-Y021N-A128S-N243V, S018T-Y021N-N109G-A128S, S018T-Y021N-N109G-A128S-N243V, S018T-Y021N-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, S018T-Y021N-S033T-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, S033T, S033T-A128S-G131H-N243V, S033T-G169A, S033T-N109G-A128S-N243P-S248N-K256R, S033T-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, S033T-Q103H-A128S-G131H, S033T-Q206D, S033T-S063G-Q103H-N109Q-A128S-G131H-G169A-N243V, S063G-G169A, S063G-N076D, S063G-N109G-A128S-G131H, S063G-Q103H, S063G-S162G, S162G, S162G-G169A, S162G-L257G, S248N-K256R, S248N-L257G, S248N-S249A, S249A-K256R, T158S-G169A, T158S-K256R, T158S-N218S,

T158S-S162G, T158S-S248N, e T158S-S249A, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação à protease BPN' (SEQ ID nº 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2), um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3, e um valor de PI de 1,0 em relação a BPN'-v36 neste teste de limpeza em pequena amostra de tecido com ovo, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00478] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que 0,9 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com ovo na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q sequência de aminoácidos (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em A001E-A088T, A001E-A128S, A001E-A128S-G131H-N243V, A001E-G024E, A001E-G024E-S204E-Q206D, A001E-G131H-G169A-N243V, A001E-K043Y,

A001E-N076D, A001E-N076D-N109G-A128S, A001E-N218S, A001E-N243V, A001E-Q103H, A001E-Q206D, A001E-S033T, A001E-S033T-N109G-N218S, A001E-S162G, A116T-Q206D, A128S-N243V-S248N-K256R, A128S-Q206D, G024E-Q206D, G131H-Q206D, K043Y-G131H, K043Y-Q103H, K043Y-Q206D, K043Y-S162G, N061S-N109G-A128S-N243V-S260P, N076D-A128S, N076D-Q206D, N076D-S162G, N076D-S248N, N109G-A128S-S248N-K256R, N109G-A128S-T158S-N243V-S248N-K256R, N109G-N243P-S248N-K256R, N109G-Q206D, N243V-S248N-K256R, P040E-N109G-A128S-G131H, Q103H-Q206D, Q206D-K256R, Q206D-N243V, Q206D-S248N, Q206D-S249A, S018T-Y021N-N061S-A128S-N243V-S260P, S018T-Y021N-N061S-N109G-A128S-S260P, S033T-A128S-G131H-N243P, S033T-N076D-A128S-N218S, S033T-N076D-N109G-A128S-N218S-N243V-S248N-K256R, S033T-P040E-Q103H-N109G, S033T-S063G-Q103H-N109Q-A128S-G131H-G169A-N243P, S063G-Q206D, S162G-Q206D, e T158S-Q206D, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica e/ou um valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que 0,9 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando

pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00479] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI maior que 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, maior que 1,0 até cerca de 10, maior que 1,0 até cerca de 8, ou maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com grama na composição detergente 4 a pH 8 e 16°C: BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q sequência de aminoácidos (SEQ ID n° 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em T158S-L257G, K256R, L257G, S033T-N109G, S162G-K256R, S162G-L257G, G024E-K256R, G024E-L257G, G024E-S033T, N109G-A116T, N218S-L257G, S033T-A088T, S033T-A116T, S033T-N243V, S033T-Q103H, S162G-N218S, S162G-N243V, T158S, T158S-N218S, T158S-N243V, A088T, A088T-G169A, A088T-K256R, A088T-L257G, A088T-S162G, A088T-T158S, A116T-K256R, A116T-L257G, A116T-N243V, A128S-L257G, A128S-N218S, A128S-N243V, A128S-S248N, G024E-A116T, G024E-A128S, G024E-G131H, G024E-N243V, G024E-S248N, G024E-S249A, G024E-T158S, G131H-N243V, G131H-T158S, G169A-N218S, G169A-N243V, G169A-S248N, K256R-L257G, N109G-A128S, N109G-G131H, N109G-N218S, N109G-N243V, N109G-S249A, N218S, N218S-K256R, N218S-N243V, N218S-S249A, N243V, N243V-K256R, N243V-L257G, N243V-S248N, Q103H-N109G, Q103H-N218S, S033T-A128S, S033T-L257G, S033T-N218S, S033T-S162G, S033T-S248N, S033T-T158S, S063G-K256R, S063G-L257G, S162G, S162G-G169A, S162G-S248N, S248N, S248N-K256R, S248N-L257G, S249A, T158S-S162G, e T158S-S248N, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por corres-

pondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36, e um valor de PI maior do que o de BPN', BPN'-v3 e BPN'-v36 neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2), atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36, um valor de PI maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v3, e/ou um valor de PI maior que 1,0 a cerca de 5 em relação a BPN'-v36 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00480] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com grama na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q sequência de aminoácidos (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em A001E-A088T, A001E-A116T, A088T-A128S, A088T-N243V, A088T-Q103H, A088T-S248N, A088T-S249A, A116T, A116T-G169A, A116T-N218S, A116T-S162G, A116T-

S249A, A116T-T158S, A128S-G169A, A128S-K256R, A128S-S162G, A128S-S249A, A128S-T158S, G024E-A088T, G024E-K043Y, G024E-N218S, G024E-Q103H, G024E-S063G, G024E-S162G, G131H-G169A, G131H-K256R, G131H-N218S, G131H-S162G, G131H-S248N, G131H-S249A, G169A, G169A-L257G, G169A-S249A, N076D, N076D-K256R, N076D-L257G, N076D-S162G, N076D-S249A, N109G-K256R, N109G-L257G, N109G-S248N, N243V-S249A, Q103H-A116T, Q103H-G169A, Q103H-K256R, Q103H-L257G, Q103H-N243V, Q103H-S162G, S033T-G131H, S033T-G169A, S033T-K043Y, S033T-N076D, S033T-Q206D, S063G, S063G-A116T, S063G-A128S, S063G-N243V, S063G-S162G, S063G-S248N, S063G-S249A, S063G-T158S, S249A-L257G, T158S-G169A, e T158S-K256R, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID n° 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID n° 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID n° 2), um valor de PI de 1,0 em relação a BPN'-v3, e um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v36 neste teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a sequência da SEQ ID n° 2 ou da SEQ ID n° 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID n° 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo me-

nos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00481] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que 0,9 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com grama na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q sequência de aminoácidos (SEQ ID n° 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em A001E-G169A, A001E-K256R, A001E-N109G, A001E-N218S, A088T-A116T, A088T-G131H, A088T-N109G, A088T-N218S, A116T-A128S, A116T-G131H, A116T-S248N, A128S, A128S-G131H, G024E, G024E-N109G, G131H, G131H-L257G, G169A-K256R, G169A-Q206D, K043Y, K043Y-A088T, K043Y-L257G, K043Y-N109G, N076D-A088T, N076D-G131H, N076D-G169A, N076D-N243V, N076D-T158S, N109G, N109G-S162G, N109G-T158S, N218S-S248N, Q103H-A128S, Q103H-S248N, Q103H-S249A, Q103H-T158S, Q206D-K256R, Q206D-L257G, Q206D-N218S, Q206D-N243V, Q206D-S248N, S033T, S033T-K256R, S033T-S063G, S033T-S249A, S063G-A088T, S063G-G131H, S063G-G169A, S063G-N109G, S162G-Q206D, S162G-S249A, S248N-S249A, S249A-K256R, T158S-Q206D, T158S-S249A, A001E-L257G, A001E-N243V, A001E-Q103H, A001E-S063G, A001E-S162G, A001E-T158S, G024E-N076D, G131H-Q206D, K043Y-A116T, K043Y-G169A, K043Y-K256R, K043Y-N076D, K043Y-S063G, K043Y-S162G, K043Y-S248N, K043Y-S249A, K043Y-T158S, N076D-A116T, N076D-A128S, N076D-S248N, N109G-G169A, Q103H, Q103H-G131H, Q206D-S249A, S063G-N076D, S063G-N218S, S063G-Q103H, A001E-A128S, A001E-G024E, A001E-G131H, A001E-N076D, A001E-Q206D, A001E-S033T, A001E-S248N, A001E-S249A, A088T-Q206D, A116T-Q206D, A128S-Q206D, G024E-Q206D, K043Y-A128S,

K043Y-G131H, K043Y-N218S, K043Y-Q103H, N076D-N109G, N076D-N218S, N076D-Q103H, N109G-Q206D, Q103H-Q206D, Q206D, A001E, A001E-K043Y, K043Y-N243V, e S063G-Q206D, N076D-Q206D, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica e/ou um valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que 0,9 em relação a BPN'-v36 neste teste de limpeza de amostras de tecido com grama, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00482] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI maior que 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, maior que 1,0 até cerca de 10, maior que 1,0 até cerca de 8, ou maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v36 em um teste proteolítico AAPF: BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q sequência de aminoácidos (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que

consiste em S033T-N076D-A128S-N218S, A001E-S033T-N109G-N218S, S033T-N218S, S033T-S063G-Q103H-N109Q-A128S-G131H-G169A-N243V, A128S-G169A, S033T-S063G-Q103H-N109Q-A128S-G131H-G169A-N243P, S018T-Y021N-S033T-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, S033T-A128S-G131H-N243P, P040E-N109G-A128S-G131H, S033T-A128S, S033T-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, N109G-G169A, S063G-N109G-A128S-G131H, G169A, N109G-A128S-G131H-N243V-S248N-K256R, S033T-A128S-G131H-N243V, A128S-N218S, A001E-G169A, A088T-G169A, G169A-L257G, N109G-N218S, S033T-N109G-A128S-N243P-S248N-K256R, G169A-K256R, N076D-G169A, A001E-G131H-G169A-N243V, G169A-S249A, S033T-N109G, G169A-S248N, K043Y-G169A, K043Y-N218S, N218S-L257G, N218S-N243V, S063G-G169A, A001E-A128S-G131H-N243V, A001E-S033T-N109G-N243V, A088T-N218S, G024E-N218S, G024E-S033T, G169A-Q206D, N076D-N218S, S033T-L257G, S162G-G169A, A001E-N218S, A116T-N218S, G169A-N243V, N218S, P040A-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, S033T-N076D, A001E-S033T, A128S-G131H, N218S-S248N, S018T-Y021N-N109G-A128S, S033T-K043Y, S033T-N243V, S033T-Q206D, S063G-N218S, S162G-N218S, T158S-G169A, A116T-G169A, G131H-G169A, N061S-N109G-A128S-S260P, N109G-A128S-N243V-K256R, N109G-A128S-N243V-S248A, N109G-A128S-N243V-S248A-K256R, N109G-A128S-N243V-S248N-K256R-L257G, N218S-K256R, S009T-N109G-A128S-K141R, S009T-S018T-Y021N-N109G-A128S-K141R, S033T-A088T, S033T-S063G, S033T-S162G, T158S-N218S, A001E-N076D-N109G-A128S, N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, N109G-A128S-S248N-K256R, S009T-N109G-A128S-K141R-N243V, S018T-Y021N-N061S-N109G-A128S-S260P, S033T-A116T, S033T-S248N, S033T-S249A, S033T-T158S, G131H-N218S, N109A-A128S-N243V-K256R, N109G-A128S, N109G-A128S-S162G-N243V-S248N-K256R, N109G-A128S-T158S-N243V-S248N-K256R,

N218S-S249A, Q206D-N218S, S018T-Y021N-N109G-A128S-N243V, S018T-Y021N-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, S033T-K256R, A116T-A128S, N061S-N109G-A128S-N243V-S260P, N109G-A128S-N243V-S248N, S009T-N109G-A128S-K141R-N243V-S248N-K256R, G024E-A128S, N061S-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R-S260P, N109S-A128S-N243V-K256R, S033T, S033T-G131H, A001E-A128S, A128S, A128S-L257G, A128S-Q206D, N109Q-A128S-N243V-K256R, S009T-A128S-K141R-N243V, S009T-S018T-Y021N-A128S-K141R-N243V, A088T-A128S, A128S-K256R, A128S-N243V, N061P-N109G-N243V, N061S-A128S-N243V-S260P, S018T-Y021N-A128S-N243V, A128S-N243V-S248N-K256R, A128S-S248N, A128S-S249A, N076D-A128S, S063G-A128S, A128S-S162G, A128S-T158S, S018T-Y021N-N061S-A128S-N243V-S260P, S033T-Q103H-A128S-G131H, N061S-N109G-N243V, K043Y-A128S, N061P-N109G-G131H-N243V, N109G-L257G, A001E-G024E-S204E-Q206D, A001E-L257G, A088T-N109G, G024E-N109G, K043Y-N109G, N061G-N109G-N243V, N076D-N109G, N109G, N109G-A116T, N109G-K256R, N109G-N243V-K256R, N109G-N243V-S248A-K256R, N109G-Q206D, S063G-N109G, A001E-A116T, A001E-N109G, A001E-Q206D, A088T-A116T, A088T-N243V, A116T-L257G, G024E-A116T, G024E-L257G, G024E-N243V, G024E-Q206D, N109G-G131H, N109G-N243V, N109G-S162G, N109G-S248N, N109G-S248N-K256R, N109G-S249A, N109G-T158S, N243V-L257G, A001E-A088T, A001E-G024E, A001E-K256R, A001E-N076D, A001E-N243V, A088T, A088T-L257G, A088T-Q206D, A116T, A116T-K256R, A116T-N243V, G024E-A088T, G024E-K043Y, G024E-K256R, G024E-N076D, G024E-S162G, G024E-S248N, K043Y-A088T, K043Y-A116T, K043Y-L257G, K043Y-N243V, K043Y-Q206D, K256R-L257G, N076D-A116T, N076D-L257G, N076D-N243V, N076D-Q206D, N109G-N243V-S248N, N109G-N243V-S248N-K256R, N243V-K256R, Q206D, Q206D-L257G, Q206D-N243V, Q206D-S248N, S063G-

K256R, S063G-L257G, T158S-L257G, A001E, A001E-K043Y, A001E-S162G, A001E-S248N, A001E-S249A, A001E-T158S, A088T-K256R, A088T-S162G, A088T-S248N, A088T-S249A, A116T-Q206D, A116T-S248N, A116T-S249A, G024E, G024E-G131H, G024E-S249A, G024E-T158S, G131H, G131H-K256R, G131H-L257G, K043Y-K256R, K043Y-N076D, K256R, L257G, N076D-A088T, N076D-K256R, N076D-S162G, N076D-S248N, N076D-S249A, N109G-N243P-S248A-K256R, N109G-N243P-S248N-K256R, N243V, Q206D-K256R, S033T-P040E-Q103H-N109G, S063G, S063G-A116T, S063G-Q206D, S162G-K256R, S162G-L257G, S162G-N243V, S162G-Q206D, S162G-S248N, S248N, S248N-L257G, S249A, S249A-L257G, T158S, T158S-N243V, e T158S-Q206D, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36, e um valor de PI maior do que o de BPN', BPN'-v3 e BPN'-v36 neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2), atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36, um valor de PI maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v3, e/ou um valor de PI maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pe-

lo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00483] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v36 em um teste proteolítico AAPF: BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q sequência de aminoácidos (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em A001E-G131H, A001E-S063G, A088T-G131H, A088T-T158S, A116T-G131H, A116T-S162G, A116T-T158S, G024E-S063G, G131H-N243V, G131H-N243V-K256R, G131H-Q206D, G131H-S249A, K043Y, K043Y-S063G, K043Y-S248N, K043Y-S249A, K043Y-T158S, N076D, N076D-G131H, N076D-T158S, N243V-S248N, N243V-S248N-K256R, N243V-S249A, Q103H-G169A, Q206D-S249A, S063G-N076D, S063G-N243V, S063G-S162G, S063G-S249A, S063G-T158S, S162G, S162G-S249A, S248N-K256R, S248N-S249A, S249A-K256R, T158S-K256R, T158S-S248N, e T158S-S249A, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2), um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3, e um valor de PI de 1,0 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de

aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00484] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v36 em um teste proteolítico AAPF: BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q sequência de aminoácidos (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em G131H-S162G, G131H-S248N, G131H-T158S, K043Y-G131H, K043Y-S162G, S063G-A088T, S063G-G131H, S063G-S248N, T158S-S162G, Q103H-N218S, S033T-Q103H, e Q103H-A128S, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica e/ou um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v36 neste teste proteolítico, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos

uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00485] Também é fornecida uma variante de protease subtilisina que tem atividade proteolítica, atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN', ou um valor de PI maior que o de BPN' (SEQ ID n° 2) em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com SEQ ID n° 2 ou SEQ ID n° 6, sendo que a variante compreende pelo menos uma substituição selecionada a partir do grupo de X001E, X009T, X018T, X021N, X024G, X033T, X040A, X043Y, X061G/P/S, X063G, X076D, X088T, X103H, X109A/G/Q/S, X116T, X128S, X131H, X141R, X158S, X162G, X169A, X204E, X206D, X218S, X243P/V, X248A/N, X249A, X256R, X257G, e X260P, sendo que as posições da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID n° 2 e, opcionalmente, sendo que a variante compreende pelo menos uma substituição selecionada a partir do grupo de A001E, S009T, S018T, Y021N, S024G, S033T, P040A, K043Y, N061G/P/S, S063G, N076D, A088T, Q103H, N109A/G/Q/S, A116T, G128S, G131H, K141R, T158S, S162G, G169A, S204E, Q206D, N218S, N243P/V, S248A/N, S249A, K256R, L257G, e S260P, e, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID n° 2. Também estão incluídas composições, incluindo composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante de protease e métodos de limpeza utilizando pelo menos uma tal variante de protease, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

Exemplo 9

Construção e desempenho de limpeza das variantes de uma biblioteca

combinatória baseada em BPN'-v36 original

[00486] Uma biblioteca combinatória de BPN' com base na molécula original de BPN'-v36 foi feita pela DNA 2.0 e entregue como uma reação de ligação. Para a transformação eficaz de *B. subtilis*, o DNA da mistura de reação de ligação foi amplificado antes da transformação e os transformantes foram cultivados conforme descrito no exemplo 2. As variantes foram testadas para o desempenho de limpeza usando um teste em amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 a 16°C e pH 8 e um teste em amostras de tecido com ovo na composição detergente 4 a 16°C e pH 8. O teor de proteína foi determinado usando o teste TCA. Os testes foram feitos conforme descrito no exemplo 1 e os índices de desempenho foram calculados em relação a BPN'-v36 (isto é, BPN'-S24G-S53G-S78N-S101N-G128A-Y217Q) (com um valor de PI de 1,0).

[00487] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI maior que 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, maior que 1,0 até cerca de 10, maior que 1,0 até cerca de 8, ou maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 a pH 8 e 16°C: BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q sequência de aminoácidos (SEQ ID n° 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em A088T-A116T-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-N243V-L257G, A088T-T158S-N218S-K256R, A088T-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-A153S-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-L257G, A114S-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-

T158S-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-S248N-L257G, A088T-A116T-T158S, A088T-N109G-A116T-G131H-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-N243V-L257G, A088T-N109G-N243V-S248N, A088T-N109G-T158S-N243V-L257G, A088T-N109G-T158S-N243V-S248N-L257G, A116T-T158S-S248N-L257G, Y006H-A116T-G131H-S248N, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V, A088T-A116T-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N212D-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-V148A-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-K256R, A088T-N109G-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-T158S-K256R, A088T-N109G-T158S-N243V, A088T-T158S-N243V-K256R-L257G, A116T, A116T-N218S-N243V-L257G-N269S, A116T-T158S-K256R-L257G, N109G-A116T-K256R-L257G, N109G-A116T-N243V, N109G-A116T-T158S-N243V-K256R-L257G, N109G-G131H-L257G, N109G-G131H-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-K256R-L257G, S003P-A116T-T158S-S248N-K256R, T158S-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-N243V-K256R, A088T-A116T-G131H-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-V147A-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-S248N-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S, A088T-A116T-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-L257G, A088T-G131H-N243V-L257G, A088T-G131H-T158S-S248N-L257G, A088T-L257G, A088T-N109G-A116T, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-

G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-W241R-S248N-K256R, A088T-N109G-K256R-L257G, A088T-N109G-L257G, A088T-N109G-N243V, A088T-N109G-N243V-K256R, A088T-N109G-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-S248N-K256R, A088T-N109G-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-T158S-N243V-K256R, A088T-N109G-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N243V-S248N-A274D, A088T-N109G-T158S-S248N-L257G, A088T-T158S-K256R, A088T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-T158S-N243V-L257G, A116T-G131H-N218S-N243V-S248N, A116T-G131H-S248N-L257G, A116T-S248N-K256R-L257G, A116T-T158S-N218S-N243V-K256R, A116T-T158S-N218S-S248N-L257G-Q271R, A116T-T158S-N243V-K256R-L257G, A116T-T158S-N243V-S248N-L257G, G131H-S248N, G131H-T158S-I234T-N243V-K256R, G131H-W241L-N243V-S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-A137V-T158S-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-A151S-N218S-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N, N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N, N109G-A116T-S248N, N109G-A116T-T158S-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S-W241R-N243V, N109G-A116T-T158S-N243V-S248N-L257G, N109G-A116T-T158S-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-S248N-L257G, N109G-G131H-N218S-L257G, N109G-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G-A274T, N109G-K256R, N109G-N243V-L257G, N109G-T158S-N218S-

K256R-L257G, N109G-T158S-N218S-L257G, N109G-T158S-S248N-K256R, P014L-A015L-L016C-H017T-S018L-Q019K-G020A-Y021T-T022L-G023E, S003F-A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-K256R-L257G, V004A-A088T-A116T-T158S-N218S, V004A-N109G-A116T-G131H-S248N-K256R-L257G, V004L-A116T-N218S-N243V-S248N-L257G, Y006H-N109G-N218S-N243V-S248N, A001T-A116T-T158S-N243V-L257G, A088T-A116T, A088T-A116T-G131H-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N243V-L257G, A088T-A116T-G131H-N243V-S248N, A088T-A116T-G131H-T158S-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-A273T, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-S248N, A088T-A116T-G131H-T158S-S248N-L257G, A088T-A116T-K256R, A088T-A116T-K256R-L257G, A088T-A116T-N218S-N243V-L257G, A088T-A116T-N243V-K256R, A088T-A116T-N243V-L257G, A088T-A116T-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-S248N-K256R, A088T-A116T-T158S-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R-N269S, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N243V-K256R, A088T-A116T-T158S-N243V-L257G, A088T-A116T-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-S248N-K256R, A088T-A116T-V143A-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-V147I-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-G131H-K256R-L257G, A088T-G131H-

N218S-N243V-S248N, A088T-G131H-N218S-S248N-L257G, A088T-G131H-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-K256R, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-S248N, A088T-G131H-T158S-N243V, A088T-G131H-T158S-N243V, A088T-G131H-T158S-N243V-S248N, A088T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-I107T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218T-N243V, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S, A088T-N109G-A116T-N218S-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-N218T-K256R, A088T-N109G-A116T-N218T-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N243V, A088T-N109G-

A116T-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N243V-K256R-L257G-N269D, A088T-N109G-A116T-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-S248N, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N243V, A088T-N109G-G131H-N243V-L257G, A088T-N109G-G131H-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-L257G, A088T-N109G-L257G, A088T-N109G-N218S-K256R, A088T-N109G-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-N243V-S248N-L257G-I268V, A088T-N109G-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-K256R, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-T158S-N243V-K256R-I268V, A088T-N109G-T158S-N243V-S248N-Q275R, A088T-N218S-N243V, A088T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N218S-S248N, A088T-N218S-S248N-

L257G, A088T-N243V, A088T-N243V, A088T-N243V-K256R, A088T-N243V-L257G, A088T-S145T-T158S-S248N, A088T-T158S-L257G, A088T-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-T158S-N243V-K256R-L257G-Q271H, A088T-T158S-S248N, A088T-V143A-T158S-K256R, A116T-G131H-K256R, A116T-G131H-N218S, A116T-G131H-N243V, A116T-G131H-N243V-K256R, A116T-G131H-N243V-L257G, A116T-G131H-S248N-K256R, A116T-G131H-T158S-N218S-I234T-N243V-S248N-K256R, A116T-G131H-T158S-N243V-L257G, A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, A116T-G131H-V143F-T158S-N218S, A116T-L257G, A116T-N218S, A116T-N218S-L257G, A116T-N218S-N243V-L257G, A116T-N243V, A116T-N243V-K256R, A116T-N243V-S248N, A116T-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-S248N, A116T-T158S, A116T-T158S-N218S-N243V, A116T-T158S-N218S-S248N, A116T-T158S-N243V, A116T-T158S-N243V-K256R, A116T-T158S-N243V-L257G, A116T-T158S-N243V-S248N, A116T-T158S-S248N-K256R-L257G, A116T-V149I-T158S-N243V-S248N-K256R-Q271H, G131H-N218S-N243V-L257G, G131H-N243V, G131H-N243V-S248N-K256R, G131H-T158S, G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-N243V-K256R, N109G-A116T-G131H-N243V-L257G, N109G-A116T-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-S248N, N109G-A116T-G131H-S248N-I268V, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-S248N, N109G-A116T-G131H-T158S-S248N-K256R, N109G-A116T-N218S, N109G-A116T-N218S-N243V-K256R, N109G-A116T-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-N218S-S248N-L257G, N109G-A116T-N243V-K256R,

N109G-A116T-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-S248N-L257G, N109G-A116T-T158S-G211V-N243V-S248N-K256R, N109G-A116T-T158S-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S, N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-N243V, N109G-A116T-T158S-Q275R, N109G-G131H-A137V-T158S-N218S-S248N, N109G-G131H-N218S-K237N, N109G-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-G131H-N218S-S248N-K256R, N109G-G131H-N243V-K256R-L257G, N109G-G131H-S145F-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-G131H-S248N-K256R, N109G-G131H-S248N-L257G, N109G-G131H-T158S-K256R, N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, N109G-G131H-T158S-N243V, N109G-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-N243V-L257G, N109G-G131H-T158S-S248N-L257G, N109G-G131H-T158S-S248N-Q271R, N109G-N218S-L257G, N109G-N218S-N243V, N109G-N243V-K256R-L257G, N109G-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-T158S-I268V, N109G-T158S-K256R, N109G-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-T158S-N218S-S248N-L257G, N109G-T158S-N243V, N109G-T158S-N243V-K256R-L257G, N109G-T158S-N243V-S248N, N109S-A116T-S248N, N218S, N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, N218S-S248N-L257G, N243V, N243V-K256R, N243V-S248N-K256R, N243V-S248N-K256R-L257G, S105P-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, S248N, T158S-N243V-K256R, e T158S-N243V-L257G, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36, e um valor de PI maior do que o de BPN', BPN'-v3 e BPN'-v36 neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em com-

paração a BPN' (SEQ ID n° 2), atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36, um valor de PI maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v3, e/ou um valor de PI maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID n° 2 ou da SEQ ID n° 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID n° 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00488] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q, sequência de aminoácidos (SEQ ID n° 6), compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em A088T, A088T-A116T-G131H-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-A274T, A088T-A116T-G131H-N218S-K256R, A088T-A116T-G131H-N218S-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N-L257G,

A088T-A116T-G131H-N243V, A088T-A116T-G131H-N243V-K256R, A088T-A116T-G131H-N243V-S248N, A088T-A116T-G131H-N243V-S248N-A274V, A088T-A116T-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-K256R, A088T-A116T-L257G, A088T-A116T-N218S, A088T-A116T-N218S-N243V-K256R, A088T-A116T-N218S-N243V-N269D, A088T-A116T-N218S-N243V-S248N, A088T-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-N218S-S248N, A088T-A116T-N218S-S248N-L257G, A088T-A116T-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-S248N, A088T-A116T-S248N-K256R, A088T-A116T-T158S-A216S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-K256R, A088T-A116T-

T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-S248N, A088T-A116T-T158S-N243V-K256R, A088T-A116T-T158S-N243V-S248N, A088T-A116T-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-T158S-S248N, A088T-G131D-T158S-N243V-S248N, A088T-G131H-A138V-N218S-L257G, A088T-G131H-K256R, A088T-G131H-N218S-N243V-K256R, A088T-G131H-N218S-N243V-K256R, A088T-G131H-N218S-S248N, A088T-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-N218T-L257G, A088T-G131H-N243V-L257G, A088T-G131H-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-S248N, A088T-G131H-S248N-L257G, A088T-G131H-T158S-K256R, A088T-G131H-T158S-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S, A088T-G131H-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-G131H-T158S-N218S-S248N, A088T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G-I268V, A088T-G131H-T158S-N243V-K256R, A088T-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N243V-S248N, A088T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-S248N, A088T-G131H-T158S-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-S248N-K256R,

A088T-N109G-A116T-G131H-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218T-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-V149A-T158S-N218S-K256R, A088T-N109G-A116T-K256R, A088T-N109G-A116T-N218S-K256R, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-N218S-S248N, A088T-N109G-A116T-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-S248N, A088T-N109G-A116T-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S, A088T-N109G-A116T-T158S-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-

T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-S248N, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-T158S-S248N, A088T-N109G-A116T-T158S-S248N-K256R, A088T-N109G-A137E-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-A152S-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S, A088T-N109G-G131H-N218S, A088T-N109G-G131H-N218S-K256R, A088T-N109G-G131H-N218S-K256R, A088T-N109G-G131H-N218S-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N243V-K256R, A088T-N109G-G131H-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N243V-L257G, A088T-N109G-G131H-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S, A088T-N109G-G131H-T158S-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-

N109G-G131H-T158S-N243V-S248N, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-S248N, A088T-N109G-G131H-T158S-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-V149A-K256R-L257G, A088T-N109G-G154A-N155P-E156T-G157L-T158M-S159E-G160E-S161L, A088T-N109G-K256R-L257G, A088T-N109G-N218S-K256R, A088T-N109G-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-N218S-S248N, A088T-N109G-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-S248N, A088T-N109G-S248N, A088T-N109G-T158S-N218S, A088T-N109G-T158S-N218S-K256R-Q271H, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-K256R-Q275R, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-S248N, A088T-N109G-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-T158S-N218S-S248N-N269D, A088T-N109G-T158S-N243V-K256R, A088T-N109G-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G-N269D, A088T-N109G-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-S248N-L257G, A088T-N109G-V147A-N218S-N243V-K256R, A088T-N218S, A088T-N218S-K256R, A088T-N218S-L257G-I268V, A088T-N218S-N243V, A088T-N218S-N243V-K256R, A088T-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N218S-N243V-L257G, A088T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N218S-N243V-S248N-N269S, A088T-N218S-S248N-K256R, A088T-N243V-S248N, A088T-N243V-S248N-K256R, A088T-N243V-S248N-K256R, A088T-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N243V-S248N-L257G, A088T-S248N, A088T-S248N,

A088T-S248N-K256R-L257G, A088T-S248N-L257G, A088T-S248N-L257G-I268V, A088T-T158S, A088T-T158S, A088T-T158S-N218S, A088T-T158S-N218S-K256R, A088T-T158S-N218S-L257G, A088T-T158S-N218S-N243V-K256R-I268V, A088T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-T158S-N218S-S248N, A088T-T158S-N243V-K256R, A088T-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-T158S-S248N, A088T-T158S-S248N-L257G, A088T-V147A-K256R, A098S-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-G131H-N218S-K256R, A116T-G131H-N218S-K256R-L257G, A116T-G131H-N218S-L257G, A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, A116T-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, A116T-G131H-N243V-S248N, A116T-G131H-N243V-S248N-L257G, A116T-G131H-T158S-A231V-N243V-L257G, A116T-G131H-T158S-K256R, A116T-G131H-T158S-K256R-L257G, A116T-G131H-T158S-N218S-K256R, A116T-G131H-T158S-N218S-K256R-L257G, A116T-G131H-T158S-N218S-N243V, A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-L257G, A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A116T-G131H-T158S-N218T-L257G, A116T-G131H-T158S-S248N-K256R, A116T-G131H-T158S-S248N-L257G, A116T-N218S-K256R, A116T-N218S-K256R-L257G, A116T-N218S-N243V-S248N-K256R, A116T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-N218S-N243V-S248N-L257G, A116T-N218S-S248N, A116T-N218S-S248N-K256R, A116T-N218S-S248N-L257G, A116T-N243V-S248N-L257G, A116T-S248N-L257G, A116T-T158S-L257G-Q271R, A116T-T158S-N218S-L257G, A116T-T158S-N218S-N243V-

K256R-L257G, A116T-T158S-N218S-S248N-K256R, A116T-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, A116T-T158S-N243V-S248N-K256R, A116T-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, G024S-G053S-N078S-G097A-N101S-A128S, G131H, G131H-N218S, G131H-N218S-K256R, G131H-N218S-N243V-K256R, G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, G131H-N218S-N243V-S248N, G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, G131H-N218S-S248N-L257G, G131H-N243V-K256R, G131H-N243V-K256R-L257G, G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, G131H-S248N-K256R, G131H-T158S-K256R, G131H-T158S-K256R-L257G, G131H-T158S-N218S-K256R, G131H-T158S-N218S-K256R-L257G, G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, G131H-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, G131H-T158S-N243V-K256R, G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, G131H-T158S-S248N-L257G, G131H-V147I-N218S-S248N-K256R, I107T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, I107T-N109G-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G, N109G-A116T-G131H, N109G-A116T-G131H-A144V-T158S-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R, N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-N243V, N109G-A116T-G131H-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-N243V-S248N, N109G-A116T-G131H-N243V-S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-T158S-K256R, N109G-A116T-G131H-T158S-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, N109G-

A116T-G131H-T158S-N243V-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-S248N-L257G, N109G-A116T-G131H-V147A-T158S-N218S-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-V149A-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, N109G-A116T-K256R, N109G-A116T-N218S-K256R, N109G-A116T-N218S-N243V, N109G-A116T-N218S-N243V-L257G, N109G-A116T-N218S-N243V-S248N-I268V, N109G-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-N218S-N243V-S248N-L257G, N109G-A116T-N243V-S248N, N109G-A116T-N243V-S248N-K256R, N109G-A116T-N243V-S248N-L257G, N109G-A116T-S248N-K256R, N109G-A116T-T158S, N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S-S248N-K256R, N109G-A116T-T158S-N243V-L257G, N109G-A116T-T158S-N243V-S248N, N109G-A116T-T158S-S248N, N109G-A116T-T158S-S248N-K256R, N109G-G131H, N109G-G131H-K256R, N109G-G131H-N218S-K256R, N109G-G131H-N218S-K256R-L257G, N109G-G131H-N218S-N243V-L257G, N109G-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, N109G-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, N109G-G131H-N218S-S248N-L257G, N109G-G131H-N243V, N109G-G131H-N243V-K256R, N109G-G131H-N243V-S248N, N109G-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-N243V-S248N-L257G, N109G-G131H-T158S-N218S-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-N218S-L257G, N109G-G131H-T158S-N218S-N243V, N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-N243V-K256R-I268V, N109G-G131H-T158S-N243V-S248N, N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, N109G-G131H-T158S-S248N, N109G-G131H-T158S-

S248N-K256R-L257G, N109G-K141E-N218S-S248N-L257G, N109G-N218S, N109G-N218S-N243V-K256R, N109G-N218S-N243V-L257G, N109G-N218S-N243V-S248N-S260F, N109G-N218S-S248N, N109G-N218S-S248N-K256R, N109G-N243V-K256R, N109G-N243V-S248N, N109G-N243V-S248N-K256R, N109G-N243V-S248N-L257G, N109G-N243V-S248N-L257G-Q275R, N109G-S182F-S204F-S207L-N218S-S236F-S248N-L257G, N109G-S248N-K256R, N109G-T158S-K256R-L257G, N109G-T158S-L257G, N109G-T158S-N218S-N243V-K256R, N109G-T158S-N218S-N243V-S248N, N109G-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, N109G-T158S-N243V-K256R, N109G-T158S-N243V-S248N-K256R, N109G-T158S-N243V-S248N-L257G, N109G-T158S-S248N-L257G, N218S-N243V-L257G, N218S-N243V-S248N-K256R, N243V-K256R-L257G, N243V-S248N-L257G-Q271R, P057Q-A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N, S003P-A116T-N218S-K256R, S003P-N109G-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, S248N-K256R-L257G, T158S-K256R-L257G, T158S-N218S-A272V, T158S-N218S-K256R-L257G, T158S-N218S-L233S, T158S-N218S-N243V, T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, T158S-N218S-N243V-L257G, T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, T158S-N218S-S248N-K256R, T158S-N243V, T158S-N243V-K256R-L257G, T158S-N243V-S248N, T158S-N243V-S248N-K256R-N269D, e V004A-N109G-A116T-T158S-N218S-S248N-L257G, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2), um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3, e um valor de PI de 1,0 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo

menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00489] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em A088T-A098S-N218S-K256R, A088T-A116T-G131H-K256R, A088T-A116T-G131H-K256R-L257G-L267M, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-N243V, A088T-A116T-G131H-S248N, A088T-A116T-G131H-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-

A116T-K256R-L257G, A088T-A116T-N218S-L268V, A088T-A116T-N218S-K256R, A088T-A116T-N218S-N243V-Q271R, A088T-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R-Q275R, A088T-A116T-N218S-S248N, A088T-A116T-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-T158S, A088T-A116T-T158S-N218S-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-S248N, A088T-A116T-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-A116T-T158S-S248N-L257G, A088T-G131H, A088T-G131H, A088T-G131H-N218S-K237R-K256R-L257G, A088T-G131H-N218S-K256R, A088T-G131H-N218S-K256R-L257G, A088T-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-G131H-N218S-N243V-L257G, A088T-G131H-N218S-N243V-L257G, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-N218S-S248N, A088T-G131H-N243V, A088T-G131H-N243V-K256R, A088T-G131H-N243V-K256R-L257G, A088T-G131H-N243V-S248N, A088T-G131H-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-S248N, A088T-G131H-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-L257G, A088T-

N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-N269D, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-Q275R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-L257G-L268V, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-W241L-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-K256R, A088T-N109G-A116T-N218S-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-N218S-S248N, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-A138V-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G-Q275R, A088T-N109G-G131H-N243V-S248N, A088T-N109G-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S, A088T-N109G-G131H-T158S-L233S-N243V-S248N, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-

S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-V149A-K256R-L257G, A088T-N109G-N218S-K256R-L257G, A088T-N109G-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-N243V-K256R, A088T-N109G-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S, A088T-N109G-T158S-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-S248N, A088T-N109G-T158S-S248N, A088T-N109G-T158S-S248N, A088T-N218S-N243V-K256R, A088T-N218S-N243V-L257G, A088T-N218S-N243V-S248N, A088T-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N218S-S248N, A088T-N218S-S248N-L257G, A088T-S248N-K256R-L257G, A088T-T158S-K256R, A088T-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-T158S-N218S-S248N, A088T-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-T158S-N218S-S248N-L257G-Q275K, A088T-T158S-N243V, A088T-T158S-N243V-K256R, A088T-T158S-N243V-S248N, A088T-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-T158S-S248N-L257G, A088T-V147I-N218S-N243V-K256R-L257G, A116T-G131H-L257G, A116T-G131H-N218S-N243V, A116T-G131H-

N218S-N243V-K256R-L257G, A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-G131H-N218S-S248N, A116T-G131H-N218S-S248N-K256R, A116T-G131H-N243V-S248N-K256R, A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A116T-G131H-T158S-N218S-S248N, A116T-G131H-T158S-N243V-K256R, A116T-G131H-V139I-N218S-N243V-S248N, A116T-K141E-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-K256R, A116T-N218S-N243V-S248N, A116T-N218T-N243V-S248N, A116T-N243V-K256R-L257G, A116T-S248N-K256R, A116T-T158S-N218S-K256R, A116T-T158S-N218S-K256R-L257G, A116T-T158S-N218S-N243V-L257G, A116T-T158S-N218S-N243V-S248N, A116T-T158S-N218S-S248N-L257G, G024S-G053S-N078S-G097A-N101S, G053S-A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-G169S-N218S-S248N-K256R-L257G, G131H-K141R-T158S-N218S-K256R, G131H-K256R, G131H-N218S-K256R-L257G, G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, G131H-N218S-S248N-K256R, G131H-N243V-S248N, G131H-N243V-S248N-L257G, G131H-T158S-N218S, G131H-T158S-N218S-N240H-N243V-S248N-K256R-L257G, G131H-T158S-N218S-N243V, G131H-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G-N269S, G131H-T158S-N243V-L257G, G131H-T158S-N243V-S248N, G131H-T158S-S248N, K256R, K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-N243V, N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-S248N-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-W241R-N243V-K256R, N109G-A116T-G131H-S248N-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-K256R, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-I234T-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-N218S-N243V-S248N, N109G-A116T-N243V-K256R-L257G,

N109G-A116T-T158S-N218S-K237R-N243V-S248N, N109G-G131H-N218S-N243V-S248N, N109G-G131H-S248N, N109G-G131H-T158S, N109G-G131H-T158S-L257G, N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-S248N-K256R, N109G-N218S-K256R-L257G, N109G-N218S-N243V-S248N-K256R, N109G-N218S-S248N-L257G, N109G-S248N, N109G-T158S-N218S, N109G-T158S-N218S-N243V, N109G-T158S-N243V-L257G, N218S-K256R, N218S-N243V-K256R, N218S-N243V-S248N, N218S-S248N, N218S-S248N-K256R, N243V-L257G, S003P-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N, S003P-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-K256R, S105H-W106G-I107L-I108S-N109A-G110A-I111S-E112N-W113G-A114P, S248N-L257G, T158S, T158S-K256R, T158S-N218S, T158S-N218S-K256R, T158S-N218S-L233S-S248N, T158S-N218S-L257G, T158S-N218S-N243V-K256R, T158S-N218S-N243V-S248N, T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, T158S-N218S-S248N-L257G, T158S-N243V-S248N-L257G, T158S-S248N, e V004L-A088T-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica e/ou um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de

aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00490] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que 0,9 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em A015S-A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-S248N, A088T-A098S-G131H-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-N218S-L257G, A088T-A116T-T158S-K256R, A088T-A116T-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-K141E-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-G131H-K256R, A088T-G131H-N218S-K256R, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-I107T-N109G-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-D140G-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-I268V, A088T-N109G-A116T-G131H-V149A-

N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-D140G-N243V, A088T-N109G-G131H-D140G-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-K141E-T158S-N218S-K256R, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N-K256R-Q271R, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-V149L-T158S-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S, A088T-N109G-T158S-N218S-K256R-L257G-Q271K, A088T-N109G-T158S-N218S-L257G, A088T-N109G-T158S-S248N-K256R, A088T-N218S-S248N-L257G-Q271R, A088T-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-Y104H-A116T-G131H-N218S-N243V, A116T-G131H-K141E-N218S-N243V-S248N-L257G, A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G-N269D, A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-Q271R, A116T-G131H-T158S-N243V-S248N, A116T-G157E-T158S-N243V-S248N-K256R, A116T-T158S-N218S, G131H-N218S-L257G, G131H-N218S-S248N, G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, G131H-T158S-N218S-S248N-I268V, I107T-N109G-G131H-N218S-L257G, L090I-N109G-T158S-N243V, L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-K256R-L257G-Q271R, N109G-A116T-N218S-W241R-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-K141E-L257G, N109G-G131H-N218S-N243V, N109G-T158S-N218S-N243V-L257G, N109G-T158S-N218S-S248N-K256R, N109G-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, N218S-S248N-K256R-L257G, S003P-N109G-G131H-T158S-L257G, S003P-S248N-L257G, T158S-S248N-K256R-L257G, V004A-A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, Y006H-N218S-N243V-S248N, Y104H-N109G-G131H-N243V-S248N, A088T-

A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-T158S-N243V, A088T-G131H-T158S-N218S-I234T-S248N-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-V149L-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-I107T-N109G-G131H-N218S-A223G-S248N-K256R, A088T-K213N-N243V-S248N-K256R, A088T-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-A232S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-D140G-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-M124I-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-V148A-N218S-N243V, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-N218S-S248N-T255K-K256R-L257G, A088T-T158S-N218S-L257G, A088T-T158S-N218S-Q245K-S248N-K256R, A088T-T158S-N218S-S248N-K256R, A116T-G131H-N218S-N243V-K256R, A116T-G131H-N218S-W241R-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-G131H-T158S-N218S-L257G, A116T-G131H-V150A-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, I107T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-K141E-T158S-N218S-N243V-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N, T158S-N243V-S248N-K256R, T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-G146C, A088T-A116T-N218S, A088T-A116T-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-A138E-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243F-S248N, A088T-T158S-V203I-N218S-K256R-L257G, A116T-D140G-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-A116T-T158S-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-E251K-K256R-L257G, A088T-I108T-N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-K141E-N218S, A088T-N109G-W241R-S248N-K256R, e G065D-A088T-G131H-N243V-S248N, sendo que as posições de aminoácido da variante são

numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica e/ou um valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que 0,9 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00491] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI maior que 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, maior que 1,0 até cerca de 10, maior que 1,0 até cerca de 8, ou maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com ovo na composição detergente 4 a pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-L257G, A116T-N218S-N243V-L257G-N269S, A088T-A116T-K256R, A088T-G131H-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-

K256R-A273T, A088T-A116T-N243V-L257G, A088T-A116T-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N243V-L257G, A088T-A116T-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-K256R-L257G, A088T-N109G-N218S-S248N-L257G, A088T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-T158S-N218S-S248N-L257G, A116T-N218S-K256R-L257G, N109G-A116T, N109G-A116T-G131H-T158S-L257G, N109G-A116T-N243V, N109G-A116T-N243V-K256R, N109G-A116T-T158S-L257G, N109G-K256R, N109G-N243V-K256R-L257G, S003P-N109G-G131H-T158S-K256R, A088T-A116T, A088T-A116T-G131H-N218S-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-A116T-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-S248N-L257G, A088T-A116T-N218S-N243V-L257G, A088T-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R-Q275R, A088T-A116T-T158S-A216S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R-N269S, A088T-A116T-T158S-N243V, A088T-A116T-T158S-N243V-K256R, A088T-A116T-V147I-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-G131H-K256R-L257G, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-

S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-I107T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-I107T-N109G-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-A153S-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-N218T-K256R, A088T-N109G-A116T-N218T-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N243V, A088T-N109G-A116T-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N243V-K256R-L257G-N269D, A088T-N109G-A116T-T158S, A088T-N109G-A116T-T158S, A088T-N109G-A116T-T158S-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-A138V-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-L257G,

A088T-N109G-G131H-V149A-K256R-L257G, A088T-N109G-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-N243V, A088T-N109G-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-N243V-L257G, A088T-N109G-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-K256R, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-K256R-Q275R, A088T-N109G-T158S-N243V, A088T-N109G-T158S-N243V-K256R-I268V, A088T-N109G-T158S-N243V-L257G, A088T-N109G-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-N218S-N243V-L257G, A088T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N218S-S248N, A088T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-V143A-T158S-K256R, A088T-V147I-N218S-N243V-K256R-L257G, A114S-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, A116T-G131H-N243V-K256R, A116T-G131H-N243V-L257G, A116T-G131H-N243V-S248N-K256R, A116T-G131H-S248N-L257G, A116T-G131H-T158S-N218S-I234T-N243V-S248N-K256R, A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A116T-N218S-L257G, A116T-T158S-N218S-K256R-L257G, A116T-T158S-N218S-S248N, A116T-T158S-N218S-S248N-L257G-Q271R, A116T-T158S-N243V-S248N-L257G, A116T-T158S-S248N-L257G, G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, I107T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-A137V-T158S-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-A151S-N218S-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-L257G, N109G-A116T-G131H-N243V-L257G, N109G-A116T-G131H-S248N-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-K256R-L257G, N109G-A116T-N218S-N243V-K256R, N109G-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G,

N109G-A116T-N218S-N243V-S248N-L257G, N109G-A116T-N243V-S248N-K256R, N109G-A116T-S248N-L257G, N109G-A116T-T158S-G211V-N243V-S248N-K256R, N109G-A116T-T158S-N218S, N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N, N109G-G131H-N218S-K237N, N109G-G131H-N218S-K256R-L257G, N109G-G131H-N218S-L257G, N109G-G131H-N218S-N243V-L257G, N109G-G131H-N243V-K256R-L257G, N109G-G131H-N243V-S248N-L257G, N109G-G131H-S248N-K256R, N109G-G131H-T158S-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-N218S-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-N243V, N109G-N218S, N109G-N218S-N243V-L257G, N109G-T158S-N218S-K256R-L257G, N109G-T158S-N218S-L257G, N109G-T158S-N218S-N243V-K256R, N109G-T158S-N243V-L257G, N243V-K256R-L257G, N243V-L257G, S003F-A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-K256R-L257G, T158S-N218S-L233S, T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, V004A-N109G-A116T-T158S-N218S-S248N-L257G, Y006H-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-A272G, A088T-A098S-N218S-K256R, A088T-A116T-G131H-K256R-L257G-L267M, A088T-A116T-G131H-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-A274T, A088T-A116T-G131H-N218S-K256R, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-N243V-K256R, A088T-A116T-G131H-N243V-L257G, A088T-A116T-G131H-N243V-S248N, A088T-A116T-G131H-N243V-S248N-A274V, A088T-A116T-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-K256R-L257G, A088T-A116T-

G131H-T158S-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-K256R, A088T-A116T-N218S-K256R, A088T-A116T-N218S-N243V-K256R, A088T-A116T-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-N243V-K256R, A088T-A116T-N243V-L257G, A088T-A116T-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-S248N, A088T-A116T-S248N-K256R, A088T-A116T-S248N-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S, A088T-A116T-T158S-N218S-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-G131H, A088T-G131H-N218S-K256R-L257G, A088T-G131H-N218S-N243V-K256R, A088T-G131H-N218S-N243V-K256R, A088T-G131H-N218S-N243V-L257G, A088T-G131H-N218S-N243V-L257G, A088T-G131H-N218S-S248N, A088T-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-N218S-S248N-L257G, A088T-G131H-N218T-L257G, A088T-G131H-

N243V-L257G, A088T-G131H-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-S248N, A088T-G131H-S248N-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-K256R, A088T-G131H-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-S248N, A088T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G-I268V, A088T-G131H-T158S-N243V, A088T-G131H-T158S-N243V-S248N, A088T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T, A088T-N109G-A116T-G131H-D140G-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-

G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-
G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-
G131H-T158S-N218S-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-
N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-
S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-
L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218T-N243V, A088T-
N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-
A116T-G131H-T158S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-
T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-
N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-S248N-
K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-S248N-L257G,
A088T-N109G-A116T-K256R, A088T-N109G-A116T-N218S, A088T-
N109G-A116T-N218S-N243V, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-
K256R, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-
N109G-A116T-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-
N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N243V-S248N,
A088T-N109G-A116T-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-
N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N243V-S248N-
K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N243V-S248N-L257G, A088T-
N109G-A116T-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-S248N-K256R-
L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-K256R, A088T-N109G-A116T-
T158S-N218S, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-K256R-L257G,
A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-L257G, A088T-N109G-A116T-
T158S-N218S-N243V, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-
L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-
N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-
A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-
T158S-N218S-S248N, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-S248N-
K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-
N109G-A116T-T158S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-

N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-T158S-S248N, A088T-N109G-A116T-T158S-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-K256R, A088T-N109G-G131H-N218S-K256R, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N243V-L257G, A088T-N109G-G131H-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-S248N, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-W241R-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-V148A-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-G154A-N155P-E156T-G157L-T158M-S159E-G160E-S161L, A088T-N109G-N218S-K256R, A088T-N109G-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-N243V-K256R, A088T-N109G-N243V-S248N, A088T-N109G-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-S248N, A088T-N109G-T158S-N218S, A088T-N109G-T158S-N218S-K256R, A088T-N109G-T158S-N218S-K256R-L257G,

A088T-N109G-T158S-N218S-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N243V-K256R, A088T-N109G-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-S248N-L257G, A088T-N109G-T158S-S248N-L257G, A088T-N109G-V147A-N218S-N243V-K256R, A088T-N218S-L257G-I268V, A088T-N218S-N243V, A088T-N218S-N243V-S248N, A088T-N218S-N243V-S248N-N269S, A088T-N218S-S248N-K256R, A088T-N218S-S248N-L257G-Q271R, A088T-N243V, A088T-N243V, A088T-N243V-K256R, A088T-N243V-S248N-K256R, A088T-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-S248N, A088T-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-T158S-N243V-K256R-L257G-Q271H, A088T-T158S-N243V-S248N, A088T-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-T158S-S248N, A088T-V147A-K256R, A116T-G131H-K256R, A116T-G131H-N218S, A116T-G131H-N218S-K256R-L257G, A116T-G131H-N218S-L257G, A116T-G131H-N218S-N243V, A116T-G131H-N218S-S248N-K256R, A116T-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, A116T-G131H-N243V-S248N, A116T-G131H-N243V-S248N-L257G, A116T-G131H-S248N-K256R, A116T-G131H-T158S-A231V-N243V-L257G, A116T-G131H-T158S-N218S-K256R, A116T-G131H-T158S-N218S-K256R-L257G, A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-G131H-T158S-N218S-S248N, A116T-G131H-T158S-N243V-L257G, A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, A116T-G131H-T158S-

S248N-K256R, A116T-G131H-T158S-S248N-L257G, A116T-G131H-V143F-T158S-N218S, A116T-K256R, A116T-N218S, A116T-N218S-K256R, A116T-N218S-N243V-L257G, A116T-N218S-N243V-S248N-K256R, A116T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-N218S-N243V-S248N-L257G, A116T-N218S-S248N-L257G, A116T-N243V, A116T-N243V-K256R-L257G, A116T-N243V-S248N, A116T-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-S248N-K256R-L257G, A116T-T158S-K256R-L257G, A116T-T158S-N218S, A116T-T158S-N218S-K256R, A116T-T158S-N218S-N243V, A116T-T158S-N218S-N243V-S248N, A116T-T158S-N218S-S248N-K256R, A116T-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, A116T-T158S-N243V-K256R, A116T-T158S-N243V-L257G, A116T-T158S-N243V-S248N, A116T-T158S-S248N-K256R-L257G, G131H-K141R-T158S-N218S-K256R, G131H-N218S, G131H-N218S-K256R, G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, G131H-N218S-N243V-S248N, G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, G131H-N243V-S248N-K256R, G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, G131H-S248N, G131H-T158S-I234T-N243V-K256R, G131H-T158S-N218S-K256R-L257G, G131H-T158S-N218S-N243V, G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, G131H-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, G131H-T158S-N243V-K256R, G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, N109G, N109G-A116T-G131H-A144V-T158S-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R, N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-N218S-S248N-L257G, N109G-A116T-G131H-N243V-K256R, N109G-A116T-G131H-N243V-S248N, N109G-A116T-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-S248N, N109G-A116T-G131H-S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-T158S-K256R, N109G-A116T-G131H-T158S-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-K256R, N109G-A116T-G131H-T158S-

N218S-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N, N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N, N109G-A116T-G131H-T158S-S248N, N109G-A116T-G131H-T158S-S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-V149A-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, N109G-A116T-N218S, N109G-A116T-N218S-K256R, N109G-A116T-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-N218S-N243V-S248N-I268V, N109G-A116T-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-N243V-S248N, N109G-A116T-N243V-S248N-L257G, N109G-A116T-T158S, N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-N243V-L257G, N109G-A116T-T158S-N243V-S248N-L257G, N109G-A116T-T158S-Q275R, N109G-A116T-T158S-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-L257G, N109G-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-N243V-K256R, N109G-G131H-S145F-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-G131H-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-S248N-L257G, N109G-G131H-T158S-K256R, N109G-G131H-T158S-N218S-L257G, N109G-G131H-T158S-N218S-N243V, N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G-A274T, N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, N109G-G131H-T158S-N243V-S248N, N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-

G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-S248N-L257G, N109G-N218S-K256R-L257G, N109G-N218S-L257G, N109G-N218S-N243V-K256R, N109G-N218S-N243V-S248N-S260F, N109G-N218S-S248N, N109G-N243V-K256R, N109G-N243V-L257G, N109G-N243V-S248N, N109G-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-S182F-S204F-S207L-N218S-S236F-S248N-L257G, N109G-S248N-K256R, N109G-T158S-K256R, N109G-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-T158S-N218S-S248N-L257G, N109G-T158S-N243V, N109G-T158S-N243V-K256R, N109G-T158S-N243V-S248N, N109G-T158S-N243V-S248N-K256R, N109G-T158S-S248N-K256R, N109G-T158S-S248N-L257G, N218S, N218S-N243V-S248N-K256R, N218S-S248N-L257G, N243V-K256R, N243V-S248N-K256R, N243V-S248N-K256R-L257G, N243V-S248N-L257G-Q271R, S003P-A116T-T158S-S248N-K256R, S248N, T158S-N218S, T158S-N218S-A272V, T158S-N218S-L257G, T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, T158S-N218S-N243V-L257G, T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, T158S-N243V-K256R, T158S-N243V-K256R-L257G, T158S-N243V-S248N-K256R, V004A-N109G-A116T-G131H-S248N-K256R-L257G, e Y006H-A116T-G131H-S248N, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36, e um valor de PI maior do que o de BPN', BPN'-v3 e BPN'-v36 neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2), atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36, um valor de PI maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v3, e/ou um valor de PI maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% ou

98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00492] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza em pequena amostra de tecido com ovo na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em A015S-A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-S248N, A088T, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N243V, A088T-A116T-G131H-N243V-K256R, A088T-A116T-G131H-N243V-S248N, A088T-A116T-G131H-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G,

A088T-A116T-G131H-T158S-S248N, A088T-A116T-G131H-T158S-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-V147A-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-N218S-I268V, A088T-A116T-N218S-L257G, A088T-A116T-N218S-N243V-N269D, A088T-A116T-N218S-S248N, A088T-A116T-N218S-S248N, A088T-A116T-N218S-S248N-L257G, A088T-A116T-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-S248N-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-S248N, A088T-A116T-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N243V-S248N, A088T-A116T-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-T158S-S248N, A088T-A116T-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-S248N-L257G, A088T-A116T-V143A-N218S-S248N-K256R, A088T-G131H-A138V-N218S-L257G, A088T-G131H-K141E-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-G131H-K256R, A088T-G131H-N218S-K256R, A088T-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-N218S-S248N, A088T-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-G131H-N243V-K256R-L257G, A088T-G131H-N243V-S248N, A088T-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-S248N, A088T-G131H-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-K256R, A088T-G131H-T158S-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-S248N, A088T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N243V,

A088T-G131H-T158S-N243V-K256R, A088T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-S248N-L257G, A088T-I107T-N109G-G131H-N218S-A223G-S248N-K256R, A088T-L257G, A088T-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-A232S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-N269D, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243F-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218T-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-I268V, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-V149A-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-K256R, A088T-N109G-A116T-N218S-K256R, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-S248N, A088T-N109G-A116T-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-S248N, A088T-N109G-A116T-T158S-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-

N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G-Q275R, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N-K256R-Q271R, A088T-N109G-G131H-N243V, A088T-N109G-G131H-N243V-K256R, A088T-N109G-G131H-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S, A088T-N109G-G131H-T158S, A088T-N109G-G131H-T158S-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-S248N, A088T-N109G-G131H-T158S-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-V149A-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-V149L-T158S-K256R-L257G, A088T-N109G-K256R, A088T-N109G-K256R-L257G, A088T-N109G-K256R-L257G, A088T-N109G-L257G, A088T-N109G-N218S-K256R, A088T-N109G-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-N218S-S248N, A088T-N109G-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-N243V-K256R, A088T-N109G-N243V-S248N-L257G-I268V, A088T-N109G-S248N, A088T-N109G-S248N-K256R, A088T-N109G-T158S-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S, A088T-N109G-T158S-N218S-K256R-Q271H, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-T158S-N218S-S248N-N269D, A088T-N109G-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N243V-S248N-A274D, A088T-N109G-T158S-N243V-

S248N-K256R-L257G-N269D, A088T-N218S-K256R, A088T-N218S-N243V, A088T-N218S-N243V-K256R, A088T-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N218S-S248N-L257G, A088T-N243V-S248N, A088T-N243V-S248N-K256R, A088T-N243V-S248N-L257G, A088T-S145T-T158S-S248N, A088T-S248N-K256R-L257G, A088T-S248N-L257G, A088T-T158S, A088T-T158S, A088T-T158S-K256R, A088T-T158S-L257G, A088T-T158S-N218S, A088T-T158S-N218S-K256R, A088T-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-T158S-N218S-S248N, A088T-T158S-N218S-S248N, A088T-T158S-N243V, A088T-T158S-N243V-K256R, A088T-T158S-N243V-S248N-L257G, A116T, A116T-G131H-L257G, A116T-G131H-N218S-K256R, A116T-G131H-N218S-N243V-K256R, A116T-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, A116T-G131H-N218S-N243V-S248N, A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, A116T-G131H-N218S-S248N, A116T-G131H-T158S-K256R, A116T-G131H-T158S-N218S-L257G, A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-L257G, A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G-N269D, A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-Q271R, A116T-G131H-T158S-N218T-L257G, A116T-G131H-T158S-N243V-K256R, A116T-G131H-V150A-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-K141E-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-L257G, A116T-N218S-N243V-S248N, A116T-N218T-N243V-S248N, A116T-N243V-S248N-L257G, A116T-S248N, A116T-S248N-L257G, A116T-T158S-K256R, A116T-T158S-N218S-L257G, A116T-T158S-N218S-N243V-K256R, A116T-T158S-N218S-N243V-L257G, A116T-T158S-N243V, A116T-T158S-N243V-K256R-L257G, A116T-T158S-N243V-S248N-K256R, A116T-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-V149I-T158S-N243V-S248N-K256R-Q271H, G024S-

G053S-N078S-G097A-N101S, G024S-G053S-N078S-G097A-N101S-A128S, G131H-K256R, G131H-N218S-K256R-L257G, G131H-N218S-N243V-L257G, G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, G131H-N218S-S248N-K256R, G131H-N218S-S248N-L257G, G131H-N243V, G131H-N243V-S248N, G131H-N243V-S248N-L257G, G131H-T158S-K256R-L257G, G131H-T158S-N218S, G131H-T158S-N218S-K256R, G131H-T158S-N218S-N240H-N243V-S248N-K256R-L257G, G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, G131H-T158S-N218S-S248N-I268V, G131H-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G-N269S, G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, G131H-T158S-N243V-S248N, G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, G131H-T158S-S248N, G131H-T158S-S248N-L257G, G131H-W241L-N243V-S248N-K256R, I107T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, I107T-N109G-G131H-N218S-L257G, N109G-A116T-G131H-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-N243V, N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-N218S-W241R-N243V-K256R, N109G-A116T-G131H-N243V-S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-S248N-I268V, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-S248N-L257G, N109G-A116T-K141E-T158S-N218S-N243V-L257G, N109G-A116T-K256R, N109G-A116T-N218S-N243V, N109G-A116T-N218S-N243V-S248N, N109G-A116T-N218S-S248N-L257G, N109G-A116T-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-S248N, N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, N109G-A116T-T158S-N218S-W241R-N243V, N109G-A116T-T158S-N243V-S248N, N109G-A116T-T158S-S248N-L257G, N109G-

G131H-K256R, N109G-G131H-N218S-K256R, N109G-G131H-N218S-N243V, N109G-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, N109G-G131H-N218S-S248N-K256R, N109G-G131H-N243V, N109G-G131H-N243V-S248N, N109G-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-S248N, N109G-G131H-T158S-L257G, N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-N243V-L257G, N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, N109G-G131H-T158S-S248N-K256R, N109G-K141E-N218S-S248N-L257G, N109G-N218S-N243V, N109G-N218S-N243V-S248N-K256R, N109G-N218S-S248N-K256R-L257G, N109G-N218S-S248N-L257G, N109G-N243V-S248N-L257G-Q275R, N109G-T158S-I268V, N109G-T158S-N218S, N109G-T158S-N218S-N243V, N109G-T158S-N218S-N243V-S248N, N109G-T158S-N218S-S248N-K256R, N109S-A116T-S248N, N218S-K256R, N218S-N243V-K256R, N218S-N243V-L257G, N218S-N243V-S248N, N218S-S248N, N218S-S248N-K256R, N218S-S248N-K256R-L257G, S003P-N109G-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, S248N-K256R-L257G, T158S-K256R, T158S-K256R-L257G, T158S-N218S-K256R-L257G, T158S-N218S-L233S-S248N, T158S-N243V, T158S-N243V-S248N-K256R-N269D, T158S-N243V-S248N-L257G, V004L-A116T-N218S-N243V-S248N-L257G, e Y006H-N218S-N243V-S248N, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2), um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3, e um valor de PI de 1,0 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo

uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00493] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que 0,9 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com ovo na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em A088T-A098S-G131H-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-K256R, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-S248N, A088T-A116T-G131H-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-K256R-L257G, A088T-A116T-K256R-L257G, A088T-A116T-N218S-N243V-Q271R, A088T-A116T-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-T158S, A088T-A116T-T158S, A088T-A116T-T158S-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-G131H,

A088T-G131H-L257G, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-G131H-N243V-K256R, A088T-G131H-N243V-L257G, A088T-G131H-N243V-S248N, A088T-G131H-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-N218S-I234T-S248N-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-S248N, A088T-G131H-T158S-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-V149L-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-K141E-N218S, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-Q275R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-V149A-T158S-N218S-K256R, A088T-N109G-A116T-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N212D-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A137E-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-D140G-N243V, A088T-N109G-G131H-A152S-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-D140G-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V, A088T-N109G-G131H-T158S-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-W241R-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-S248N-K256R, A088T-N109G-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-T158S, A088T-N109G-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-T158S-N243V-S248N-Q275R, A088T-N109G-

T158S-S248N, A088T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N243V-L257G, A088T-S248N, A088T-T158S-K256R, A088T-T158S-N218S-K256R, A088T-T158S-N218S-L257G, A088T-T158S-N218S-L257G, A088T-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-T158S-N218S-Q245K-S248N-K256R, A088T-T158S-N218S-S248N-L257G-Q275K, A088T-T158S-N243V-K256R, A088T-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-T158S-S248N, A088T-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-T158S-S248N-L257G, A088T-T158S-S248N-L257G, A098S-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-G131H-K141E-N218S-N243V-S248N-L257G, A116T-G131H-N218S-W241R-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-G131H-N243V, A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A116T-G131H-V139I-N218S-N243V-S248N, A116T-N218S-S248N-K256R, A116T-T158S-L257G-Q271R, A116T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, G053S-A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-G169S-N218S-S248N-K256R-L257G, G131H-N218S-L257G, G131H-T158S, G131H-T158S-K256R, K256R, L090I-N109G-T158S-N243V, L257G, N109G-A116T-G131H, N109G-A116T-G131H-N243V, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, N109G-A116T-S248N-K256R, N109G-A116T-T158S-N218S-K237R-N243V-S248N, N109G-A116T-T158S-S248N, N109G-G131H-T158S, N109G-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-S248N-Q271R, N109G-N218S-S248N-K256R, N109G-N243V-S248N-L257G, N109G-S248N, N109G-T158S-N218S-N243V-L257G, N109G-T158S-N243V-K256R-L257G, N109G-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, S003P-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-K256R, S003P-N109G-G131H-T158S-L257G, S105H-W106G-I107L-I108S-N109A-G110A-I111S-E112N-W113G-A114P, T158S-N218S-S248N-K256R, T158S-N243V-S248N, T158S-S248N, T158S-S248N-K256R-L257G, V004A-A088T-

A116T-T158S-N218S, V004A-A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, Y006H-N109G-N218S-N243V-S248N, Y104H-A116T-T158S-S248N, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-N218S, A088T-G131D-T158S-N243V-S248N, A088T-G131H-N218S-K237R-K256R-L257G, A088T-G131H-N218S-K256R, A088T-K213N-N243V-S248N-K256R, A088T-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-D140G-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-M124I-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-S248N, A088T-N109G-G131H-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-N243V-S248N, A088T-N109G-G131H-T158S-L233S-N243V-S248N, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-L257G, A088T-N109G-N218S-K256R-L257G, A088T-N109G-N218S-S248N-T255K-K256R-L257G, A088T-N109G-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-S248N, A088T-S248N-K256R-L257G, A088T-S248N-L257G-I268V, A088T-T158S-N243V-L257G, A088T-T158S-V203I-N218S-K256R-L257G, A088T-Y104H-A116T-G131H-N218S-N243V, A116T-D140G-T158S-N218S-N243V-S248N, A116T-G131H-T158S-K256R-L257G, A116T-G131H-T158S-N243V-S248N, A116T-G157E-T158S-N243V-S248N-K256R, A116T-S248N-K256R, G131H-N218S-S248N, G131H-N243V-K256R, G131H-T158S-N243V-L257G, K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, N109G-A116T-N218S-N243V-L257G,

N109G-A116T-N218S-W241R-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-N243V, N109G-A116T-T158S-S248N-K256R, N109G-N243V, N109G-T158S-K256R-L257G, N243V, P014L-A015L-L016C-H017T-S018L-Q019K-G020A-Y021T-T022L-G023E, S003P-S248N-L257G, T158S-N218S-N243V-S248N, T158S-S248N-K256R, Y104H-N109G-G131H-N243V-S248N, A088T-A116T-G131H-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-L257G, A088T-A116T-N218S, A088T-A116T-N218S-N243V-S248N, A088T-A116T-T158S-N218S-S248N, A088T-A116T-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-A138E-N218S-N243V-K256R, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-L257G-I268V, A088T-N109G-A116T-G131H-W241L-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-S248N, A088T-N109G-G131H-N218S-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-S248N-K256R, A088T-N109G-W241R-S248N-K256R, A088T-N218S-S248N-L257G, A088T-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-T158S-N218S-S248N-L257G, A116T-G131H-T158S-N218S-N243V, A116T-N218S-S248N, A116T-N243V-K256R, A116T-T158S, G131H-S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-I234T-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S-S248N-K256R, N109G-G131H, N109G-G131H-A137V-T158S-N218S-S248N, N109G-G131H-K141E-L257G, N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-A116T-

T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-S248N, A088T-S248N-L257G, A088T-Y104H-N109G-G131H-A137E-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, G065D-A088T-G131H-N243V-S248N, Y104H-N218S-L257G, A088T-A116T-G131H-V150A-N218S-S248N-L257G, A088T-A116T-T158S-K256R-L257G, A088T-I108T-N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-S248N-L257G-Q271P, A088T-N109G-A116T-V148A-N218S-N243V, A088T-Y104H-N109G-A116T-A153S-N218S-N243V-S248N-L257G-N269D, e V004M-A116T-V148A-T158S-N243V-S248N-K256R, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica e/ou um valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que 0,9 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00494] Também é fornecida uma variante de protease subtilisina que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN'-v36 e/ou BPN-'v3 e/ou um valor de PI maior que 1,0 a cerca de 5 em comparação a BPN'-v36 em um teste de limpeza em pequenas amos-

tras de tecido com SLT ou com ovo na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com SEQ ID nº 2 ou SEQ ID nº 6, sendo que a variante compreende pelo menos uma substituição selecionada a partir do grupo de X001R/T, X002R, X003F/P, X004A/L/M/P, X005S, X006H, X014L, X015L/S, X016C, X017T, X018L, X019K, X020A, X021T, X022L, X023E, X024S, X034S, X053S, X057Q, X065D, X078S, X086L, X088T, X090I, X097A, X098S, X101S, X104H, X105H/P, X106G, X107L/T, X108S/T, X109A/G/S, X110A, X111S, X112N, X113G, X114P/S, X116T, X124I, X128S, X131D/H, X137E/V, X138E/V, X139I, X140G, X141E/R, X143A/F, X144V, X145F/P/T, X146C, X147A/I, X148A, X149A/I/L, X150A, X151S, X152S, X153S, X154A, X155P, X156T, X157E/L, X158M/S, X159E, X160E, X161L, X169S, X182F, X203I, X204F, X207L, X211V, X212D, X213N, X216S, X218S/T, X223G, X231V, X232S, X233S, X234T, X235P, X236F/P, X237N/R, X240H, X241L/R, X243F/V, X245K, X248N, X251K, X255K, X256R, X257G, X260F, X267M, X268V, X269D/S, X271H/K/P/R, X272G/V, X273T, X274D/L/T/V, e X275K/R/S, e, opcionalmente, pelo menos uma substituição selecionada a partir do grupo de A001R/T, Q002R, S003F/P, V004A/L/M/P, P005S, Y006H, P014L, A015L/S, L016C, H017T, S018L, Q019K, G020A, Y021T, T022L, G023E, G024S, G034S, G053S, P057Q, G065D, N078S, P086L, A088T, L090I, G097A, A098S, N101S, Y104H, S105H/P, W106G, I107L/T, I108S/T, N109A/G/S, G110A, I111S, E112N, W113G, A114P/S, A116T, M124I, A128S, G131D/H, A137E/V, A138E/V, V139I, D140G, K141E/R, V143A/F, A144V, S145F/P/T, G146C, V147A/I, V148A, V149A/I/L, V150A, A151S, A152S, A153S, G154A, N155P, E156T, G157E/L, T158M/S, S159E, G160E, S161L, G169S, S182F, V203I, S204F, S207L, G211V, N212D, K213N, A216S, N218S/T, A223G,

A231V, A232S, L233S, I234T, L235P, S236F/P, K237N/R, N240H, W241L/R, N243F/V, Q245K, S248N, E251K, T255K, K256R, L257G, S260F, L267M, I268V, N269D/S, Q271H/K/P/R, A272G/V, A273T, A274D/L/T/V, Q275K/R/S, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência de SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) BPN'-v3, e BPN'-v36 e um valor de PI maior que o de BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36 neste teste. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

Exemplo 10

Construção e desempenho de limpeza de variantes de BPN'-v36 adicionais

[00495] O DNA das bibliotecas de avaliação de sítio de BPN'-v36 (descritas no Exemplo 7) foi mutagenizado adicionalmente por PCR propensa a erros. Estas bibliotecas foram amplificadas com os iniciadores P4973 e P4950 (descritos no Exemplo 7) usando a *Taq* DNA polimerase (Promega). Cada reação de amplificação por PCR continha 30 pmol de cada iniciador, 100 ng do DNA molde (SELS de BPN'-v36) e várias quantidades de MnCl₂. A reação de PCR (20 µL) foi inicialmente aquecida a 95°C durante 2,5 min seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 15 seg., anelamento a 55°C durante 15 seg. e extensão a 72°C durante 2 minutos. O fragmento de DNA foi purificado em gel pelo kit de purificação de bandas em gel QIAGEN®, digerido pelas enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III e ligado com o vetor pHPLT-BPN' parcial opt que também foi digerido com as mesmas enzimas de restrição. As misturas de ligação foram amplificadas usando

amplificação por círculo rolante em um kit Illustra Templiphi de acordo com a recomendação do fabricante (GE Healthcare) para gerar DNA multimérico para a transformação em *Bacillus subtilis*. Para este propósito, 1 µl da mistura de ligação foi misturado com 5 µl do tampão de amostra, aquecido até 95°C durante 3 min e resfriado sobre gelo. A seguir, 5 µl do tampão de reação e 0,2 µl da enzima foram adicionados a cada tubo, seguido de incubação a 30°C durante 10 horas. Os produtos da amplificação por círculo rolante foram diluídos 100 vezes e usados para transformar células de *B. subtilis* (Δ aprE, Δ nprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo). Uma alíquota da mistura de transformação foi plaqueada sobre placas com meio LB contendo 1,6% de leite desnatado e 10 µg/mL de neomicina e incubadas de um dia para o outro a 37°C.

[00496] Cerca de 500.000 clones foram pré-selecionados em placas com leite desnatado. Muito poucos clones formaram halos (isto é, indicando a presença de protease funcional). As colônias com halos foram selecionadas, inoculadas em 150 µl de meio LB contendo 10 µg/mL de neomicina e sequenciadas (Quintara). As sequências destes clones foram analisadas através da busca de combinações de mutações, que ocorreram neste grupo várias vezes e poderiam fornecer benefícios de desempenho. De modo a avaliar o desempenho destas combinações de mutações, mutantes duplos foram criados com base em BPN'-v36 através de fusão por PCR, conforme descrito abaixo. Para isto, dois ou três fragmentos parcialmente coincidentes foram amplificados por iniciadores mutagênicos. As combinações de iniciadores usadas para gerar as respectivas variantes são mostradas na tabela 10-1 e as sequências dos iniciadores são mostradas na tabela 10-2.

Tabela 10-1. Pares de iniciadores usados para amplificar os fragmentos					
Variante	Mutação 1	Mutação 2	Fragmento 1	Fragmento 2	Fragmento 3
1	A45S	S236Y	P4974, P6645	P6644, P6647	P6646, P4976
2	A45S	S236G	P4974, P6645	P6644, P6649	P6648, P4976

Tabela 10-1. Pares de iniciadores usados para amplificar os fragmentos					
3	I115T	S183T	P4974, P6651	P6650, P6655	P6654, P4976
4	I115V	N184Y	P4974, P6653	P6652, P6657	P6656, P4976
5	I31T	S37P	P4974, P6659	P6658, P4976	
6	I31T	I35L	P4974, P6661	P6660, P4976	
7	I31V	S38W	P4974, P6663	P6662, P4976	
8	N25K	P129R	P4974, P6665	P6664, P6667	P6666, P4976
9	N25K	P129K	P4974, P6665	P6664, P6669	P6668, P4976
10	P14T	S37T	P4974, P6671	P6670, P6673	P6672, P4976
11	P5L	Q217K	P4974, P6679	P6678, P6681	P6680, P4976
12	P5L	Q217G	P4974, P6679	P6678, P6683	P6682, P4976
13	Q10L	S37P	P4974, P6685	P6684, P6675	P6674, P4976
14	Q10R	S37T	P4974, P6687	P6686, P6673	P6672, P4976
15	S37P	T254S	P4974, P6675	P6674, P6689	P6688, P4976
16	N25K	S37P	P4974, P6665	P6664, P6675	P6674, P4976
17	G24A	S37W	P4974, P6691	P6690, P6677	P6676, P4976
18	N25K	P129R	P4974, P6665	P6664, P6667	P6666, P4976
20	S161P	S162L	P4974, P6695	P6694, P4976	
21	S161P	T253A	P4974, P6693	P6692, P6701	P6700, P4976
22	S161P	S260P	P4974, P6693	P6692, P6703	P6702, P4976
23	S162L	D181H	P4974, P6697	P6696, P6711	P6710, P4976
24	S162L	D181G	P4974, P6697	P6696, P6713	P6712, P4976
25	S18F	S162L	P4974, P6715	P6714, P6697	P6696, P4976
26	S18T	S162P	P4974, P6717	P6716, P6699	P6698, P4976
27	S18P	D120N	P4974, P6719	P6718, P6727	P6726, P4976
28	S18Y	K213R	P4974, P6721	P6720, P6729	P6728, P4976
29	S18L	Y21S	P4974, P6731	P6730, P4976	
30	S18T	Y21N	P4974, P6733	P6732, P4976	
31	S9T	K141F	P4974, P6635	P6734, P6737	P6736, P4976
32	S9T	K141R	P4974, P6635	P6734, P6739	P6738, P4976
33	Q19L	S260N	P4974, P6725	P6724, P6705	P6704, P4976
34	Q19L	S260P	P4974, P6725	P6724, P6703	P6702, P4976
35	N61S	S260P	P4974, P6741	P6740, P6703	P6702, P4976
36	N61D	S260I	P4974, P6743	P6742, P6707	P6706, P4976
37	T253A	S260P	P4974, P6701	P6700, P6703	P6702, P4976
38	A134T	S260G	P4974, P6745	P6744, P6709	P6708, P4976
39	A133V	S260N	P4974, P6648	P6746, P6705	P6704, P4976

Tabela 10-2. Sequências dos iniciadores usados para a geração de mutantes duplos de BPN'-v36		
Nome do iniciador	Sequência do iniciador	SEQ ID nº
P6644	CAGATCTTAAAGTCTCTGGAGGGGCTTCTATG GTGC	SEQ ID nº 64
P6645	CATAGAAGCCCCTCCAGAGACTTTAAGATCTG GATGGCTC	SEQ ID nº 65
P6646	GCATTGATTCTTTACAAGCACCCGAAGTGGAC AAAC	SEQ ID nº 66
P6647	CAGTTCGGGTGCTTGTAAGAATCAATGCGGC CGCCCCA	SEQ ID nº 67
P6648	GCATTGATTCTTGGTAAGCACCCGAAGTGGAC AAAC	SEQ ID nº 68
P6649	CCAGTTCGGGTGCTTACCAAGAATCAATGCGG CCGCCCCA	SEQ ID nº 69
P6650	CATCGAATGGGCCACAGCGAATAACATGGAT GTAATCAAC	SEQ ID nº 70
P6651	CATCCATGTTATTCGCTGTGGCCCATTCGATG CCGTTGAT	SEQ ID nº 71
P6652	CATCGAATGGGCCGTAGCGAATAACATGGAT GTAATCAAC	SEQ ID nº 72
P6653	CATCCATGTTATTCGCTACGGCCCATTCGATG CCGTTGAT	SEQ ID nº 73
P6654	CTGTAGACTCTACAAATCAACGTGCCTCTTTTT CCT	SEQ ID nº 74
P6655	AAAGAGGCACGTTGATTTGTAGAGTCTACAGC GCCCACTG	SEQ ID nº 75
P6656	CTGTAGACTCTTCATACCAACGTGCCTCTTTTT CCTCC	SEQ ID nº 76
P6657	GAAAAAGAGGCACGTTGGTATGAAGAGTCTAC AGCGCCCA	SEQ ID nº 77
P6658	TAGCGGTTACAGACAGCGGTATCGACCCAAG CCATCCAGATCTTAAAGTCG	SEQ ID nº 78
P6659	ATGGCTTGGGTGATACCGCTGTCTGTAACCG CTACTTTAACATTGCCTC	SEQ ID nº 79
P6660	TAAAGTAGCGGTTACAGACAGCGGTTTAGACT CGAGCCATCCAGATCTT	SEQ ID nº 80
P6661	ATGGCTCGAGTCTAAACCGCTGTCTGTAACCG CTACTTTAACATTGCCTC	SEQ ID nº 81
P6662	GGTTGTAGACAGCGGTATCGACTCGTGGCAT CCAGATCTTAAAGTCGCTG	SEQ ID nº 82

Tabela 10-2. Sequências dos iniciadores usados para a geração de mutantes duplos de BPN'-v36

P6663	ATGCCACGAGTCGATACCGCTGTCTACAACCG CTACTTTAACATTGCCTC	SEQ ID nº 83
P6664	CTACACTGGAGGCAAAGTTAAAGTAGCGGTTA TCGACA	SEQ ID nº 84
P6665	ATAACCGCTACTTTAACTTTGCCTCCAGTGTA GCCTTGAG	SEQ ID nº 85
P6666	GAGCCTGGGAGCACGTAGCGGCAGTGCGGC ACTTAAA	SEQ ID nº 86
P6667	GTGCCGCACTGCCGCTACGTGCTCCCAGGCT CATGTTGAT	SEQ ID nº 87
P6668	TGAGCCTGGGAGCAAAGAGCGGCAGTGCGG CACTTAAA	SEQ ID nº 88
P6669	GTGCCGCACTGCCGCTCTTTGCTCCCAGGCT CATGTTGAT	SEQ ID nº 89
P6670	ATCACAAATTAAAGCCACAGCTCTGCACTCTC AAGGCTAC	SEQ ID nº 90
P6671	AGAGTGCAGAGCTGTGGCTTTAATTTGTGATA CGCCGTAA	SEQ ID nº 91
P6672	GACAGCGGTATCGACACAAGCCATCCAGATCT TAAAGTCG	SEQ ID nº 92
P6673	TAAGATCTGGATGGCTTGTGTGCGATACCGCTG TCGATAAC	SEQ ID nº 93
P6674	GACAGCGGTATCGACCCAAGCCATCCAGATC TTAAAGTCG	SEQ ID nº 94
P6675	TAAGATCTGGATGGCTTGGGTCGATACCGCTG TCGATAAC	SEQ ID nº 95
P6676	GACAGCGGTATCGACTGGAGCCATCCAGATC TTAAAGTCG	SEQ ID nº 96
P6677	TAAGATCTGGATGGCTCCAGTCGATACCGCTG TCGATAAC	SEQ ID nº 97
P6678	ACGCGCAGTCCGTGTTATACGGCGTATCACAA ATTAAAGC	SEQ ID nº 98
P6679	ATTTGTGATACGCCGTATAACACGGACTGCGC GTACGCAT	SEQ ID nº 99
P6680	ACAAGTATGGTGCGAAAAACGGGACTTCCATG GCCTC	SEQ ID nº 100
P6681	CATGGAAGTCCCGTTTTTCGCACCATACTTGT TCCCTG	SEQ ID nº 101
P6682	ACAAGTATGGTGCGGGAAACGGGACTTCCAT GGCCTC	SEQ ID nº 102

Tabela 10-2. Sequências dos iniciadores usados para a geração de mutantes duplos de BPN'-v36

P6683	CCATGGAAGTCCCGTTTCCCGCACCATACTTG TTCCCTG	SEQ ID n° 103
P6684	CTTACGGCGTATCATTAATTAAGCCCCTGCT CTGCAC	SEQ ID n° 104
P6685	GAGCAGGGGCTTTAATTAATGATACGCCGTAA GGCACGGA	SEQ ID n° 105
P6686	CTTACGGCGTATCACGTATTAAAGCCCCTGCT CTGCAC	SEQ ID n° 106
P6687	GAGCAGGGGCTTTAATACGTGATACGCCGTAA GGCACGGA	SEQ ID n° 107
P6688	TTTAGAAAACACCTCTACAAACTTGGTGATT TTTCTAC	SEQ ID n° 108
P6689	TCACCAAGTTTTGTAGAGGTGTTTTCTAACTG CTGCGGA	SEQ ID n° 109
P6690	AGGCTACACTGGAGCAAATGTTAAAGTAGCGG TTATCGAC	SEQ ID n° 110
P6691	GCTACTTTAACATTTGCTCCAGTGTAGCCTTG AGAGTG	SEQ ID n° 111
P6692	GAGGGAACATCCGGACCATCGAGTACCGTCG GTTATCCA	SEQ ID n° 112
P6693	ACCGACGGTACTCGATGGTCCGGATGTTCCC TCATTCCCA	SEQ ID n° 113
P6694	AGGGAACATCCGGACCATTAAGTACCGTCGG TTATCCAGG	SEQ ID n° 114
P6695	ACCGACGGTACTTAATGGTCCGGATGTTCCCT CATTCCCA	SEQ ID n° 115
P6696	GAACATCCGGATCATTAAGTACCGTCGGTTAT CCAGGCA	SEQ ID n° 116
P6697	ATAACCGACGGTACTTAATGATCCGGATGTTC CCTCATT	SEQ ID n° 117
P6698	GAACATCCGGATCACCAAGTACCGTCGGTTAT CCAGGCA	SEQ ID n° 118
P6699	ATAACCGACGGTACTTGGTGATCCGGATGTTC CCTCATT	SEQ ID n° 119
P6700	GTTTAGAAAACGCAACTACAAACTTGGTGAT TCTTTC	SEQ ID n° 120
P6701	CACCAAGTTTTGTAGTTGCGTTTTCTAACTGC TGCGGAC	SEQ ID n° 121
P6702	CAAACTTGGTGATCCATTCTACTATGGAAAA GGGCTGAT	SEQ ID n° 122

Tabela 10-2. Sequências dos iniciadores usados para a geração de mutantes duplos de BPN'-v36		
P6703	TTTCCATAGTAGAATGGATCACCAAGTTTTGTA GTGGTGT	SEQ ID n° 123
P6704	CAAAACTTGGTGATAACTTCTACTATGGAAAA GGGCTGAT	SEQ ID n° 124
P6705	TTTCCATAGTAGAAGTTATCACCAAGTTTTGTA GTGGTGT	SEQ ID n° 125
P6706	CAAAACTTGGTGATATCTTCTACTATGGAAAAG GGCTGAT	SEQ ID n° 126
P6707	TTTCCATAGTAGAAGATATCACCAAGTTTTGTA GTGGTGT	SEQ ID n° 127
P6708	CAAAACTTGGTGATGGATTCTACTATGGAAAA GGGCTGAT	SEQ ID n° 128
P6709	TTTCCATAGTAGAATCCATCACCAAGTTTTGTA GTGGTGT	SEQ ID n° 129
P6710	GTGGGCGCTGTACACTCTTCAAATCAACGTGC CTCTT	SEQ ID n° 130
P6711	CACGTTGATTTGAAGAGTGTACAGCGCCCACT GCAATCAC	SEQ ID n° 131
P6712	GTGGGCGCTGTAGGATCTTCAAATCAACGTGC CTCTT	SEQ ID n° 132
P6713	CACGTTGATTTGAAGATCCTACAGCGCCCACT GCAATCAC	SEQ ID n° 133
P6714	CCTGCTCTGCACTTCCAAGGCTACACTGGAG GCAATG	SEQ ID n° 134
P6715	CTCCAGTGTAGCCTTGGAAGTGCAGAGCAGG GGCTTTAAT	SEQ ID n° 135
P6716	CCTGCTCTGCACACACAAGGCTACACTGGAG GCAATG	SEQ ID n° 136
P6717	CTCCAGTGTAGCCTTGTGTGTGCAGAGCAGG GGCTTTAAT	SEQ ID n° 137
P6718	CCTGCTCTGCACCCACAAGGCTACACTGGAG GCAATG	SEQ ID n° 138
P6719	CTCCAGTGTAGCCTTGTGGGTGCAGAGCAGG GGCTTTAAT	SEQ ID n° 139
P6720	CCTGCTCTGCACTACCAAGGCTACACTGGAG GCAATG	SEQ ID n° 140
P6721	CTCCAGTGTAGCCTTGGTAGTGCAGAGCAGG GGCTTTAAT	SEQ ID n° 141
P6722	CCTGCTCTGCACTTACAAGGCTACACTGGAGG CAATG	SEQ ID n° 142

Tabela 10-2. Sequências dos iniciadores usados para a geração de mutantes duplos de BPN'-v36

P6723	CTCCAGTGTAGCCTTGTAAGTGCAGAGCAGG GGCTTTAAT	SEQ ID n° 143
P6724	TGCTCTGCACTCTTTAGGCTACACTGGAGGCA ATGTTA	SEQ ID n° 144
P6725	TTGCCTCCAGTGTAGCCTAAAGAGTGCAGAGC AGGGGCTT	SEQ ID n° 145
P6726	ATCGCGAATAACATGAACGTAATCAACATGAG CCTGGGA	SEQ ID n° 146
P6727	CTCATGTTGATTACGTTTCATGTTATTCGCGATG GCCCCAT	SEQ ID n° 147
P6728	CTTCCAGGGAACCGTTATGGTGCGCAAAACG GGACTT	SEQ ID n° 148
P6729	GTTTTGCGCACCATAACGGTTCCTGGAAGCG TCGATTG	SEQ ID n° 149
P6730	CTGCACTTACAAGGCTCTACTGGAGGCAATGT TAAAGTAG	SEQ ID n° 150
P6731	TAACATTGCCTCCAGTAGAGCCTTGTAAGTGC AGAGCAGGGGCTTTAAT	SEQ ID n° 151
P6732	GCTCTGCACTTACAAGGCAACACTGGAGGCA ATGTTAAAGTAG	SEQ ID n° 152
P6733	AACATTGCCTCCAGTGTGCTTGTAAGTGCA GAGCAGGGGCTTTAAT	SEQ ID n° 153
P6734	CTTACGGCGTAACACAAATTAAAGCCCCTGCT CTG	SEQ ID n° 154
P6735	AGGGGCTTTAATTTGTGTTACGCCGTAAGGCA CGGACT	SEQ ID n° 155
P6736	TTAAAGCAGCAGTTGATTTGCTGTTGCATCT GGTGTCGT	SEQ ID n° 156
P6737	AGATGCAACAGCGAAATCAACTGCTGCTTTAA GTGCCGCA	SEQ ID n° 157
P6738	TTAAAGCAGCAGTTGATCGTGCTGTTGCATCT GGTGTCGT	SEQ ID n° 158
P6739	AGATGCAACAGCACGATCAACTGCTGCTTTAA GTGCCGCA	SEQ ID n° 159
P6740	AAACCCGTTTCAAGATTCTAATTCTCATGGCAC ACACGTC	SEQ ID n° 160
P6741	TGTGCCATGAGAATTAGAATCTTGAAACGGGT TTGTTTCG	SEQ ID n° 161
P6742	AAACCCGTTTCAAGATGATAATTCTCATGGCA CACACGTC	SEQ ID n° 162

Tabela 10-2. Sequências dos iniciadores usados para a geração de mutantes duplos de BPN'-v36

P6743	TGTGCCATGAGAATTATCATCTTGAAACGGGT TTGTTTCG	SEQ ID n° 163
P6744	AAGCGGCAGTGCGACACTTAAAGCAGCAGTT GATAAAGC	SEQ ID n° 164
P6745	TCAACTGCTGCTTTAAGTGTCGCACTGCCGCT TGGTGCTC	SEQ ID n° 165
P6746	CAAGCGGCAGTGTTGCACTTAAAGCAGCAGTT GATAA	SEQ ID n° 166
P6747	ACTGCTGCTTTAAGTGCAACACTGCCGCTTGG TGCTCCCA	SEQ ID n° 167

[00497] Cada reação de amplificação por PCR continha 30 pmols de cada iniciador e 100 ng do DNA molde original de BPN'-v36 (plasmídio pHPLT-BPN'-v36) (vide a figura 4). As amplificações foram executadas usando a Vent DNA polimerase (NEB). A reação de PCR (20 µL) foi inicialmente aquecida a 95°C durante 2,5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 15 seg., anelamento a 55°C durante 15 seg. e extensão a 72°C durante 40 seg. Após a amplificação, os fragmentos 5' e 3' do gene foram purificados em gel pelo kit de purificação de bandas em gel QIAGEN®, misturados (50 ng de cada fragmento), misturados e amplificados por PCR novamente usando os iniciadores P4973 e P4950 para gerar o fragmento do gene de extensão completa. As condições da PCR foram as mesmas descritas acima, com a exceção da fase de extensão, que foi executada a 72°C durante 2 minutos. O fragmento de DNA de extensão completa foi purificado em gel pelo kit de purificação de bandas em gel QIAGEN®, digerido pelas enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III e ligado com o vetor pHPLT-BPN' parcial opt que também foi digerido com as mesmas enzimas de restrição. As misturas de ligação foram amplificadas usando amplificação por círculo rolante em um kit Illustra Templiphi de acordo com a recomendação do fabricante (GE Healthcare) para gerar DNA multimérico para a transformação em *Bacillus subtilis*. Para este propósito, 1 µl da mistura de ligação foi

misturado com 5 µl do tampão de amostra, aquecido até 95°C durante 3 min e resfriado sobre gelo. A seguir, 5 µl do tampão de reação e 0,2 µl da enzima foram adicionados a cada tubo, seguido de incubação a 30°C durante 10 horas. Os produtos da amplificação por círculo rolante foram diluídos 100 vezes e usados para transformar células de *B. subtilis* (Δ aprE, Δ nprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo). Uma alíquota da mistura de transformação foi plaqueada sobre placas de meio LB contendo 1,6% de leite desnatado e 10 µg/mL de neomicina e a placa foi incubada de um dia para o outro a 37°C. Subsequentemente, as colônias com halos foram inoculadas em 150 µl de meio LB contendo 10 µg/mL de neomicina. No dia seguinte, as culturas foram congeladas com 15% de glicerol ou foram cultivadas em meio MBD para análise bioquímica, conforme descrito no exemplo 2.

[00498] As variantes foram testadas quanto ao desempenho de limpeza usando o teste em amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 a 16°C e pH 8, o teste em amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 a 16°C e pH 7, e o teste em pequena amostra de tecido com ovo na composição detergente 4 a 16°C e pH 8. O teor de proteína foi determinado usando o teste TCA. Todos os testes foram feitos conforme descrito no exemplo 1 e os índices de desempenho foram calculados em relação a BPN'-v36 (isto é, BPN'-S24G-S53G-S78N-S101N-G128A-Y217Q) (com um valor de PI de 1,0).

[00499] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em A133V-S260N,

N061S-S260P, P014T-S037T, S009T-K141F, S009T-K141R, S018F-S162L, S018L-Y021S, S018P-D120N, S018T-S162P, S018T-Y021N, S018Y-K213R, S161P-S162L, S161P-S260P, e T253A-S260P, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2), um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3, e um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00500] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em A134T-S260G,

I115V-N184Y, N025K-S037P, Q010L-S037P, Q019L-S260N, Q019L-S260P, S037P-T254S, e S161P-T253A, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica e/ou um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00501] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que 0,9 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em A045S-S236G, G024A-S037W, I031V-S038W, N061D-S260I, Q010R-S037T, I115T-S183T, N025K-P129K, N025K-P129R, A045S-S236Y, e S162L-D181H, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2.

Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica e/ou um valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que 0,9 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID n° 2 ou da SEQ ID n° 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID n° 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00502] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI maior que 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, maior que 1,0 até cerca de 10, maior que 1,0 até cerca de 8, ou maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 a pH 7 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID n° 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em S018F-S162L, S018P-D120N, P014T-S037T, S009T-K141R, e S161P-S162L, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID n° 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36, e um valor

de PI maior do que o de BPN', BPN'-v3 e BPN'-v36 neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID n° 2), atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36, um valor de PI maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v3, e/ou um valor de PI maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID n° 2 ou da SEQ ID n° 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID n° 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00503] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 7 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID n° 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em N061S-S260P, Q010L-S037P, S009T-K141F, S018L-Y021S, S018T-S162P, S018T-Y021N, S018Y-K213R, S037P-T254S, S161P-S260P, S161P-T253A, e T253A-S260P, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID n° 2.

Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2), um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v3, e um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00504] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN' possuem um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v3 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 7 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN' (SEQ ID nº 2) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em A133V-S260N, A134T-S260G, I115T-S183T, I115V-N184Y, N061D-S260I, Q019L-S260N, e Q019L-S260P, sendo que as posições da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica, um valor de PI de cerca de 0,9 em relação a BPN'-v3, e/ou atividade proteolítica

intensificada em comparação a BPN' neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00505] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que 0,9 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 7 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em A045S-S236G, G024A-S037W, Q010R-S037T, A045S-S236Y, I031V-S038W, N025K-S037P, S162L-D181H, e N025K-P129R, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica e/ou um valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que 0,9 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da

SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00506] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI maior que 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, maior que 1,0 até cerca de 10, maior que 1,0 até cerca de 8, ou maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com ovo na composição detergente 4 a pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em I031V-S038W, P014T-S037T, S018F-S162L, S018P-D120N, e S162L-D181H, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36, e um valor de PI maior do que o de BPN', BPN'-v3 e BPN'-v36 neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2), atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36, um valor de PI maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v3, e/ou um valor de PI maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-

v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00507] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza em pequena amostra de tecido com ovo na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em A133V-S260N, A134T-S260G, G024A-S037W, I115V-N184Y, N025K-P129K, N025K-P129R, N061D-S260I, Q019L-S260P, S009T-K141F, S009T-K141R, S018L-Y021S, S018T-S162P, S018T-Y021N, S018Y-K213R, S161P-S162L, S161P-T253A, e T253A-S260P, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2), um valor de PI de cerca de 1,0 em

relação a BPN'-v3, e/ou um valor de PI de cerca de 1,0 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00508] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem valor de PI igual a ou maior que 0,8 e igual a ou menor que 0,9 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com ovo na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em A045S-S236G, A045S-S236Y, I115T-S183T, N025K-S037P, N061S-S260P, Q010L-S037P, Q010R-S037T, Q019L-S260N, S037P-T254S, e S161P-S260P, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica e/ou um valor de PI igual a ou maior que 0,8 e igual a ou menor que 0,9 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%,

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00509] Também é fornecida uma variante de protease subtilisina que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN'-v36 e/ou um valor de PI maior que 1,0 a cerca de 5 em comparação a BPN'-v36 em um teste de limpeza em pequena amostra de tecido com ovo ou SLT na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a SEQ ID nº 2 ou SEQ ID nº 6, sendo que a variante compreende pelo menos uma substituição selecionada a partir do grupo de X009T, X010L/R, X014T, X018F/L/P/T/Y, X019L, X021N/S, X024A, X025K, X031V, X037P/T/W, X038W, X045S, X061D/S, X115T/V, X120N, X129K/R, X133V, X134T, X141F/R, X161P, X162L/P, X181H, X183T, X184Y, X213R, X236G/Y, X253A, X254S, e X260G/I/N/P e, opcionalmente, pelo menos uma substituição selecionada a partir do grupo de S009T, Q010L/R, P014T, S018F/L/P/T/Y, Q019L, Y021N/S, G024A, N025K, I031V, S037P/T/W, S038W, A045S, N061D/S, I115T/V, D120N, P129K/R, A133V, A134T, K141F/R, S161P, S162L/P, D181H, S183T, N184Y, K213R, S236G/Y, T253A, T254S, e S260G/I/N/P, sendo que as posições de aminoácido

da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência de SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) BPN'-v3, e BPN'-v36 e um valor de PI maior que o de BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36 neste teste. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos para limpeza utilizando pelo menos uma tal variante, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

Exemplo 11

1. Geração das bibliotecas combinatórias FS1-FS3

[00510] O plasmídio pHPLT-BPN'-v3 contendo o cassete de expressão de BPN' serviu como DNA molde (plasmídio original) para a clonagem. Três bibliotecas combinatórias separadas (FS1, FS2, e FS3) foram sintetizadas pela DNA2.0, e foram entregues como reações de ligação individuais. Uma lista de bibliotecas e possíveis substituições são mostradas na tabela 11-1. As bibliotecas foram desenhadas para permitir a incorporação dos resíduos selvagens ou das substituições em cada sítio descrito na tabela 11-1.

[00511] Para a transformação eficaz de *B. subtilis*, o DNA da reação de ligação foi amplificado por amplificação por círculo rolante (RCA) usando o kit Illustra Templiphi (GE Healthcare). As reações foram feitas de acordo com o protocolo do fabricante. Um microlitro de um DNA amplificado diluído 10 vezes foi usado para transformar 50 µL de células de *B. subtilis* competentes (Δ aprE, Δ nprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo). A mistura de transformação foi agitada a 37°C durante 1 hora. Alíquotas de dez microlitros da mistura de transformação foram plaqueadas sobre placas de ágar Luria com leite desnatado (1,6%) suplementado com 10 µg/ml de neomicina (Teknova).

[00512] Os transformantes foram colocados em placas de microtitulação contendo 125 a 150 µl de meio caldo Luria suplementado com 10 µg/ml de neomicina. As placas foram cultivadas de um dia para o outro a 37°C com agitação a 250 a 300 rpm e 70 a 80% de umidade usando tampas Enzyscreen para as placas de microtitulação (Enzyscreen). Entre 7 e 10 microlitros provenientes placa de cultura de um dia para o outro foram usados para inocular uma nova placa de microtitulação contendo 190 µl de meio MBD (um meio definido à base de MOPS) com 10 µg/ml de neomicina. O meio MBD foi preparado essencialmente conforme conhecido na técnica (vide Neidhardt et al., J. Bacteriol. 119:736-747 (1974)), exceto que NH_4Cl_2 , FeSO_4 , e CaCl_2 foram omitidos do meio base, K_2HPO_4 3 mM foi usado, e o meio base foi suplementado com ureia 60 mM de ureia, e 100 ml de uma solução produzida a partir de 210 g/L de glicose, e 350 g/L de maltodextrina. Os micronutrientes foram supridos como uma solução de estoque 100X contendo em um litro, 400 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mg de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 10 ml de CaCl_2 1 M e 10 ml de citrato de sódio 0,5 M. As placas de microtitulação contendo meio MBD foram cultivadas por 60 a 70 horas a 37°C, 250 a 300 rpm, e 70 a 80% de umidade usando tampas Enzyscreen (Enzyscreen) para determinar a expressão de proteína. No dia seguinte, as culturas foram filtradas através de uma placa de microfiltro (0,22 µm; Millipore) e o filtrado resultante foi usado para análise bioquímica.

Tabela 11-1: Possíveis substituições para as bibliotecas combinatórias FS1-FS3			
	FS1	FS2	FS3
1	G102A	A97G	N61E
2	S130P	A128G	P129E
3	T55P	N123G	K213L

4	V203Y	G102A	S145D
5	N61P	L126V	Q275E
6	S101N	G100N	P40E
7	S53G	N62Q	S159K
8	S78N	M124I	S24R
9	S87T-A88L-S89G	N61P	A144K
10	S24G-N25G	S130P	N240K
11	L75S-N76Y	P129S	P239R

2. Geração de variantes para melhorar a estabilidade de BPN'

[00513] Para melhorar a estabilidade de BPN', construiu-se variantes usando as moléculas originais pHPLT-BPN' G97A-G128A-Y217Q-S87D ou pHPLT-BPN' G97A-G128A-Y217Q-P40E, ambas sintetizadas pela empresa Gene Oracle, ou as moléculas originais pHPLT-BPN' G97A-G128A-Y217Q-S78N e pHPLT-FNA opt parcial (BPN'-Y217L subtilisina de *B. amyloliquefaciens*) sintetizada pela GeneArt.

[00514] As informações mostradas nas tabelas 11-2 e 11-3 resume a molécula original usada, as mutações adicionadas, e os iniciadores usados para construir as variantes aqui fornecidas.

Tabela 11-2: Sequências dos iniciadores usados para a geração de mutantes com estabilidade de BPN'		
Iniciador	Sequência do iniciador 5' para 3'	SEQ ID nº
p31	/5PHOS/CGGCGTTAAACAATAACATTGGCGTGCT TGGTGTAG	169
p32	/5PHOS/ACCAAGCACGCCAATGTTATTGTTTAACG CCGCAACC	170
p25	/5PHOS/GTATCGACTCGAGCCATGAAGATCTTAA AGTCGCTGGAG	171
p26	/5PHOS/CAGCGACTTTAAGATCTTCATGGCTCGA GTCGATAACCG	172
p33	/5PHOS/TTGGTGTAGCCCCGGATGCTTCGCTCTA CGCCGTTAAAG	173
p34	/5PHOS/CGTAGAGCGAAGCATCCGGGGCTACAC	174

Tabela 11-2: Sequências dos iniciadores usados para a geração de mutantes com estabilidade de BPN'		
Iniciador	Sequência do iniciador 5' para 3'	SEQ ID nº
	CAAGCACG	
p29	/5PHOS/GAACGGTTGCGGCGTTAGATAATTCTATTGGCGTGCTTG	175
p30	/5PHOS/AGCACGCCAATAGAATTATCTAACGCCGCAACCGTTC	176
p27	/5PHOS/AACGGTTGCGGCGTTAGATAATAACATTGGCGTGCTTGGTGTAG	177
p28	/5PHOS/ACACCAAGCACGCCAATGTTATTATCTAACGCCGCAACCGTTCCTG	178
p7	/5PHOS/CGGCGTTAAACAATAATATTGGCGTGCTTGG	179
p8	/5PHOS/CCAAGCACGCCAATATTATTGTTTAACGCCG	180
p21	/5PHOS/GGTGTAGCCCCGGATGCTTCGCTCTACG	181
p22	/5PHOS/CGTAGAGCGAAGCATCCGGGGCTACAC	182
p11	/5PHOS/GTATCGACTCGAGCCATGAAGATCTTAAAG	183
p12	/5PHOS/CTTTAAGATCTTCATGGCTCGAGTCGATAC	184
p13	/5PHOS/CGCTTCCAGGGAACAACCTATGGTGCGTA	185
p14	/5PHOS/TACGCACCATAGTTGTTCCCTGGAAGCG	186
p15	/5PHOS/CACTCTCAAGGCTACGTTGGATCAAATGTTA	187
p16	/5PHOS/TAACATTTGATCCAACGTAGCCTTGAGAGTG	188
p17	/5PHOS/TGGCGTTTCTATTGAATCGACGCTTCCAG	189
p18	/5PHOS/CTGGAAGCGTCGATTCAATAGAAACGCCA	190

Tabela 11-3: Moldes usados, mutações incorporadas, e iniciadores usados na geração de variantes com estabilidade aprimorada			
	Moléculas originais (moldes)	Mutação a ser incorporada	Iniciadores usados
1	pHPLT-BPN' G97A-G128A-Y217Q-S87D	S78N	p31, p32

Tabela 11-3: Moldes usados, mutações incorporadas, e iniciadores usados na geração de variantes com estabilidade aprimorada

	Moléculas originais (moldes)	Mutação a ser incorporada	Iniciadores usados
2	pHPLT-BPN' G97A-G128A-Y217Q-S78N	P40E	p25, p26
3	pHPLT-BPN' G97A-G128A-Y217Q-P40E	S87D	p33, p34
4	pHPLT-BPN' G97A-G128A-Y217Q-S78N	P40E, S87D	p25, p33
5	pHPLT-BPN' G97A-G128A-Y217Q-S87D	N76D	p29, p30
6	pHPLT-BPN' G97A-G128A-Y217Q-S87D	N76D, S78N	p27, p28
7	pHPLT-FNA opt parcial	S78N	p7, p8
8	pHPLT-FNA opt parcial	S87D	p21, p22
9	pHPLT-FNA opt parcial	P40E	p11, p12
10	pHPLT-FNA opt parcial	K213N	p13, p14
11	pHPLT-FNA opt parcial	T22V	p15, p16
12	pHPLT-FNA opt parcial	Q206E	p17, p18
13	pHPLT-FNA opt parcial	P40E, S87D, S78N	p11, p21, p7

[00515] Cepas de *Bacillus subtilis* expressando os plasmídios foram inoculadas por estriamento sobre placas com 1,6% de leite desnatado contendo 10 ppm de neomicina e as placas foram cultivadas de um dia para o outro a 37°C. Colônias únicas das placas foram cultivadas de um dia para o outro a 37°C com agitação a 250 rpm em 5 mL de caldo Luria contendo 10 ppm de neomicina. Os plasmídios foram isolados usando o protocolo do kit Miniprep da QIAGEN® adicionando 1 microlitro de lisozioma Ready Lyse (Epicentre) durante 15 minutos a 37°C em tampão P1 para ajudar na lise celular. Os plasmídios foram sequenciados para garantir as sequências de DNA corretas antes de proceder. Os plasmídios foram metilados usando o kit de Dam metilase NEB em uma reação contendo 77,5 µL de água + 10 µL de tampão 10X + 0,25 µL de SAM + 2 µL de DAM metilase + 10 µL de DNA miniprep (~150 ng/µL) a 37°C de um dia para o outro. O DNA

plasmidial metilado foi purificado usando um kit DNA Clean and Concentrator (Zymo) ou com o kit de purificação de PCR QIAGEN®. Reações de mutagênese multi sítio-dirigida QUIKCHANGE® foram estabelecidas para cada um dos moldes de DNA em uma mistura de reação contendo 2,5 µL de tampão 5X + 0,75 µL de solução Quik + 0,5 µL de iniciador 1 (25 µM) + 0,5 µL de iniciador 2 (25 µM) + 1,5 µL de dNTP's + 1 µL de mistura de enzima + 16,25 µL de H₂O + 2 µL de DNA. O programa de PCR usado foi: 95°C durante 1 minuto; (95°C durante 1 minuto, 53°C durante 1 minuto, 65°C durante 10 min) x 29 ciclos; 65°C durante 10 minutos, manutenção a 4°C. Em todas as reações, a PCR foi feita usando um termociclador MJ Research PTC-200 Peltier. O DNA parental das amostras de PCR foi removido pela adição de 1 µL de *DpnI* às reações do kit de mutagênese QUIKCHANGE® a 37°C de um dia para o outro. Para aumentar a frequência de transformação, as reações digeridas por *DpnI* foram amplificadas usando amplificação por círculo rolante (RCA) com o uso do kit Illustra TempliPhi de acordo com o protocolo do fabricante. Células de *B. subtilis* ($\Delta aprE$, $\Delta nprE$, $amyE::xylRPxylAcomK-phleo$) foram transformadas com 1 µL de cada reação de RCA e as células transformadas foram plaqueadas sobre placas de LA + 1,6% de leite desnatado contendo 10 ppm de neomicina e incubadas a 37°C de um dia para o outro. Colônias da cultura de um dia para o outro foram selecionadas para a execução de PCR de colônia para sequenciamento usando "puReTaq Ready-To-Go PCR Beads" (Amersham). Os iniciadores usados para a reação de PCR e de sequenciamento foram pHPLT F1 (SEQ ID n° 54) e pHPLT seq R1 (SEQ ID n° 55). Os clones com as sequências adequadas foram congelados. As proteínas variantes de BPN' foram produzidas pelo cultivo de transformantes de *B. subtilis* em placas de microtitulação de 96 poços a 37°C durante 68 horas em um meio à base de MOPS

contendo ureia.

3. Geração de variantes de BPN' derivadas de cinco diferentes plasmídios originais

[00516] As variantes de BPN' foram construídas usando um total de cinco diferentes moldes: BPN'-v3 (G97A-G128A-Y217Q), BPN'-v4 (G97A-N123G-Y217Q), variante 8 de BPN', (S87D-G97A-N109D-G128A-S188D-S248R-Y217Q), variante 16 de BPN' (S87D-G97A-N109D-G128A-S188D-Y217Q), e variante 21 de BPN' (S87R-G97A-N109R-G128A-S188R-Y217Q-S248R) conforme mostrado na tabela 11-4. A geração de BPN'-v4 e BPN'-v3 é descrita no pedido PCT n° PCT/US09/46066 (WO 09/149144), depositado em 3 de junho de 2009, aqui incorporado, a título de referência para tal descrição. As variantes de BPN' 8, 16, 21 foram sintetizadas pela Gene Oracle e serviram como plasmídios originais para construir variantes adicionais. Todas as variantes foram geradas usando kits de mutagênese QUIKCHANGE®, com a exceção de duas (variantes 5 e 33), que foram geradas usando PCR de fusão, conforme descrito abaixo. Os iniciadores (mostrados na tabela 11-5) para a geração das variantes foram sintetizados na empresa Integrated DNA Technologies. As mutações introduzidas (mostradas em **negrito**) e os iniciadores e moldes usados são mostrados na tabela 11-4.

Tabela 11-4: Mutações introduzidas (negrito) & Plasmídios originais usados para gerar as variantes de BPN'			
Variante	Variantes construídas	Plasmídio original	Iniciadores usados
1	G97A-N123C-Y217Q	G97A-N123G-Y217Q	N123C f, N123C r
2	N76D-G97A-G128A-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	N76D f, N76D r
3	G97A-N109D-G128A-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	N109D f1, N109D r
4	G97A-G128A-S188D-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	S188D f, S188D r

Tabela 11-4: Mutações introduzidas (negrito) & Plasmídios originais usados para gerar as variantes de BPN'

Variante	Variantes construídas	Plasmídio original	Iniciadores usados
5	G97A-G128A-S248D-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	pHPLT F1, S248D forfus, pHPLT R1, S248D revfus
6	G97A-G128A-S188D-S248R-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	S188D f, S248R f1
7	G97A-N109D-G128A-S188D-S248R-Y217Q	S87D-G97A-N109D-G128A-S188D-S248R-Y217Q	D87S f, D87S r
8	S87D-G97A-N109D-G128A-S188D-S248R-Y217Q	Sintetizado pela Gene Oracle	Sintetizado pela Gene Oracle
9	S87R-G97A-G128A-S188D-S248D-Y217Q	S87D-G97A-N109D-G128A-S188D-Y217Q	S87R f, S248D f1, D109N f
10	S87R-G97A-N109D-G128A-S188D-Y217Q	S87D-G97A-N109D-G128A-S188D-S248R-Y217Q	R248Sfor, R248Srev
11	G97A-N109D-G128A-S188R-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	N109D f2, S188R f
12	S87R-G97A-N109D-G128A-S188D-Y217Q-S248R	S87D-G97A-N109D-G128A-S188D-S248R-Y217Q	S87R f, S87R r
13	G97A-N109D-G128A-Y217Q-S248R	G97A-G128A-Y217Q	N109D f2, S248R f2
14	S87D-G97A-G128A-Y217Q-S248R	G97A-G128A-Y217Q	S87D f, S248R f1
15	S87D-G97A-N109D-G128A-S188D-Y217Q-S248D	S87D-G97A-N109D-G128A-S188D-Y217Q	S248D f1, S248D r
16	S87D-G97A-N109D-G128A-S188D-Y217Q	Sintetizado pela Gene Oracle	Sintetizado pela Gene Oracle

Tabela 11-4: Mutações introduzidas (negrito) & Plasmídios originais usados para gerar as variantes de BPN'

Variante	Variantes construídas	Plasmídio original	Iniciadores usados
17	G97A-N109D-G128A-Y217Q-S248D	G97A-G128A-Y217Q	N109D f2, S248D f2
18	S87R-G97A-G128A-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	S87R f, S87R r
19	S87R-G97A-G128A-Y217Q-S248R	G97A-G128A-Y217Q	S87R f, S248R f1
20	S87R-G97A-G128A-S188R-Y217Q-S248R	S87R-G97A-N109R-G128A-S188R-Y217Q-S248R	D109N f, D109N r
21	S87R-G97A-N109R-G128A-S188R-Y217Q-S248R	Sintetizado pela Gene Oracle	Sintetizado pela Gene Oracle
22	G97A-G102A-G128A-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	G102A f, G102A r
23	G97A-G128A-S130P-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	S130P f, S130P r
24	G97A-S101N-G128A-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	S101N f, S101N r
25	G97A-G100N-G128A-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	G100N f, G100N r
26	N61P-G97A-G128A-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	N61P f, N61P r
27	G97A-G128A-A187D-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	A187D f, A187D r
28	G97A-G128A-F189D-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	f189D f, f189D r
29	G97A-G128A-A137V-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	A137V f, A137V r
30	S63T-G97A-G128A-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	S63T f, S63T r
31	G97A-Q103N-G128A-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	Q103N f, Q103N r
32	N62D-G97A-G128A-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	N62D f, N62D r

Tabela 11-4: Mutações introduzidas (negrito) & Plasmídios originais usados para gerar as variantes de BPN'			
Variante	Variantes construídas	Plasmídio original	Iniciadores usados
33	G97A-G100E-G128A-Y217Q	G97A-G128A-Y217Q	G100E F _s for, pHPLT F1, G100E F _s rev, pHPLT R1

Geração das variantes de BPN' através de mutagênese QUIKCHANGE®

[00517] Cepas de *Bacillus subtilis* contendo plasmídios que expressam BPN'-v3, BPN'-v4, variante 8 de BPN', variante 16 de BPN', e variante 21 de BPN' foram inoculados por estriamento sobre placas com 1,6% de leite desnatado contendo 10 ppm de neomicina e cultivadas de um dia para o outro a 37°C. Colônias únicas das placas foram cultivadas de um dia para o outro a 37°C com agitação a 250 rpm em 5 mL de caldo Luria contendo 10 ppm de neomicina. Plasmídios expressando BPN'-v3, BPN'-v4, variante 8 de BPN', variante 16 de BPN', e variante 21 de BPN' foram isolados usando o protocolo do kit QIAGEN® Miniprep com exceção da seguinte lise celular, 1 microlitro de lisozima Ready Lyse foi adicionado e incubado durante 15 minutos a 37°C. Os plasmídios foram metilados usando o kit de Dam metilase da NEB em uma reação contendo 77,75 µL de H₂O + 10 µL de tampão 10X + 0,25 µL de SAM + 2 µL de DAM metilase + 10 µL de DNA miniprep a 37°C de um dia para o outro. O DNA metilado foi purificado usando o kit de purificação por PCR QIAGEN®. As variantes 14, 18, e 19 mencionadas na tabela 11-4 foram geradas usando kits de mutagênese multi sítio-dirigida QUIKCHANGE LIGHTNING™ (Stratagene) em uma mistura de reação contendo 2,5 µL de tampão 5X + 0,75 µL de solução Quik + 0,5 µL de iniciador 1 (25 µM) + 0,5 µL de iniciador 2 (25 µM) + 1,5 µL de dNTP's + 1 µL de mistura de enzima + 16,25 µL de H₂O + 2 µL de DNA. O programa de PCR usado foi o seguinte: 95°C durante 2 minutos; (95°C durante 20

seg, 55°C durante 30 seg, 64°C durante 2 minutos e 30 seg) x 29 ciclos; 64°C durante 5 minutos, manutenção a 4°C.

[00518] As variantes remanescentes foram criadas usando kits de mutagênese multissítio-dirigida QUIKCHANGE® em uma mistura de reação contendo 2,5 µL de tampão 5X + 0,75 µL de solução Quik + 0,5 µL de iniciador 1 (25 µM) + 0,5 µL de iniciador 2 (25 µM) + 1,5 µL de dNTP's + 1 µL de mistura de enzima + 16,25 µL de H₂O + 2 µL DNA. O programa de PCR usado foi o seguinte: 95°C durante 1 minuto; (95°C durante 1 minuto, 53°C durante 1 minuto, 65°C durante 10 min) x 29 ciclos; 65°C durante 10 minutos, manutenção a 4°C. Em todas as reações, a PCR foi feita usando um termociclador MJ Research PTC-200 Peltier. Os iniciadores usados para as reações Quik-Change são fornecidos na tabela 11-5.

Tabela 11-5: Iniciadores usados para as reações Quik-Change		
Nome do iniciador	Sequência do iniciador (5' para 3')	SEQ ID nº
N76D f	/5PHOS/GAACGTTGCGGCGTTAGATAATTCTATT GGCGTGCTTG	191
N76D r	/5PHOS/AGCACGCCAATAGAATTATCTAACGCCGC AACCGTTC	192
S87D f	/5PHOS/TTGGTGTAGCCCCGGATGCTTCGCTCTAC GCCGTTAAAG	193
S87D r	/5PHOS/CGTAGAGCGAAGCATCCGGGGCTACACC AAGCACG	194
G102A f	/5PHOS/GCAGCAGACGGATCAGCACAATACTCATG GATTAT	195
G102A r	/5PHOS/ATAATCCATGAGTATTGTGCTGATCCGTCT GCTGC	196
S130P f	/5PHOS/CAACATGAGCCTGGGAGCACCACCGGGC AGTGCGGCACTTAAAGC	197
S130P r	/5PHOS/GCTTTAAGTGCCGCACTGCCCGGTGGTG CTCCAGGCTCATGTTG	198
S101N f	/5PHOS/GTTCTTGACAGCAGACGGAAATGGCCAATA CTCATGGATT	199
S101N r	/5PHOS/AATCCATGAGTATTGGCCATTTCCGTCTG CTGCAAGAAC	200

Tabela 11-5: Iniciadores usados para as reações Quik-Change		
Nome do iniciador	Sequência do iniciador (5' para 3')	SEQ ID nº
G100N f	/5PHOS/TTAAAGTTCTTGCAGCAGACAATTCAGGC CAATACTCATGGA	201
G100N r	/5PHOS/TCCATGAGTATTGGCCTGAATTGTCTGCT GCAAGAACTTTAA	202
N61P f	/5PHOS/CCGTTTCAAGATCCGAATTCTCATGGCAC ACACGTC	203
N61P r	/5PHOS/TGCCATGAGAATTCGGATCTTGAAACGGG TTTGTTCG	204
A187D f	/5PHOS/TTCAAATCAACGTGATTCTTTTCCTCCGT GGGACCGGAG	205
A187D r	/5PHOS/ACGGAGGAAAAAGAATCACGTTGATTTGA AGAGTCTACAG	206
F189D f	/5PHOS/CAAATCAACGTGCCTCTGATTCCTCCGTG GGACCGGAG	207
F189D r	/5PHOS/CTCCGGTCCCACGGAGGAATCAGAGGCA CGTTGATTTG	208
A137V f	/5PHOS/AGCGGCAGTGCGGCACTTAAAGTTGCAGT TGATAAAGCTGTTGC	209
A137V r	/5PHOS/GCAACAGCTTTATCAACTGCAACTTTAAGT GCCGCACTGCCGCT	210
S63T f	/5PHOS/TCAAGATAACAATACACATGGCACACACG TCGCAGGAAC	211
S63T r	/5PHOS/ACGTGTGTGCCATGTGTATTGTTATCTTGA AACGGGTTTG	212
Q103N f	/5PHOS/AGACGGATCAGGCAATTACTCATGGATTA TCAACGGCATC	213
Q103N r	/5PHOS/TAATCCATGAGTAATTGCCTGATCCGTCTG CTGCAAG	214
N62D f	/5PHOS/ACCCGTTTCAAGATAACGATTCTCATGGC ACACACGTC	215
N62D r	/5PHOS/GACGTGTGTGCCATGAGAATCGTTATCTT GAAACGGGT	216
N109D f1	/5PHOS/CAATACTCATGGATTATCGATGGCATCGA ATGGGCCA	217
N109D r	/5PHOS/TGGCCCATTCGATGCCATCGATAATCCAT GAGTATTG	218
S188D f	/5PHOS/CTCTTCAAATCAACGTGCCGATTTTTCCTC CGTGGGACC	219

Tabela 11-5: Iniciadores usados para as reações Quik-Change		
Nome do iniciador	Sequência do iniciador (5' para 3')	SEQ ID nº
S188D r	/5PHOS/GGTCCCACGGAGGAAAAATCGGCACGTT GATTTGAAGAG	220
S248R f1	/5PHOS/CAAACACTCAAGTCCGCAGAAGTTTAGAA AACACCAC	221
S87R f	/5PHOS/GTGCTTGGTGTAGCCCCGAGAGCTTCGCT CTACGCCGT	222
S87R r	/5PHOS/ACGGCGTAGAGCGAAGCTCTCGGGGCTA CACCAAGCAC	223
S248D f1	/5PHOS/CAAACACTCAAGTCCGCGATAGTTTAGAA AACACCAC	224
S248D r	/5PHOS/GTGGTGTTTTCTAAACTATCGCGGACTTG AGTGTTTG	225
D87S f	/5PHOS/GTGCTTGGTGTAGCCCCGTCTGCTTCGCT CTACGCCGT	226
D87S r	/5PHOS/ACGGCGTAGAGCGAAGCAGACGGGGCTA CACCAAGCAC	227
D109N f	/5PHOS/CAATACTCATGGATTATCAACGGCATCGA ATGGGCCA	228
D109N r	/5PHOS/TGGCCCATTCGATGCCGTTGATAATCCAT GAGTATTG	229
N109D f2	/5PHOS/ACTCATGGATTATCGATGGCATCGAATGG GCCATCGC	230
S248R f2	/5PHOS/CACTCAAGTCCGCAGAAGTTTAGAAAACA CCACTAC	231
S248D f2	/5PHOS/CACTCAAGTCCGCGATAGTTTAGAAAACA CCACTAC	232
S188R f	/5PHOS/CAAATCAACGTGCCAGATTTTCCTCCGTG GGACCGGAG	233
QC FUSION_ For1	AAAGGGGAGGAAAAATCGTGAAACA	234
QC FUSION_ Rev1	GTTCTAAATCGTGTTTTTCTTG	235
S248D forfus	GAACTGGACAAACACTCAAGTCCGCGATAGTTTAG AAAACACCACTAC	236
S248D revfus	GACTTGAGTGTTTGTCCAGTTCGGGTGCTTAGAAA G	237

Tabela 11-5: Iniciadores usados para as reações Quik-Change		
Nome do iniciador	Sequência do iniciador (5' para 3')	SEQ ID n°
R248Sfor	/5PHOS/CAAACACTCAAGTCCGCAGCAGTTTAGAA AACACCAC	238
R248S rev	/5PHOS/GTGGTGTTTTCTAACTGCTGCGGACTTG AGTGTTTG	239
G100E_F sfor	ACGCCGTAAAGTTCTTGCAGCAGACGAATCAGGC CAATACTCATGGAT	240
G100E_F srev	TGCTGCAAGAACTTTAACGGCGTAGAGCGAAGCA GA	241
N123C f	/5PHOS/ACATGGATGTAATCTGCATGAGCCTGGGA GGACCAAG	242
N123C r	/5PHOS/TCCTCCCAGGCTCATGCAGATTACATCCA TGTTATTCG	243
pHpLT R1	/5PHOS/GTTATGAGTTAGTTCAAATTTCG	244

[00519] O DNA parental das amostras de PCR foi removido pela adição de 1 µL de *DpnI* às reações Quik-Change a 37°C de um dia para o outro. Um microlitro das reações digeridas por *DpnI* foram amplificadas usando amplificação por círculo rolante (RCA) com o uso do kit Illustra TempliPhi de acordo com o protocolo do fabricante. Células de *B. subtilis* (Δ aprE, Δ nprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo) foram transformadas com 1 µL de cada reação de RCA e as células transformadas foram plaqueadas sobre placas de LA + 1,6% de leite desnatado contendo 10 ppm de neomicina e incubadas a 37°C de um dia para o outro. Colônias da cultura de um dia para o outro foram selecionadas para a execução de PCR de colônia usando "puReTaq Ready-To-Go PCR Beads" (Amersham). Os iniciadores de PCR usados foram pHPLT F1 (SEQ ID n° 54) e pHPLT seq R1 (SEQ ID n° 55). Os clones com as sequências adequadas foram congelados. As variantes de BPN' foram expressas através do cultivo de transformantes de *B. subtilis* em placas de microtitulação de 96 poços a 37°C durante 68 horas em um meio à base de MOPS contendo ureia.

Geração das variantes de BPN' através de PCR de fusão

[00520] As variantes 5 e 33 foram geradas usando PCR de fusão, com fragmentos amplificados a partir do molde pHPLT-BPN'-v3. Os iniciadores de PCR usados para gerar estas variantes estão incluídos na tabela 11-5. Para a variante 5, um fragmento 5' do gene de BPN' foi amplificado usando o iniciador de sentido direto pHPLT F1 (SEQ ID n° 54), e o iniciador de sentido reverso S248D revfus. O fragmento 3' do gene de BPN' foi amplificado usando o iniciador de sentido direto S248D forfus contendo a mutação de interesse e o iniciador de sentido reverso pHPLT R1. Os dois produtos continham 20 bp de sequência sobreposta e foram fundidos pela combinação de 1 µL de cada fragmento e os iniciadores de fusão QC FUSION_For1 e QC FUSION_Rev1 em uma reação de PCR final. Todas as reações de PCR foram feitas usando condições padrão do kit de PCR Herculanase II (Stratagene). A mistura de PCR continha 1 µL de DNA polimerase, 1 µL de DNA plasmidial (ou fragmento de DNA para fusão), 0,5 µL de dNTP's, 1,25 µL de iniciador de sentido direto 25 µM, 1,25 µL de iniciador de sentido reverso 25 µM, 10 µL de tampão 5X, 35 µL de H₂O e o programa de PCR usado foi o seguinte: 95°C durante 2 minutos, (95°C durante 30 seg, 55°C durante 30 seg, 72°C durante "X" seg) por 29 ciclos, 72°C durante 1 minuto, manutenção a 4°C (o "X" é 15 segundos por 1 kB de DNA a amplificar).

[00521] Para a variante 33, um fragmento 5' do gene de BPN' foi amplificado usando o molde pHPLT-BPN'-v3 e os iniciadores pHPLT F1 (SEQ ID n° 54), e G100E_Fsrev. O fragmento 3' que continha a variante foi amplificado usando os iniciadores G100E_Fsfor e pHPLT R1. Os dois produtos continham 20 bp de sequência sobreposta e foram fundidos pela combinação de 1 µL de cada fragmento e os iniciadores de fusão QC FUSION_For1 e QC FUSION_Rev1 em uma reação de PCR final. As condições da reação de PCR foram as

descritas acima.

[00522] Os dois produtos de fusão foram purificados usando uma coluna de purificação de PCR QIAGEN® sob as condições fornecidas pelo fabricante, e digeridos de um dia para o outro usando as enzimas *Bgl* I e *Hind*III. O plasmídeo pHPLT-BPN' parcial opt foi digerido usando as mesmas enzimas e a banda do vetor foi extraída do gel e purificada usando uma coluna de purificação de gel QIAGEN® usando as recomendações do fabricante. A mistura da enzima de restrição continha: 10 µL de DNA purificado, 5 µL de tampão B da Roche, 0,5 µL de *Hind*III, 0,5 µL de *Bgl* I, 34 µL de H₂O e as reações foram executadas a 37°C durante 8 horas seguido de 65°C durante 20 min. O digesto foi purificado usando uma coluna de purificação de PCR QIAGEN® e ligado à cadeia principal do vetor cortado de um dia para o outro a 16°C usando o kit Mighty Mix Ligase (Tekara). Após a incubação, 1 µL da mistura de ligação foi amplificado usando o kit Illustra TempliPhi.

[00523] Para a reação de amplificação, misturou-se 1 µL da mistura da reação de ligação com 5 µL de tampão de amostra do kit TempliPhi, e aqueceu-se durante 3 minutos a 95°C para desnaturar o DNA. A reação foi colocada sobre gelo para resfriar durante 2 minutos e, então, foi brevemente centrifugada. Cinco microlitros de tampão de reação e 0,2 µL da polimerase phi29 do kit TempliPhi foram adicionados, e as reações foram incubadas a 30°C em uma máquina de PCR da MJ Research durante 4 horas. A enzima phi29 foi inativada por calor nas reações por incubação a 65°C durante 10 minutos na máquina de PCR. Células de *Bacillus subtilis* (Δ aprE, Δ nprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo) foram transformadas usando 1 µL da mistura de reação e os transformantes foram cultivados de um dia para o outro a 37°C sobre placas com 1,6% de leite desnatado contendo 10 ppm de neomicina. Os transformantes foram selecionados para

realização de PCR de colônia e sequenciamento usando "puReTaq Ready-To-Go PCR Beads" (Amersham) e os iniciadores pHPLT F1 (SEQ ID n° 54) e pHPLT seqR1 (SEQ ID n° 55).

4. Geração de variantes de BPN' a partir das bibliotecas RCL4-RCL7

Biblioteca RCL4

[00524] "RCL4" refere-se a um grupo de bibliotecas de saturação de sítio criadas por fusão por PCR que randomizam simultaneamente três códons contíguos no gene que codifica BPN'-v3 (BPN"- G97A-G128A-Y217Q) gene. As posições de aminoácido que correspondem aos três códons mutados em cada biblioteca são fornecidas na tabela 11-6. Dois iniciadores mutagênicos complementares parcialmente coincidentes, cada um contendo três códons degenerados foram usados para introduzir mutações em cada biblioteca, conforme mostrado na tabela 11-6 abaixo. Apenas os dois primeiros nucleotídeos de cada códon degenerado (NNX, N = A, C, T, ou G e X é nucleotídeo inalterado) de interesse foram mutados em cada iniciador (tabela 11-6).

[00525] Para criar cada biblioteca, duas reações de PCR foram executadas usando o iniciador comum que flanqueia o gene em posição 3' (P4976, CCTCTCGGTTATGAGTTAGTTC; (SEQ ID N° 61)) e o iniciador mutagênico, ou o iniciador comum que flanqueia o gene em posição 5' (P4974, GCCTCACATTTGTGCCACCTA; (SEQ ID N° 60)) e o iniciador mutagênico conforme mostrado para cada biblioteca na tabela 11-6. Estas reações de PCR geraram dois fragmentos de PCR, um codificando a metade 5' do gene BPN'-v3 mutante (fragmento 5' do gene) e o outro codificando a metade 3' do gene de BPN'-v3 mutante (fragmento 3' do gene). Cada reação de amplificação por PCR continha 30 pmol de cada iniciador e 100 ng do DNA molde original de BPN'-v3 (plasmídeo pHPLT-BPN'-v3) (vide a figura 1). As amplificações foram executadas usando a Vent DNA polimerase

(NEB). A reação de PCR (20 µL) foi inicialmente aquecida a 95°C durante 2,5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 15 seg., anelamento a 55°C durante 15 seg. e extensão a 72°C durante 40 seg. Após a amplificação, os fragmentos 5' e 3' do gene foram purificados em gel pelo kit de purificação de bandas em gel QIAGEN®, misturados (50 ng de cada fragmento) e amplificados por PCR novamente usando os iniciadores P4973 (AAAGGATCCTAATCGGCGCTTTTC; SEQ ID N° 62) e P4950 (CTTGTCTCCAAGCTTAAATAAAA; SEQ ID N° 63) para gerar o fragmento do gene de extensão completa. As condições da PCR foram as mesmas descritas acima, com a exceção da fase de extensão, que foi executada a 72°C durante 2 minutos. O fragmento de DNA de extensão completa foi purificado em gel pelo kit de purificação de bandas em gel QIAGEN®, digerido pelas enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III e ligado com o vetor pHPLT-BPN' parcial opt que também foi digerido com as mesmas enzimas de restrição. As misturas de ligação foram amplificadas usando amplificação por círculo rolante em um kit Illustra Templiphi de acordo com a recomendação do fabricante (GE Healthcare) para gerar DNA multimérico para a transformação em *Bacillus subtilis*. Para este propósito, 1 µl da mistura de ligação foi misturado com 5 µl do tampão de amostra, aquecido até 95°C durante 3 min e resfriado sobre gelo. A seguir, 5 µl do tampão de reação e 0,2 µl da enzima foram adicionados a cada tubo, seguido de incubação a 30°C durante 10 horas. Os produtos da amplificação por círculo rolante foram diluídos 100 vezes e usados para transformar células de *B. subtilis* ($\Delta aprE$, $\Delta nprE$, $amyE::xylRPxylAcomK-phleo$). Uma alíquota da mistura de transformação foi plaqueada sobre placas com meio LB contendo 1,6% de leite desnatado e 10 µg/mL de neomicina e incubadas de um dia para o outro a 37°C. Subsequentemente, as colônias com halos foram inoculadas em 120 µl de meio LB contendo

10 µg/mL de neomicina.

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Fragmento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
1	5-7	3'	P4976	P5119	TACGCGCAGT CCGTGNNTNN CNCGTATCA CAAATTAAAGC CCCTG	245
		5'	P4974	P5120	TTTAATTTGTG ATACGNNGNN ANNCACGGAC TGCGCGTACG CAT	246
2	11-13	3'	P4976	P5121	TACGGCGTAT CACAANNTNNA NNCCCTGCTC TGCACTCTCAA G	247
		5'	P4974	P5122	AGAGTGCAGA GCAGGGNNTN NANNTTGTGAT ACGCCGTAAG GCAC	248
3	20-22	3'	P4976	P5123	GCTCTGCACT CTCAANNCNN CNNTGGATCA AATGTTAAAGT AGCGGT	249
		5'	P4974	P5124	TTTAACATTTG ATCCANNGNN GNNTTGAGAG TGCAGAGCAG GGGCTT	250
4	21-23	3'	P4976	P5125	CTGCACTCTCA AGGCNNCNNT NNATCAAATGT TAAAGTAGCG GTTATC	251
		5'	P4974	P5126	TACTTTAACAT TTGATNNANNG NNGCCTTGAG AGTGCAGAGC AG	252
5	22-24	3'	P4976	P5127	CACTCTCAAG GCTACNNTNN ANNAATGTTA	253

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Fragmento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
					AAGTAGCGGT TATCGA	
		5'	P4974	P5128	CGCTACTTTAA CATTTNNTNNA NNGTAGCCTT GAGAGTGCAG AG	254
6	23-25	3'	P4976	P5129	TCTCAAGGCTA CACTNNANNA NNTGTTAAAGT AGCGGTTATC GACA	255
		5'	P4974	P5130	AACCGCTACTT TAACANNTNNT NNAGTGTAGC CTTGAGAGTG CAG	256
7	24-26	3'	P4976	P5131	CAAGGCTACA CTGGANNANN TNNTAAAGTAG CGGTTATCGA CAGC	257
		5'	P4974	P5132	GATAACCGCTA CTTTANNANNT NNTCCAGTGTA GCCTTGAGAG TG	258
8	25-27	3'	P4976	P5133	GGCTACACTG GATCANNTNNT NNAGTAGCGG TTATCGACAGC GGT	259
		5'	P4974	P5134	GTCGATAACC GCTACTNNAN NANNTGATCCA GTGTAGCCTT GAGA	260
9	26-28	3'	P4976	P5135	TACACTGGATC AAATNNTNNAN NAGCGGTTAT CGACAGCGGT AT	261
		5'	P4974	P5136	GCTGTCGATAA CCGCTNNTNN	262

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Frag-mento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
					ANNATTTGATC CAGTGTAGCC TTGA	
10	27-29	3'	P4976	P5137	ACTGGATCAAA TGTTNNANNAN NGGTTATCGA CAGCGGTATC GAC	263
		5'	P4974	P5138	ACCGCTGTCTG ATAACCNNTNN TNNAACATTTG ATCCAGTGTAG CCT	264
11	28-30	3'	P4976	P5139	GGATCAAATGT TAAANNANNG NNTATCGACA GCGGTATCGA CTC	265
		5'	P4974	P5140	GATACCGCTG TCGATANNCN NTNNTTTAACA TTTGATCCAGT GTAGC	266
12	29-31	3'	P4976	P5141	TCAAATGTAA AGTANNGNNT NNCGACAGCG GTATCGACTC GAGCCAT	267
		5'	P4974	P5142	GTCGATACCG CTGTCGNNAN NCNNTACTTTA ACATTTGATCC AGTGTA	268
13	30-32	3'	P4976	P5143	AATGTTAAAGT AGCGNNTNNC NNCAGCGGTA TCGACTCGAG CCAT	269
		5'	P4974	P5144	CGAGTCGATA CCGCTGNNGN NANNCGCTAC TTTAACATTTG ATCCAG	270

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Fragmento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
14	31-33	3'	P4976	P5145	GTAAAGTAGC GGTTNNCNCN NCGGTATCG ACTCGAGCCA TCCA	271
		5'	P4974	P5146	GCTCGAGTCG ATACCGNNGN NGNNAACCGC TACTTTAACAT TTGATC	272
15	32-34	3'	P4976	P5147	AAAGTAGCGG TTATCNCNCN NNTATCGACTC GAGCCATCCA GAT	273
		5'	P4974	P5148	ATGGCTCGAG TCGATANNGN NGNNGATAAC CGCTACTTTAA CATTTG	274
16	33-35	3'	P4976	P5149	GTAGCGGTTAT CGACNNCNCN NCGACTCGA GCCATCCAGA TCT	275
		5'	P4974	P5150	TGGATGGCTC GAGTCGNAN NGNNGTCGAT AACCGCTACTT TAACA	276
17	34-36	3'	P4976	P5151	GCGGTTATCG ACAGCNCNTN CNCCTCGAGC CATCCAGATCT TAAAG	277
		5'	P4974	P5152	ATCTGGATGG CTCGAGNNGN NANNGCTGTC GATAACCGCTA CTTT	278
18	35-37	3'	P4976	P5153	GTTATCGACAG CGGTNNCNCN NNGAGCCATC CAGATCTTAA	279

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Fragmento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
					GTC	
		5'	P4974	P5154	AAGATCTGGAT GGCTCNGN GNNACCGCTG TCGATAACCG CTA	280
19	36-38	3'	P4976	P5155	ATCGACAGCG GTATCNNC GNNCCATCCA GATCTTAAAGT CGCTG	281
		5'	P4974	P5156	TTTAAGATCTG GATGGNNC GNNGATAACCG CTGTCGATAAC CGCTA	282
20	37-39	3'	P4976	P5157	GACAGCGGTA TCGACNNGN CNNTCCAGAT CTTAAAGTCGC TGGA	283
		5'	P4974	P5158	GACTTTAAGAT CTGGANNGN CNNGTCGATA CCGCTGTCGA TAAC	284
21	38-40	3'	P4976	P5159	AGCGGTATCG ACTCGNNC TNNAGATCTTA AAGTCGCTGG AGG	285
		5'	P4974	P5160	AGCGACTTTAA GATCTNNAN GNNCGAGTCG ATACCGCTGTC GA	286
22	41-43	3'	P4976	P5161	GACTCGAGCC ATCCANNTNNT NNAGTCGCTG GAGGGGCTTC TAT	287
		5'	P4974	P5162	AGCCCCTCCA GCGACTNNAN	288

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Frag-mento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
					NANNTGGATG GCTCGAGTCG ATAC	
23	43-45	3'	P4976	P5163	AGCCATCCAG ATCTTNNANNC NNTGGAGGGG CTTCTATGGTG CCGT	289
		5'	P4974	P5164	CATAGAAGCC CCTCCNAGCG ACTTTNAAGAT CTGGATGGCT CGAGTC	290
24	44-46	3'	P4976	P5165	CATCCAGATCT TAAANNCNNTN NAGGGGCTTC TATGGTGCCG T	291
		5'	P4974	P5166	CACCATAGAA GCCCCTNNAN NGNNTTTAAGA TCTGGATGGC TCGAG	292
25	51-53	3'	P4976	P5167	GGAGGGGCTT CTATGNNGNN GNNCGAAACA AACCCGTTTCA AGATAA	293
		5'	P4974	P5168	AAACGGGTTT GTTTCGNNCN NCNNCATAGA AGCCCCTCCA GCGA	294
26	52-54	3'	P4976	P5169	GGGGCTTCTA TGGTGNNGNN CNNAACAAAC CCGTTTCAAGA TAACAA	295
		5'	P4974	P5170	TTGAAACGGG TTTGTTNNGNN CNNCACCATA GAAGCCCCTC CAG	296

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Fragmento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
27	53-55	3'	P4976	P5171	GCTTCTATGGT GCCGNNCNA NNAACCCGTT TCAAGATAACA ATTC	297
		5'	P4974	P5172	ATCTTGAAACG GGTTTNTNN GNCCGGCACC ATAGAAGCCC CTC	298
28	54-56	3'	P4976	P5173	TCTATGGTGCC GTCCNNANNA NNCCCGTTTCA AGATAACAATT CTCA	299
		5'	P4974	P5174	GTTATCTTGAA ACGGGNNTNN TNNGGACGGC ACCATAGAAG CCCCT	300
29	55-57	3'	P4976	P5175	ATGGTGCCGT CCGAANNANN CNNGTTTCAAG ATAACAATTCT CATGG	301
		5'	P4974	P5176	ATTGTTATCTT GAAACNNGNN TNNTTCGGAC GGCACCATAG AAG	302
30	56-58	3'	P4976	P5177	GTGCCGTCCG AAACANNCNN GNNTCAAGATA ACAATTCTCAT GGCAC	303
		5'	P4974	P5178	AGAATTGTTAT CTTGANNCNN GNNTGTTTCG GACGGCACCA TAGA	304
31	57-59	3'	P4976	P5179	CCGTCCGAAA CAAACNNGNN TNNAGATAACA ATTCTCATGGC	305

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Fragmento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
					ACAC	
		5'	P4974	P5180	ATGAGAATTGT TATCTNNANNC NNGTTTGTTC GGACGGCACC A	306
32	58-60	3'	P4976	P5181	TCCGAAACAAA CCCGNNTNNA NNTAACAATTC TCATGGCACA CAC	307
		5'	P4974	P5182	GCCATGAGAA TTGTTANNTNN ANNCGGGTTT GTTTCGGACG GCA	308
33	59-61	3'	P4976	P5183	GAAACAAACC CGTTTNNANNT NNCAATTCTCA TGGCACACAC GTC	309
		5'	P4974	P5184	TGTGCCATGA GAATTGNNAN NTNNAACGG GTTTGTTCGG ACG	310
34	60-62	3'	P4976	P5185	ACAAACCCGTT TCAANTNNCN NTTCTCATGGC ACACACGTCG	311
		5'	P4974	P5186	GTGTGTGCCA TGAGAANNNGN NANNTTGAAAC GGGTTTGTTC GGAC	312
35	61-63	3'	P4976	P5187	AACCCGTTTCA AGATNNC NNT NNTCATGGCA CACACGTCGC AG	313
		5'	P4974	P5188	GACGTGTGTG CCATGANNAN NGNNATCTTGA	314

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Fragmento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
					AACGGGTTTGT TTCG	
36	62-64	3'	P4976	P5189	CCGTTTCAAGA TAACNNTNNTN NTGGCACACA CGTCGCAGGA A	315
		5'	P4974	P5190	TGCGACGTGT GTGCCANNAN NANNGTTATCT TGAAACGGGT TTGTTT	316
37	67-69	3'	P4976	P5191	AATTCTCATGG CACANNCNNC NNAGGAACGG TTGCGGCGTT AAA	317
		5'	P4974	P5192	CGCCGCAACC GTTCTNNGN NGNNTGTGCC ATGAGAATTGT TATCTT	318
38	68-70	3'	P4976	P5193	TCTCATGGCAC ACACNNCNA NNAACGGTTG CGGCGTTAAA CAAT	319
		5'	P4974	P5194	TAACGCCGCA ACCGTTNNTN GNNGTGTGTG CCATGAGAATT GTTA	320
39	71-73	3'	P4976	P5195	ACACACGTGC CAGGANNGNN TNNGGCGTTA AACAATTCTAT TGGCGT	321
		5'	P4974	P5196	AGAATTGTTTA ACGCCNNANN CNNTCCTGCG ACGTGTGTGC CAT	322
40	74-76	3'	P4976	P5197	GCAGGAACGG TTGCGNNGNN	323

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Fragmento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
					ANNCAATTCTA TTGGCGTGCTT GGTG	
		5'	P4974	P5198	CACGCCAATA GAATTGNNTNN CNNGCAACC GTTCTGCGA CGT	324
41	77-79	3'	P4976	P5199	ACGGTTGCGG CGTTANNCNNT NNTATTGGCGT GCTTGGTGTA GC	325
		5'	P4974	P5200	ACCAAGCACG CCAATANNANN GNNTAACGCC GCAACCGTTC CTG	326
42	81-83	3'	P4976	P5201	AACAATTCTAT TGGCNNGNNT NNTGTAGCCC CGTCTGCTTC GCT	327
		5'	P4974	P5202	AGCAGACGGG GCTACANNAN NCNNGCCAAT AGAATTGTTTA ACGCCGCAA	328
43	83-85	3'	P4976	P5203	TCTATTGGCGT GCTTNNTNNAN NCCCGTCTGC TTCGCTCTACG	329
		5'	P4974	P5204	GAGCGAAGCA GACGGGNNTN NANNAAGCAC GCCAATAGAAT TGTTTA	330
44	84-86	3'	P4976	P5205	ATTGGCGTGC TTGGTNANN CNNGTCTGCTT CGCTCTACGC CGT	331
		5'	P4974	P5206	GTAGAGCGAA GCAGACNNGN	332

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Frag-mento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
					NTNNACCAAG CACGCCAATA GAATTG	
45	85-87	3'	P4976	P5207	TGGCGTGCTT GGTGTANNCN NGNNTGCTTC GCTCTACGCC GTAA	333
		5'	P4974	P5208	GCGTAGAGC GAAGCANNCN NGNNTACACC AAGCACGCCA ATAGA	334
46	86-88	3'	P4976	P5209	GTGCTTGGTG TAGCCNNGNN TNNTTCGCTCT ACGCCGTAA GTT	335
		5'	P4974	P5210	AACGGCGTAG AGCGAANNAN NCNNGGCTAC ACCAAGCACG CCAA	336
47	87-89	3'	P4976	P5211	CTTGGTGTAG CCCCGNNTNN TNNGCTCTAC GCCGTTAAAGT TCTT	337
		5'	P4974	P5212	TTTAACGGCGT AGAGCNNANN ANNCGGGGCT ACACCAAGCA CGCCAAT	338
48	88-90	3'	P4976	P5213	GGTGTAGCCC CGTCTNNTNN GNNCTACGCC GTAAAGTTCT TGCAG	339
		5'	P4974	P5214	AACTTTAACGG CGTAGNNCNN ANNAGACGGG GCTACACCAA GCA	340

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Fragmento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
49	89-91	3'	P4976	P5215	GTAGCCCCGT CTGCTNNGNN CNNCGCCGTT AAAGTTCTTGC AGCA	341
		5'	P4974	P5216	AAGAACTTTAA CGGCGNNGNN CNNAGCAGAC GGGGCTACAC CAA	342
50	90-92	3'	P4976	P5217	GCCCCGTCTG CTTCGNNCNCN CNNCGTTAAA GTTCTTGCAGC AGAC	343
		5'	P4974	P5218	TGCAAGAACTT TAACGNNNGNN GNNCGAAGCA GACGGGGCTA CAC	344
51	91-93	3'	P4976	P5219	CCGTCTGCTTC GCTCNNCNCN NNTAAAGTTCT TGCAGCAGAC GGA	345
		5'	P4974	P5220	TGCTGCAAGA ACTTTANNGNN GNNGAGCGAA GCAGACGGGG CT	346
52	92-94	3'	P4976	P5221	TCTGCTTCGCT CTACNNCNCN NNAGTTCTTGC AGCAGACGGA TC	347
		5'	P4974	P5222	GTCTGCTGCA AGAACTNNAN NGNNGTAGAG CGAAGCAGAC GGGGCTA	348
53	93-95	3'	P4976	P5223	GCTTCGCTCTA CGCCNNTNNA NNTCTTGCAG CAGACGGATC	349

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Fragmento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
					AG	
		5'	P4974	P5224	TCCGTCTGCT GCAAGANNTN NANNGGCGTA GAGCGAAGCA GACG	350
54	94-96	3'	P4976	P5225	TCGCTCTACG CCGTTNNANNT NNTGCAGCAG ACGGATCAGG CCA	351
		5'	P4974	P5226	TGATCCGTCTG CTGCANNANN TNNAACGGCG TAGAGCGAAG CAG	352
55	95-97	3'	P4976	P5227	CTCTACGCCG TTAAANNTNNT NNAGCAGACG GATCAGGCCA ATA	353
		5'	P4974	P5228	GCCTGATCCG TCTGCTNNANN ANNTTTAACGG CGTAGAGCGA AG	354
56	96-98	3'	P4976	P5229	TACGCCGTAA AGTTNNTNNAN NAGACGGATC AGGCCAATACT C	355
		5'	P4974	P5230	TTGGCCTGATC CGTCTNNTNNA NNAACTTTAAC GGCGTAGAGC GA	356
57	97-99	3'	P4976	P5231	GCCGTTAAAGT TCTTNNANNAN NCGGATCAGG CCAATACTCAT G	357
		5'	P4974	P5232	GTATTGGCCT GATCCGNNTN	358

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Frag-mento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
					NTNNAAGAACT TTAACGGCGTA GAG	
58	98-100	3'	P4976	P5233	GTAAAGTTCT TGCANNANNC NNATCAGGCC AATACTCATGG ATTA	359
		5'	P4974	P5234	TGAGTATTGGC CTGATNNGNN TNNTGCAAGAA CTTTAACGGC GTAG	360
59	99-101	3'	P4976	P5235	AAAGTTCTTGC AGCANNCNNA NNAGGCCAAT ACTCATGGATT ATC	361
		5'	P4974	P5236	CCATGAGTATT GGCCTNNTNN GNNTGCTGCA AGAACTTTAAC GGCGTA	362
60	100-102	3'	P4976	P5237	GTTCTTGCAGC AGACNNANNA NNCCAATACTC ATGGATTATCA AC	363
		5'	P4974	P5238	AATCCATGAGT ATTGGNNTNNT NNGTCTGCTG CAAGAACTTTA ACG	364
61	101-103	3'	P4976	P5239	CTTGCAGCAG ACGGANNANN CNNATACTCAT GGATTATCAAC GGCA	365
		5'	P4974	P5240	GATAATCCATG AGTATNNGNNT NNTCCGTCTG CTGCAAGAACT TT	366

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Fragmento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
62	102-104	3'	P4976	P5241	GCAGCAGACG GATCANNCNN ANNCTCATGG ATTATCAACGG CATC	367
		5'	P4974	P5242	TTGATAATCCA TGAGNNTNNG NNTGATCCGT CTGCTGCAAG AAC	368
63	103-105	3'	P4976	P5243	GCAGACGGAT CAGGCNNANN CNNATGGATTA TCAACGGCAT CGAAT	369
		5'	P4974	P5244	GCCGTTGATAA TCCATNNGNNT NNGCCTGATC CGTCTGCTGC AA	370
64	104-106	3'	P4976	P5245	GACGGATCAG GCCAANNCNN ANNGATTATCA ACGGCATCGA ATGG	371
		5'	P4974	P5246	GATGCCGTTG ATAATCNNTNN GNNTTGGCCT GATCCGTCTG CTG	372
65	105-107	3'	P4976	P5247	GGATCAGGCC AATACNNANN GNNTATCAAC GGCATCGAAT GGGCCAT	373
		5'	P4974	P5248	TTCGATGCCGT TGATANNCNNT NNGTATTGGC CTGATCCGTCT G	374
66	106-108	3'	P4976	P5249	TCAGGCCAATA CTCANNGNNT NNCAACGGCA TCGAATGGGC	375

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Fragmento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
					CAT	
		5'	P4974	P5250	CCATTCGATGC CGTTGNNANN CNNTGAGTATT GGCCTGATCC GTC	376
67	107-109	3'	P4976	P5251	GGCCAATACT CATGGNNTNN CNNCGGCATC GAATGGGCCA TCGCGAAT	377
		5'	P4974	P5252	GGCCCATTCG ATGCCGNNGN NANNCCATGA GTATTGGCCT GATCC	378
68	108-110	3'	P4976	P5253	CAATACTCATG GATTNNCNC NNCATCGAAT GGGCCATCGC GAA	379
		5'	P4974	P5254	GATGGCCCAT TCGATGNNGN NGNNAATCCAT GAGTATTGGC CTGAT	380
69	109-111	3'	P4976	P5255	TACTCATGGAT TATCNCNCNC NNCGAATGGG CCATCGCGAA TAA	381
		5'	P4974	P5256	CGCGATGGCC CATTGNNNGN NGNNGATAAT CCATGAGTATT GGCCT	382
70	110-112	3'	P4976	P5257	TCATGGATTAT CAACNNCNC NNATGGGCCA TCGCGAATAAC ATG	383
		5'	P4974	P5258	ATTCGCGATG GCCCATNNGN	384

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Frag-mento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
					NGNNGTTGAT AATCCATGAGT ATTGG	
71	111-113	3'	P4976	P5259	TGGATTATCAA CGGCNNCNNA NNGGCCATCG CGAATAACATG GA	385
		5'	P4974	P5260	GTTATTTCGCGA TGGCCNNTNN GNNGCCGTTG ATAATCCATGA GTAT	386
72	112-114	3'	P4976	P5261	ATTATCAACGG CATCNNANNG NNCATCGCGA ATAACATGGAT GTAA	387
		5'	P4974	P5262	CATGTTATTTCG CGATGNNCNN TNNGATGCCG TTGATAATCCA TGAG	388
73	113-115	3'	P4976	P5263	ATCAACGGCAT CGAANNNGNNC NNCGCGAATA ACATGGATGTA ATCAA	389
		5'	P4974	P5264	ATCCATGTTAT TCGCGNNGN CNNTTCGATG CCGTTGATAAT CCAT	390
74	114-116	3'	P4976	P5265	AACGGCATCG AATGGNNCNN CNNGAATAACA TGGATGTAATC AACAT	391
		5'	P4974	P5266	TACATCCATGT TATTCNNGN GNNCCATTTCG ATGCCGTTGAT AATC	392

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Fragmento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
75	115-117	3'	P4976	P5267	GGCATCGAAT GGGCCNNCNN GNNTAACATG GATGTAATCAA CATGAG	393
		5'	P4974	P5268	GATTACATCCA TGTTANNCNN GNNGGCCCAT TCGATGCCGTT GA	394
76	116-118	3'	P4976	P5269	ATCGAATGGG CCATCNGN TNNCATGGAT GTAATCAACAT GAGCCT	395
		5'	P4974	P5270	GTTGATTACAT CCATGNNANN CNNGATGGCC CATTGATGCC GT	396
77	117-119	3'	P4976	P5271	GAATGGGCCA TCGCGNNTNN CNNGGATGTA ATCAACATGAG CCTG	397
		5'	P4974	P5272	CATGTTGATTA CATCCNNGN ANNCGCGATG GCCCATTCGAT GC	398
78	118-120	3'	P4976	P5273	TGGGCCATCG CGAATNNCNN GNNTGTAATCA ACATGAGCCT GGGA	399
		5'	P4974	P5274	GCTCATGTTGA TTACANNCNN GNNATTCGCG ATGGCCCATTC GA	400
79	119-121	3'	P4976	P5275	GCCATCGCGA ATAACNNGNNT NNAATCAACAT GAGCCTGGGA	401

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Fragmento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
					GCA	
		5'	P4974	P5276	CAGGCTCATG TTGATTNNANN CNNGTTATTCTG CGATGGCCCA TTC	402
80	120-122	3'	P4976	P5277	ATCGCGAATAA CATGNNTNNA NNCAACATGA GCCTGGGAGC AC	403
		5'	P4974	P5278	TCCCAGGCTC ATGTTGNNTNN ANNCATGTTAT TCGCGATGGC CCAT	404
81	121-123	3'	P4976	P5279	GCGAATAACAT GGATNNANNC NNCATGAGCC TGGGAGCACC AAG	405
		5'	P4974	P5280	TGCTCCCAGG CTCATGNNGN NTNNATCCATG TTATTTCGCGAT GGCCCAT	406
82	122-124	3'	P4976	P5281	AATAACATGGA TGTANNCNNC NNGAGCCTGG GAGCACCAAG CGGCA	407
		5'	P4974	P5282	TGGTGCTCCC AGGCTCNNGN NGNNTACATC CATGTTATTCTG CGATG	408
83	123-125	3'	P4976	P5283	AACATGGATGT AATCNNCNG NNCCTGGGAG CACCAAGCGG CA	409
		5'	P4974	P5284	GCTTGCTGCT CCCAGGNNCN	410

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Frag-mento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
					NGNNGATTAC ATCCATGTTAT TCGCGA	
84	124-126	3'	P4976	P5285	ATGGATGTAAT CAACNNGNNC NNGGGAGCAC CAAGCGGCAG TG	411
		5'	P4974	P5286	GCCGCTTGGT GCTCCCNNGN NCNNGTTGATT ACATCCATGTT ATTG	412
85	125-127	3'	P4976	P5287	GATGTAATCAA CATGNNCNG NNAGCACCAA GCGGCAGTGC GGCA	413
		5'	P4974	P5288	ACTGCCGCTT GGTGCTNNCN NGNNCATGTT GATTACATCCA TGTTATT	414
86	126-128	3'	P4976	P5289	GTAATCAACAT GAGCNNGNNA NNACCAAGCG GCAGTGCGGC ACT	415
		5'	P4974	P5290	CGCACTGCCG CTTGGTNNTNN CNNGCTCATG TTGATTACATC CATG	416
87	129-131	3'	P4976	P5291	ATGAGCCTGG GAGCANNANN CNNCAGTGCG GCACTTAAAGC AGCA	417
		5'	P4974	P5292	TTTAAGTGCCG CACTGNNNGN TNNTGCTCCCA GGCTCATGTT GAT	418

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Fragmento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
88	132-134	3'	P4976	P5293	GGAGCACCAA GCGGCNNTNN GNNACTTAAAG CAGCAGTTGAT AAAG	419
		5'	P4974	P5294	AACTGCTGCTT TAAGTNNCNA NNGCCGCTTG GTGCTCCCAG GCT	420
89	133-135	3'	P4976	P5295	GCACCAAGCG GCAGTNNGNN ANNTAAAGCA GCAGTTGATAA AGCTG	421
		5'	P4974	P5296	ATCAACTGCTG CTTTANNTNNC NNACTGCCGC TTGGTGCTCC CA	422
90	134-136	3'	P4976	P5297	CCAAGCGGCA GTGCGNNANN TNNAGCAGCA GTTGATAAAGC TGTTG	423
		5'	P4974	P5298	TTTATCAACTG CTGCTNNANNT NNCGCACTGC CGCTTGGTGC TC	424
91	135-137	3'	P4976	P5299	AGCGGCAGTG CGGCANNTNN ANNAGCAGTT GATAAAGCTGT TGCAT	425
		5'	P4974	P5300	AGCTTTATCAA CTGCTNNTNNA NNTGCCGCAC TGCCGCTTGG TG	426
92	136-138	3'	P4976	P5301	GGCAGTGCGG CACTTNNANNA NNAGTTGATAA AGCTGTTGCAT	427

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Fragmento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
					CTG	
		5'	P4974	P5302	AACAGCTTTAT CAACTNNTNNT NNAAGTGCCG CACTGCCGCT TG	428
93	137-139	3'	P4976	P5303	AGTGCGGCAC TTAAANNANNA NNTGATAAAGC TGTTGCATCTG GTG	429
		5'	P4974	P5304	TGCAACAGCTT TATCANNTNNT NNTTTAAGTGC CGCACTGCCG CTT	430
94	138-140	3'	P4976	P5305	GCGGCACTTA AAGCANNANN TNNTAAAGCTG TTGCATCTGGT GTC	431
		5'	P4974	P5306	AGATGCAACA GCTTTANNANN TNNTGCTTTAA GTGCCGCACT GC	432
95	139-141	3'	P4976	P5307	GCACTTAAAGC AGCANNTNNT NNAGCTGTTG CATCTGGTGTC GT	433
		5'	P4974	P5308	ACCAGATGCA ACAGCTNNAN NANNTGCTGC TTTAAGTGCCG CAC	434
96	140-142	3'	P4976	P5309	CTTAAAGCAGC AGTTNNTNNAN NTGTTGCATCT GGTGTCGTCG T	435
		5'	P4974	P5310	GACACCAGAT GCAACANNTN	436

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Frag-mento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
					NANNAACTGCT GCTTTAAGTGC CGCA	
97	141-143	3'	P4976	P5311	AAAGCAGCAG TTGATNNANNT NNTGCATCTG GTGTCGTCGT AGT	437
		5'	P4974	P5312	GACGACACCA GATGCANNAN NTNNATCAACT GCTGCTTTAAG TGC	438
98	142-144	3'	P4976	P5313	GCAGCAGTTG ATAAANNTNNT NNATCTGGTGT CGTCGTAGTA GC	439
		5'	P4974	P5314	TACGACGACA CCAGATNNAN NANNTTTATCA ACTGCTGCTTT AAGTG	440
99	143-145	3'	P4976	P5315	GCAGTTGATAA AGCTNNTNNA NNTGGTGTGCG TCGTAGTAGC GGCA	441
		5'	P4974	P5316	TACTACGACGA CACCANNTNN ANNAGCTTTAT CAACTGCTGCT TTAA	442
100	144-146	3'	P4976	P5317	GTTGATAAAGC TGTTNNANNTN NTGTCGTCGTA GTAGCGGCAG CT	443
		5'	P4974	P5318	CGCTACTACG ACGACANNAN NTNNAACAGCT TTATCAACTGC TGCT	444

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Fragmento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
101	145-147	3'	P4976	P5319	GATAAAGCTGT TGCANNTNNTN NCGTCGTAGT AGCGGCAGCT G	445
		5'	P4974	P5320	TGCCGCTACTA CGACGNNANN ANNTGCAACA GCTTTATCAAC TGCT	446
102	146-148	3'	P4976	P5321	AAAGCTGTTGC ATCTNNTNNCN NCGTAGTAGC GGCAGCTGGG AA	447
		5'	P4974	P5322	AGCTGCCGCT ACTACGNNGN NANNAGATGC AACAGCTTTAT CAACTG	448
103	147-149	3'	P4976	P5323	GCTGTTGCATC TGGTNNCNCN NNAGTAGCGG CAGCTGGGAA TGA	449
		5'	P4974	P5324	CCCAGCTGCC GCTACTNNGN NGNNACCAGA TGCAACAGCTT TATCA	450
104	148-150	3'	P4976	P5325	GTTGCATCTG GTGTCNNCNCN ANNAGCGGCA GCTGGGAATG AGGGAA	451
		5'	P4974	P5326	ATTCCCAGCTG CCGCTNNTNN GNNGACACCA GATGCAACAG CTTT	452
105	149-151	3'	P4976	P5327	GCATCTGGTG TCGTCNNANN ANNGGCAGCT GGGAATGAGG	453

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Frag-mento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
					GAAC	
		5'	P4974	P5328	CTCATTCCCAG CTGCCNNTNN TNNGACGACA CCAGATGCAA CAG	454
106	150-152	3'	P4976	P5329	TCTGGTGTCTCGT CGTANNANNG NNAGCTGGGA ATGAGGGAAC ATC	455
		5'	P4974	P5330	TCCCTCATTCC CAGCTNNCNN TNNTACGACG ACACCAGATG CAAC	456
107	151-153	3'	P4976	P5331	GGTGTCTGTCG TAGTANNGNN ANNTGGGAAT GAGGGAACAT CCGGAT	457
		5'	P4974	P5332	TGTTCCCTCAT TCCCANNTNN CNNTACTACGA CGACACCAGA TGCA	458
108	158-160	3'	P4976	P5333	GCTGGGAATG AGGGANNANN CNNATCATCGA GTACCGTCTGG TTAT	459
		5'	P4974	P5334	GACGGTACTC GATGATNNGN NTNNTCCCTCA TTCCCAGCTG CCGCTA	460
109	159-161	3'	P4976	P5335	GGGAATGAGG GAACANNCNN ANNATCGAGTA CCGTCGGTTAT CCA	461
		5'	P4974	P5336	ACCGACGGTA CTCGATNNTNN	462

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Frag-mento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
					GNNTGTTCCCT CATTCCCAGCT G	
110	160-162	3'	P4976	P5337	AATGAGGGAA CATCCNNANN ANNGAGTACC GTCGGTTATCC AGG	463
		5'	P4974	P5338	ATAACCGACG GTACTCNNTNN TNNGGATGTTC CCTCATTCCCA G	464
111	163-165	3'	P4976	P5339	ACATCCGGAT CATCGNNTNN CNNCGGTTAT CCAGGCAAGT ACCCTT	465
		5'	P4974	P5340	CTTGCCTGGAT AACCGNNGNN ANNCGATGAT CCGGATGTTC CCT	466
112	164-166	3'	P4976	P5341	TCCGGATCATC GAGTNNCNNC NNTTATCCAGG CAAGTACCCTT CA	467
		5'	P4974	P5342	GTAATTGCCTG GATAANNGNN GNNACTCGAT GATCCGGATG TTCC	468
113	167-169	3'	P4976	P5343	TCGAGTACCG TCGGTNNTNN ANNCAAGTAC CCTTCAGTGAT TGCA	469
		5'	P4974	P5344	CACTGAAGGG TACTTGNNTNN ANNACCGACG GTACTCGATGA TC	470

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Fragmento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
114	168-170	3'	P4976	P5345	AGTACCGTCG GTTATNNANNC NNGTACCCTTC AGTGATTGCA GTG	471
		5'	P4974	P5346	AATCACTGAAG GGTACNNGNN TNNATAACCGA CGGTACTCGA TGA	472
115	169-171	3'	P4976	P5347	ACCGTCGGTT ATCCANNCNN GNNCCCTTCA GTGATTGCAGT GG	473
		5'	P4974	P5348	TGCAATCACTG AAGGGNNCNC GNNTGGATAA CCGACGGTAC TCGA	474
116	170-172	3'	P4976	P5349	GTCGGTTATCC AGGCNNGNNC NNTTCAGTGAT TGCAGTGGGC GCT	475
		5'	P4974	P5350	CACTGCAATCA CTGAANNNGNN CNNGCCTGGA TAACCGACGG TAC	476
117	171-173	3'	P4976	P5351	GGTTATCCAG GCAAGNNCNC TNNAGTGATTG CAGTGGGCGC TGTA	477
		5'	P4974	P5352	GCCCACTGCA ATCACTNNANN GNNCTTGCCT GGATAACCGA CGGTA	478
118	172-174	3'	P4976	P5353	TATCCAGGCAA GTACNNTNNA NNGATTGCAG TGGGCGCTGT	479

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Fragmento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
					AGA	
		5'	P4974	P5354	AGCGCCCACT GCAATCNNTN NANNGTACTTG CCTGGATAAC CGAC	480
119	182-184	3'	P4976	P5355	GTGGGCGCTG TAGACNNTNNA NNTCAACGTG CCTCTTTTCC TC	481
		5'	P4974	P5356	AAAAGAGGCA CGTTGANNTN NANNGTCTACA GCGCCCACTG CAA	482
120	183-185	3'	P4976	P5357	GGCGCTGTAG ACTCTNNANNT NNACGTGCCT CTTTTTCCTCC GT	483
		5'	P4974	P5358	GGAAAAAGAG GCACGTNNAN NTNNAGAGTCT ACAGCGCCCA CTG	484
121	184-186	3'	P4976	P5359	GCTGTAGACT CTTCANNTNNA NNTGCCTCTTT TTCCTCCGTG GGA	485
		5'	P4974	P5360	GGAGGAAAAA GAGGCANNTN NANNTGAAGA GTCTACAGCG CCCA	486
122	185-187	3'	P4976	P5361	GTAGACTCTTC AAATNNANNTN NCTCTTTTCC TCCGTGGGAC	487
		5'	P4974	P5362	CACGGAGGAA AAAGAGNNAN NTNNATTTGAA	488

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Fragmento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
					GAGTCTACAG CGCCCA	
123	186-188	3'	P4976	P5363	GACTCTTCAAA TCAANNTNNCN NTTTTTCCTCC GTGGGACCGG A	489
		5'	P4974	P5364	TCCCACGGAG GAAAAANNGN NANNTTGATTT GAAGAGTCTA CAGCGCCCA	490
124	192-194	3'	P4976	P5365	GCCTCTTTTTC CTCCNNGNNA NNGGAGCTGG ATGTCATGGC CCCT	491
		5'	P4974	P5366	CATGACATCCA GCTCCNNTNN CNNGGAGGAA AAAGAGGCAC GTTG	492
125	194-196	3'	P4976	P5367	TTTTCCTCCGT GGGANNGNNG NNGGATGTCA TGGCCCCTGG CGTT	493
		5'	P4974	P5368	AGGGGCCATG ACATCCNNCN NCNNTCCCAC GGAGGAAAAA GAGG	494
126	195-197	3'	P4976	P5369	TCCTCCGTGG GACCGNNGNN GNNTGTCATG GCCCCTGGCG TTTCTATT	495
		5'	P4974	P5370	GCCAGGGGCC ATGACANNCN NCNNCGGTCC CACGGAGGAA AAAG	496
127	196-198	3'	P4976	P5371	TCCGTGGGAC CGGAGNNGNN	497

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Frag-mento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
					TNNCATGGCC CCTGGCGTTT CTATT	
		5'	P4974	P5372	AACGCCAGGG GCCATGNNAN NCNNCTCCGG TCCCACGGAG GAAAAA	498
128	197-199	3'	P4976	P5373	GTGGGACCGG AGCTGNNTNN CNNGGCCCT GGCGTTTCTAT TCAA	499
		5'	P4974	P5374	AGAAACGCCA GGGGCCNNGN NANNCAGCTC CGGTCCCACG GAGGAAA	500
129	198-200	3'	P4976	P5375	GGACCGGAGC TGGATNNCNN GNNCCCTGGC GTTTCTATTCA ATCGA	501
		5'	P4974	P5376	AATAGAAACGC CAGGGNNCNN GNNATCCAGC TCCGGTCCCA CGGA	502
130	203-205	3'	P4976	P5377	GTCATGGCCC CTGGCNNTNN TNNTCAATCGA CGCTTCCAGG GAA	503
		5'	P4974	P5378	TGGAAGCGTC GATTGANNAN NANNGCCAGG GGCCATGACA TCCA	504
131	210-212	3'	P4976	P5379	ATTCAATCGAC GCTTNNANNG NNCAAGTATG GTGCGCAAAA CGGGA	505

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Fragmento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
		5'	P4974	P5380	TTGCGCACCAT ACTTGNNCNNT NNAAGCGTCG ATTGAATAGAA ACG	506
132	211-213	3'	P4976	P5381	CAATCGACGC TTCCANNGNN CNNGTATGGT GCGCAAACG GGACT	507
		5'	P4974	P5382	GTTTTGCGCAC CATA CNNGNN CNNTGGAAGC GTCGATTGAAT AGAA	508
133	216-218	3'	P4976	P5383	GGAACAAGT ATGGTNNGNN ANNCGGGACT TCCATGGCCT CGCCGCAT	509
		5'	P4974	P5384	GGCCATGGAA GTCCCGNNTN NCNNACCATA CTTGTTCCCTG GAAG	510
134	217-219	3'	P4976	P5385	AACAAGTATGG TGCGNNANNC NNGACTTCCAT GGCCTCGCCG CAT	511
		5'	P4974	P5386	CGAGGCCATG GAAGTCNNGN NTNCGCACC ATACTTGTTC CTG	512
135	218-220	3'	P4976	P5387	AAGTATGGTG CGCAANNCNN GNNTTCCATG GCCTCGCCGC ATG	513
		5'	P4974	P5388	CGGCGAGGCC ATGGAANNCN NGNNTTGCGC ACCATACTTGT	514

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Fragmento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
					TCCC	
136	219-221	3'	P4976	P5389	TATGGTGCGC AAAACNNGNN TNNCATGGCC TCGCCGCATG TAG	515
		5'	P4974	P5390	ATGCGGCGAG GCCATGNAN NCNNGTTTTGC GCACCATACTT GTTC	516
137	230-232	3'	P4976	P5391	CCGCATGTAG CTGGGNNNGNN CNNATTGATTC TTTCTAAGCAC CCGAA	517
		5'	P4974	P5392	CTTAGAAAGAA TCAATNNGNN CNNCCCAGCT ACATGCGGCG AGGCCAT	518
138	231-233	3'	P4976	P5393	CATGTAGCTG GGGCGNNCNCN ANNATTCTTT CTAAGCACCC GAACT	519
		5'	P4974	P5394	GTGCTTAGAAA GAATCNNTNN GNCGCCCCA GCTACATGCG GCGAGGCCAT	520
139	232-234	3'	P4976	P5395	GTAGCTGGGG CGGCCNNANN GNNTCTTTCTA AGCACCCGAA CTG	521
		5'	P4974	P5396	CGGGTGCTTA GAAAGANNCN NTNNGGCCGC CCCAGCTACAT GC	522
140	238-240	3'	P4976	P5397	TTGATTCTTTC TAAGNNCNCN	523

N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Frag-mento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
					NNCTGGACAA ACACTCAAGTC CGCA	
		5'	P4974	P5398	TTGAGTGTTTG TCCAGNNC GNNCTTAGAAA GAATCAATGC GGC	524
141	240-242	3'	P4976	P5399	CTTTCTAAGCA CCCGNNC NNAACACTCA AGTCCGCAGC AGT	525
		5'	P4974	P5400	GCGGACTTGA GTGTTTNNC GNNCGGGTGC TTAGAAAGAAT CAAT	526
142	246-248	3'	P4976	P5401	TGGACAAACA CTCAANN CNNCAGTTT AAAACACCA ACAAAA	527
		5'	P4974	P5402	GGTGTTTTCTA AACTGNNG GNNTTGAGTG TTTGTCCAGTT CGGGT	528
143	255-257	3'	P4976	P5403	TTAGAAAACAC CACTNNANNA NNTGGTGATTC TTTCTACTATG GAAA	529
		5'	P4974	P5404	GTAGAAAGAAT CACCANNTNNT NNAGTGGTGT TTTCTAAACTG CTG	530
144	258-260	3'	P4976	P5405	ACCACTACAAA ACTTNNTNNTN NTTCTACTAT GGAAAAGGGC TGA	531

Tabela 11-6: Lista dos iniciadores usados para criar as bibliotecas RCL4						
N° da biblioteca	Resíduos mutados em BPN'-v3	Fragmento do gene	Nomes dos iniciadores flaqueadores comuns	Nomes do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
		5'	P4974	P5406	TTTTCCATAGT AGAAANNANN ANNAAGTTTTG TAGTGGTGTTT TCTAA	532
145	265-267	3'	P4976	P5407	GATTCTTTCTA CTATNNANNAN NGCTGATCAA CGTACAGGCG GCA	533
		5'	P4974	P5408	CTGTACGTTGA TCAGCNNTNNT NNATAGTAGAA AGAATCACCAA GTTT	534

Variantes RCL5

[00526] "RCL5" refere-se a um conjunto de variantes combinatórias criadas por fusão por PCR usando vários mutantes de BPN' como moléculas originais (molde). As mutações introduzidas em cada plasmídeo original são mostradas na tabela 11-7 e os iniciadores mutagênicos usados para criar os mutantes estão indicados na tabela 11-8.

Tabela 11-7: Lista de plasmídios originais e mutações introduzidas nas variantes de RCL5		
N° da variante combinatória	Plasmídios originais	Mutações introduzidas
1	G97A-G128A-Y217Q-T22N-S24A	N61P-N62S
2	G97A-G128A-Y217Q-T22N-S24A	T55P
3	G97A-G128A-Y217Q-T22N-S24A	N61P-S63H
4	G97A-G128A-Y217Q-T22N-S24A	Q59S-N61P
5	G97A-G128A-Y217Q-T22N-S24A	L75S-N76Y
6	G97A-G128A-Y217Q-T22N-S24A	P86S-S87G-A88V
7	G97A-G128A-Y217Q-T22N-S24A	S87G-A88V-S89A

Tabela 11-7: Lista de plasmídios originais e mutações introduzidas nas variantes de RCL5		
N° da variante combinatória	Plasmídios originais	Mutações introduzidas
8	G97A-G128A-Y217Q-T22N-S24A	S87T-A88L-S89G
9	G97A-G128A-Y217Q-T22N-S24A	P129Q-S130G-G131S
10	G97A-G128A-Y217Q-T22N-S24A	V203Y
11	G97A-G128A-Y217Q-T22N-S24A	G211R-N212S-K213V
12	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G	N61P-N62S
13	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G	T55P
14	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G	N61P-S63H
15	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G	Q59S-N61P
16	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G	L75S-N76Y
17	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G	P86S-S87G-A88V
18	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G	S87G-A88V-S89A
19	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G	S87T-A88L-S89G
20	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G	P129Q-S130G-G131S
21	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G	V203Y
22	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G	G211R-N212S-K213V
23	G97A-G128A-Y217Q-S24R	N61P-N62S
24	G97A-G128A-Y217Q-S24R	T55P
25	G97A-G128A-Y217Q-S24R	N61P-S63H
26	G97A-G128A-Y217Q-S24R	Q59S-N61P
27	G97A-G128A-Y217Q-S24R	L75S-N76Y
28	G97A-G128A-Y217Q-S24R	P86S-S87G-A88V
29	G97A-G128A-Y217Q-S24R	S87G-A88V-S89A
30	G97A-G128A-Y217Q-S24R	S87T-A88L-S89G
31	G97A-G128A-Y217Q-S24R	P129Q-S130G-G131S

Tabela 11-7: Lista de plasmídios originais e mutações introduzidas nas variantes de RCL5		
N° da variante combinatória	Plasmídios originais	Mutações introduzidas
32	G97A-G128A-Y217Q-S24R	V203Y
33	G97A-G128A-Y217Q-S24R	G211R-N212S-K213V
34	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G	N61P-N62S
35	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G	T55P
36	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G	N61P-S63H
37	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G	Q59S-N61P
38	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G	L75S-N76Y
39	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G	P86S-S87G-A88V
40	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G	S87G-A88V-S89A
41	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G	S87T-A88L-S89G
42	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G	P129Q-S130G-G131S
43	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G	V203Y
44	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G	G211R-N212S-K213V
45	G97A-G128A-Y217Q-N61P-N62S	L75S-N76Y
46	G97A-G128A-Y217Q-N61P-N62S	P86S-S87G-A88V
47	G97A-G128A-Y217Q-N61P-N62S	S87G-A88V-S89A
48	G97A-G128A-Y217Q-N61P-N62S	S87T-A88L-S89G
49	G97A-G128A-Y217Q-N61P-N62S	P129Q-S130G-G131S
50	G97A-G128A-Y217Q-N61P-N62S	V203Y
51	G97A-G128A-Y217Q-N61P-N62S	G211R-N212S-K213V

Tabela 11-7: Lista de plasmídios originais e mutações introduzidas nas variantes de RCL5		
N° da variante combinatória	Plasmídios originais	Mutações introduzidas
52	G97A-G128A-Y217Q-T55P	L75S-N76Y
53	G97A-G128A-Y217Q-T55P	P86S-S87G-A88V
54	G97A-G128A-Y217Q-T55P	S87G-A88V-S89A
55	G97A-G128A-Y217Q-T55P	S87T-A88L-S89G
56	G97A-G128A-Y217Q-T55P	P129Q-S130G-G131S
57	G97A-G128A-Y217Q-T55P	V203Y
58	G97A-G128A-Y217Q-T55P	G211R-N212S-K213V
59	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H	L75S-N76Y
60	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H	P86S-S87G-A88V
61	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H	S87G-A88V-S89A
62	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H	S87T-A88L-S89G
63	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H	P129Q-S130G-G131S
64	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H	V203Y
65	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H	G211R-N212S-K213V
66	G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P	L75S-N76Y
67	G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P	P86S-S87G-A88V
68	G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P	S87G-A88V-S89A
69	G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P	S87T-A88L-S89G
70	G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P	P129Q-S130G-G131S
71	G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P	V203Y
72	G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P	G211R-N212S-K213V

Tabela 11-7: Lista de plasmídios originais e mutações introduzidas nas variantes de RCL5		
N° da variante combinatória	Plasmídios originais	Mutações introduzidas
73	G97A-G128A-Y217Q-L75S-N76Y	P86S-S87G-A88V
74	G97A-G128A-Y217Q-L75S-N76Y	S87G-A88V-S89A
75	G97A-G128A-Y217Q-L75S-N76Y	S87T-A88L-S89G
76	G97A-G128A-Y217Q-L75S-N76Y	P129Q-S130G-G131S
77	G97A-G128A-Y217Q-L75S-N76Y	V203Y
78	G97A-G128A-Y217Q-L75S-N76Y	G211R-N212S-K213V
79	G97A-G128A-Y217Q-P86S-S87G-A88V	P129Q-S130G-G131S
80	G97A-G128A-Y217Q-P86S-S87G-A88V	V203Y
81	G97A-G128A-Y217Q-P86S-S87G-A88V	G211R-N212S-K213V
82	G97A-G128A-Y217Q-S87G-A88V-S89A	P129Q-S130G-G131S
83	G97A-G128A-Y217Q-S87G-A88V-S89A	V203Y
84	G97A-G128A-Y217Q-S87G-A88V-S89A	G211R-N212S-K213V
85	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G	P129Q-S130G-G131S
86	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G	V203Y
87	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G	G211R-N212S-K213V
88	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S	V203Y
89	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S	G211R-N212S-K213V
90	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	G211R-N212S-K213V

Tabela 11-8: Iniciadores usados para criar as variantes combinatórias RCL5					
Mutações introduzidas	Fragmentos do gene	Nomes dos iniciadores comuns que flanqueiam o gene em posição 3' e 5'	Nome do iniciador	Sequência do iniciador	SEQ ID nº
T22N-S24A	3'	P4976	P5432	TCAAGGCTACAATGGAGCAAATGTTAAAGTAG CGGTTATCGA	535
	5'	P4974	P5433	TTTAACATTTGCTCCATTGTAGCCTTGAGAGT GCAGAG	536
S24G-N25G	3'	P4976	P5434	CTACACTGGAGGAGGTGTTAAAGTAGCGGTT ATCGACA	537
	5'	P4974	P5435	CTACTTTAACACCTCCTCCAGTGTAGCCTTGA GAGTG	538
S24R	3'	P4976	P5436	AGGCTACACTGGAAGAAATGTTAAAGTAGCG GTTATCGAC	539
	5'	P4974	P5437	CTTTAACATTTCTTCCAGTGTAGCCTTGAGAG TG	540
G23A-S24G-N25G	3'	P4976	P5438	AAGGCTACACTGCAGGAGGTGTTAAAGTAGC GGTTATCGACA	541
	5'	P4974	P5439	CTACTTTAACACCTCCTGCAGTGTAGCCTTGA GAGTGCAG	542
N61P-N62S	3'	P4976	P5440	CGTTTCAAGATCCCTCTTCTCATGGCACACAC GTCGC	543
	5'	P4974	P5441	TGTGCCATGAGAAGAGGGATCTTGAAACGGG TTTGTTCG	544
T55P	3'	P4976	P5442	TGCCGTCCGAACCAAACCCGTTTCAAGATAA CAATTCT	545

Tabela 11-8: Iniciadores usados para criar as variantes combinatórias RCL5					
Mutações introduzidas	Fragmentos do gene	Nomes dos iniciadores comuns que flanqueiam o gene em posição 3' e 5'	Nome do iniciador	Sequência do iniciador	SEQ ID n°
	5'	P4974	P5443	TCTTGAAACGGGTTTGGTTCGGACGGCACCA TAGAAG	546
N61P-S63H	3'	P4976	P5444	CCGTTTCAAGATCCCAATCATCATGGCACACA CGTCGCAG	547
	5'	P4974	P5445	TGTGTGCCATGATGATTGGGATCTTGAAACG GGTTTGTTTCG	548
Q59S-N61P	3'	P4976	P5446	ACAAACCCGTTTTTCAGATCCCAATTCTCATGG CACACACGTCGCA	549
	5'	P4974	P5447	CCATGAGAATTGGGATCTGAAAACGGGTTTG TTTCGGACGGCA	550
L75S-N76Y	3'	P4976	P5448	GGTTGCGGCGTCATACAATTCTATTGGCGTG CTTGGTG	551
	5'	P4974	P5449	GCCAATAGAATTGTATGACGCCGCAACCGTT CCTGCGA	552
P86S-S87G-A88V	3'	P4976	P5450	TGGTGTAGCCTCGGGTGTTTCGCTCTACGCC GTAAAGTT	553
	5'	P4974	P5451	CGTAGAGCGAAACACCCGAGGCTACACCAAG CACGCCAA	554
S87G-A88V-S89A	3'	P4976	P5452	GTGTAGCCCCGGGTGTTGCACTCTACGCCGT TAAAGTTCTTG	555
	5'	P4974	P5453	ACGGCGTAGAGTGCAACACCCGGGGCTACA CCAAGCACGCCAA	556

Tabela 11-8: Iniciadores usados para criar as variantes combinatórias RCL5					
Mutações introduzidas	Fragmentos do gene	Nomes dos iniciadores comuns que flanqueiam o gene em posição 3' e 5'	Nome do iniciador	Sequência do iniciador	SEQ ID nº
S87T-A88L-S89G	3'	P4976	P5454	TGGTGTAGCCCCGACTCTTGGACTCTACGCC GTAAAGTTCTTG	557
	5'	P4974	P5455	ACGGCGTAGAGTCCAAGAGTCGGGGCTACAC CAAGCACGCCAA	558
P129Q-S130G-G131S	3'	P4976	P5456	GCCTGGGAGCACAAGGCTCTAGTGCGGCACT TAAAGCAGCA	559
	5'	P4974	P5457	AGTGCCGCACTAGAGCCTTGTGCTCCCAGGC TCATGTTGAT	560
V203Y	3'	P4976	P5458	ATGGCCCCTGGCTATTCTATTCAATCGACGCT TCCAG	561
	5'	P4974	P5459	TCGATTGAATAGAATAGCCAGGGGCCATGAC ATCCA	562
G211R-N212S-K213V	3'	P4976	P5460	TCGACGCTTCCAAGGTCCGTGTATGGTGCGC AAAACGGGACT	563
	5'	P4974	P5461	TTGCGCACCATACACGGACCTTGGAAGCGTC GATTGAATAGAAA	564

[00527] Para criar cada mutante, duas reações de PCR foram executadas usando o iniciador comum que flanqueia o gene em posição 3' (P4976, CCTCTCGGTTATGAGTTAGTTC; SEQ ID nº 61) e o iniciador mutagênico, ou o iniciador comum que flanqueia o gene em posição 5' (P4974, GCCTCACATTTGTGCCACCTA; SEQ ID nº 60) e o iniciador mutagênico, conforme mostrado para cada biblioteca na tabela 11-8. Estas reações de PCR geraram dois fragmentos de PCR, um codificando a metade 5' do gene BPN' mutante (fragmento 5' do gene) e o outro codificando a metade 3' do gene de BPN' mutante (fragmento 3' do gene). Cada reação de amplificação por PCR continha 30 pmol de cada iniciador e 100 ng das moléculas originais mostradas na tabela 11-7. As amplificações foram executadas usando a Vent DNA polimerase (NEB). A reação de PCR (20 µL) foi inicialmente aquecida a 95°C durante 2,5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 15 seg., anelamento a 55°C durante 15 seg. e extensão a 72°C durante 40 seg. Após a amplificação, os fragmentos 5' e 3' do gene foram purificados em gel pelo kit de purificação de bandas em gel QIAGEN®, misturados (50 ng de cada fragmento) e amplificados por PCR novamente usando os iniciadores P4973 (AAAGGATCCTAATCGGCGCTTTTC; SEQ ID nº 62) e P4950 (CTTGTCTCCAAGCTTAAAATAAAA; SEQ ID nº 63) para gerar o fragmento do gene de extensão completa. As condições da PCR foram as mesmas descritas acima, com a exceção da fase de extensão, que foi executada a 72°C durante 2 minutos. O fragmento de DNA de extensão completa foi purificado em gel pelo kit de purificação de bandas em gel QIAGEN®, digerido pelas enzimas de restrição BamHI e HindIII e ligado com pHPLT-BPN' parcial opt que também foi digerido com as mesmas enzimas de restrição. As misturas de ligação foram amplificadas usando amplificação por círculo rolante pelo kit Illustra Templphi de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare)

para gerar DNA multimérico para a transformação em *Bacillus subtilis*. Para este propósito, 1 µl da mistura de ligação foi misturado com 5 µl do tampão de amostra, aquecido até 95°C durante 3 min e resfriado sobre gelo. A seguir, 5 µl do tampão de reação e 0,2 µl da enzima foram adicionados a cada tubo, seguido de incubação a 30°C durante 10 horas. Os produtos da amplificação por círculo rolante foram diluídos 100 vezes e usados para transformar células de *B. subtilis* ($\Delta aprE$, $\Delta nprE$, $amyE::xylRPxylAcomK-phleo$). Uma alíquota da mistura de transformação foi plaqueada sobre placas com meio LB contendo 1,6% de leite desnatado e 10 µg/mL de neomicina e incubadas de um dia para o outro a 37°C. Subsequentemente, as colônias com halos foram inoculadas em 120 µl de meio LB contendo 10 µg/mL de neomicina.

Bibliotecas combinatórias RCL 6

[00528] "RCL6" refere-se a um grupo de bibliotecas combinatórias criadas por fusão por PCR usando vários mutantes de BPN' como moléculas originais (molde). Uma mistura de mutantes de BPN' foi usada como molde (moléculas originais) na construção de cada uma destas bibliotecas. As cinco diferentes misturas de moléculas originais usadas para criar estas bibliotecas são fornecidas na tabela 11-9, e as mutações introduzidas em cada biblioteca são mostradas na tabela 11-10.

[00529] Para criar cada mutante, duas reações de PCR foram executadas usando o iniciador comum que flanqueia o gene em posição 3' (P4976, CCTCTCGGTTATGAGTTAGTTC; SEQ ID n° 61) e o iniciador mutagênico, ou o iniciador comum que flanqueia o gene em posição 5' (P4974, GCCTCACATTTGTGCCACCTA; SEQ ID n° 60) e o iniciador mutagênico, conforme mostrado para cada biblioteca na tabela 11-10. Estas reações de PCR geraram dois fragmentos de PCR, um codificando a metade 5' do gene BPN' mutante (fragmento 5'

do gene) e o outro codificando a metade 3' do gene de BPN' mutante (fragmento 3' do gene). Cada reação de amplificação por PCR continha 30 pmol de cada iniciador e 100 ng das moléculas originais mostradas na tabela 11-9. As amplificações foram executadas usando a Vent DNA polimerase (NEB). A reação de PCR (20 µL) foi inicialmente aquecida a 95°C durante 2,5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 15 seg., anelamento a 55°C durante 15 seg. e extensão a 72°C durante 40 seg. Após a amplificação, os fragmentos 5' e 3' do gene foram purificados em gel pelo kit de purificação de bandas em gel QIAGEN®, misturados (50 ng de cada fragmento) e amplificados por PCR novamente usando os iniciadores P4973 (AAAGGATCCTAATCGGCGCTTTTC; SEQ ID n° 62) e P4950 (CTTGTCTCCAAGCTTAAAATAAAA; SEQ ID n° 63) para gerar o fragmento do gene de extensão completa. As condições da PCR foram as mesmas descritas acima, com a exceção da fase de extensão, que foi executada a 72°C durante 2 minutos. O fragmento de DNA de extensão completa foi purificado em gel pelo kit de purificação de bandas em gel QIAGEN®, digerido usando as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III e ligado com o vetor pHPLT-BPN' parcial opt que também foi digerido com as mesmas enzimas de restrição. As misturas de ligação foram amplificadas usando amplificação por círculo rolante pelo kit Illustra Templiphi de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare) para gerar DNA multimérico para a transformação em *Bacillus subtilis*. Para este propósito, 1 µl da mistura de ligação foi misturado com 5 µl do tampão de amostra, aquecido até 95°C durante 3 min e resfriado sobre gelo. A seguir, 5 µl do tampão de reação e 0,2 µl da enzima foram adicionados a cada tubo, seguido de incubação a 30°C durante 10 horas. Os produtos da amplificação por círculo rolante foram diluídos 100 vezes e usados para transformar células de *B. subtilis* (Δ aprE, Δ nprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo). Uma alíquota da

mistura de transformação foi plaqueada sobre placas com meio LB contendo 1,6% de leite desnatado e 10 µg/mL de neomicina e incubadas de um dia para o outro a 37°C. Subsequentemente, as colônias com halos foram inoculadas em 120 µl de meio LB contendo 10 µg/mL de neomicina.

Tabela 11-9: Moléculas originais de BPN' usadas para criar as bibliotecas RCL6				
Misturas de moléculas originais				
Mistura 1	Mistura 2	Mistura 3	Mistura 4	Mistura 5
G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G	G97A-G128A-Y217Q-T55P	G97A-G128A-Y217Q-L75S-N76Y	G97A-G128A-Y217Q-P86S-S87G-A88V	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S
G97A-G128A-Y217Q-S24R	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H		G97A-G128A-Y217Q-S87G-A88V-S89A	
G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G	G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P		G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G	

Tabela 11-10: Mutações introduzidas nas bibliotecas RCL6

Mutações introduzidas	Fragmento do gene	Nomes do iniciador comum que flanqueia o gene em posição 5' e 3'	Nome do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID nº
V68C, A69G	3'	P4976	P5462	CATGGCACACACTGCGGAGGA ACGTTGCGGCGTTAAAC	565
	5'	P4974	P5463	GCAACCGTTTCCTCCGCAGTGT GTGCCATGAGAATTGTTA	566
V72I, A73G, delA74, L75S	3'	P4976	P5464	GTCGCAGGAACGATTGGTTCA AACAATTCTATTGGCGTGCTTG	567
	5'	P4974	P5465	CAATAGAATTGTTTGAACCAAT CGTTCCTGCGACGTGTGTGCC AT	568
L75H, N76G	3'	P4976	P5466	AACGGTTGCGGCGCATGGAAA TTCTATTGGCGTGCTTGGTG	569
	5'	P4974	P5467	CAATAGAATTTCCATGCGCCGC AACCGTTCCTGCGACGTGT	570
L75R, N76G, N77S	3'	P4976	P5468	AACGGTTGCGGCGAGAGGAGG TTCTATTGGCGTGCTTGGTGTA	571
	5'	P4974	P5469	CACGCCAATAGAACCTCCTCTC GCCGCAACCGTTCCTGCGACG TGT	572

Tabela 11-10: Mutações introduzidas nas bibliotecas RCL6

Mutações introduzidas	Fragmento do gene	Nomes do iniciador comum que flanqueia o gene em posição 5' e 3'	Nome do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID nº
L75G, N76G, N77G	3'	P4976	P5470	AACGGTTGCGGCGGGAGGCG GTTCTATTGGCGTGCTTGGTGT A	573
	5'	P4974	P5471	CACGCCAATAGAACCGCCTCC CGCCGCAACCGTTCCTGCGAC GTGT	574
A92G	3'	P4976	P5472	TGCTTCGCTCTACGGCGTTAAA GTTCTTGACAGCAGAC	575
	5'	P4974	P5473	CAAGAACTTTAACGCCGTAGAG CGAAGCAGACGGGGCTA	576
delV93, K94S, V95C, L96S	3'	P4976	P5474	TTCGCTCTACGCCTCATGTTCT GCAGCAGACGGATCAGGCCAA	577
	5'	P4974	P5475	ATCCGTCTGCTGCAGAACATGA GGCGTAGAGCGAAGCAGACG	578
V121I_I122S_N123C	3'	P4976	P5476	AATAACATGGATATATCTTGCA TGAGCCTGGGAGCACCAAG	579
	5'	P4974	P5477	CAGGCTCATGCAAGATATATCC ATGTTATTTCGCGATGGCCATT	580

Tabela 11-10: Mutações introduzidas nas bibliotecas RCL6

Mutações introduzidas	Fragmento do gene	Nomes do iniciador comum que flanqueia o gene em posição 5' e 3'	Nome do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID nº
V121L_N123C	3'	P4976	P5478	CGAATAACATGGATCTTATCTG CATGAGCCTGGGAGCACCAAG	581
	5'	P4974	P5479	CCAGGCTCATGCAGATAAGAT CCATGTTATTCGCGATGGCCCA TT	582
I122C_N123S _M124L	3'	P4976	P5480	TAACATGGATGTATGCTCATTG AGCCTGGGAGCACCAAGCGGC A	583
	5'	P4974	P5481	TGCTCCCAGGCTCAATGAGCA TACATCCATGTTATTCGCGATG	584
N123C	3'	P4976	P5482	ACATGGATGTAATCTGCATGAG CCTGGGAGCACCAAG	585
	5'	P4974	P5483	TCCCAGGCTCATGCAGATTACA TCCATGTTATTCGCGAT	586
M124I	3'	P4976	P5484	GGATGTAATCAACATCAGCCTG GGAGCACCAAGCGGCA	587
	5'	P4974	P5485	TGCTCCCAGGCTGATGTTGATT ACATCCATGTTATTCG	588

Tabela 11-10: Mutações introduzidas nas bibliotecas RCL6

Mutações introduzidas	Fragmento do gene	Nomes do iniciador comum que flanqueia o gene em posição 5' e 3'	Nome do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID nº
M124V	3'	P4976	P5486	GGATGTAATCAACGTAAGCCTG GGAGCACCAAGCGGCA	589
	5'	P4974	P5487	TGCTCCCAGGCTTACGTTGATT ACATCCATGTTATTCG	590
M124V-L126A	3'	P4976	P5488	GGATGTAATCAACGTAAGCGC GGGAGCACCAAGCGGCAGTG	591
	5'	P4974	P5489	TTGGTGCTCCCGCGCTTACGTT GATTACATCCATGTTATTCG	592
L126F, delP129	3'	P4976	P5490	AATCAACATGAGCTTCGGAGCA AGCGGCAGTGCGGCACTTAA	593
	5'	P4974	P5491	CACTGCCGCTTGCTCCGAAGC TCATGTTGATTACATCCATGT	594
G127Y	3'	P4976	P5492	AACATGAGCCTGTACGCACCA AGCGGCAGTGCGGCACTTA	595
	5'	P4974	P5493	CACTGCCGCTTGGTGCGTACA GGCTCATGTTGATTACATCC	596

Tabela 11-10: Mutações introduzidas nas bibliotecas RCL6

Mutações introduzidas	Fragmento do gene	Nomes do iniciador comum que flanqueia o gene em posição 5' e 3'	Nome do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
G127S_P129 D	3'	P4976	P5494	CAACATGAGCCTGTCAGCAGA TAGCGGCAGTGCGGCACTTAA A	597
	5'	P4974	P5495	GCACTGCCGCTATCTGCTGAC AGGCTCATGTTGATTACATCC	598
G127N, P129R	3'	P4976	P5496	CAACATGAGCCTGAACGCACG TAGCGGCAGTGCGGCACTTAA A	599
	5'	P4974	P5497	GCACTGCCGCTACGTGCGTTC AGGCTCATGTTGATTACATCC	600
G128N, insS, P129S	3'	P4976	P5498	ATGAGCCTGGGAAATTCATCTA GCGGCAGTGCGGCACTTAAA	601
	5'	P4974	P5499	GCACTGCCGCTAGATGAATTTTC CCAGGCTCATGTTGATTAC	602
G128S_P129 V	3'	P4976	P5500	CATGAGCCTGGGATCAGTTAG CGGCAGTGCGGCACTTAAA	603
	5'	P4974	P5501	GCACTGCCGCTAACTGATCCC AGGCTCATGTTGATTAC	604

Tabela 11-10: Mutações introduzidas nas bibliotecas RCL6

Mutações introduzidas	Fragmento do gene	Nomes do iniciador comum que flanqueia o gene em posição 5' e 3'	Nome do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID nº
G128S, P129D	3'	P4976	P5502	CATGAGCCTGGGATCAGATAG CGGCAGTGCGGCACTTAAA	605
	5'	P4974	P5503	GCACTGCCGCTATCTGATCCC AGGCTCATGTTGATTAC	606
G128S, P129G	3'	P4976	P5504	CATGAGCCTGGGATCAGGTAG CGGCAGTGCGGCACTTAAA	607
	5'	P4974	P5505	GCACTGCCGCTACCTGATCCC AGGCTCATGTTGATTAC	608
H128H, P129Y	3'	P4976	P5506	CATGAGCCTGGGACACTATAG CGGCAGTGCGGCACTTAAA	609
	5'	P4974	P5507	GCACTGCCGCTATAGTGTCCC AGGCTCATGTTGATTAC	610
P129D	3'	P4976	P5508	GAGCCTGGGAGCAGACAGCG GCAGTGCGGCACTTAA	611
	5'	P4974	P5509	TGCCGCACTGCCGCTGTCTGC TCCCAGGCTCATGTTGAT	612

Tabela 11-10: Mutações introduzidas nas bibliotecas RCL6

Mutações introduzidas	Fragmento do gene	Nomes do iniciador comum que flanqueia o gene em posição 5' e 3'	Nome do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID nº
P129E	3'	P4976	P5510	GAGCCTGGGAGCAGAAAGCGG CAGTGCGGCACTTAA	613
	5'	P4974	P5511	TGCCGCACTGCCGCTTTCTGC TCCCAGGCTCATGTTGAT	614
P129V	3'	P4976	P5512	GAGCCTGGGAGCAGTAAGCGG CAGTGCGGCACTTAA	615
	5'	P4974	P5513	TGCCGCACTGCCGCTTACTGC TCCCAGGCTCATGTTGAT	616
P129G, delS130	3'	P4976	P5514	GAGCCTGGGAGCAGGAGGCA GTGCGGCACTTAAAGC	617
	5'	P4974	P5515	AGTGCCGCACTGCCTCCTGCT CCCAGGCTCATGTTGAT	618
P129H, delS130, S132N	3'	P4976	P5516	AGCCTGGGAGCACACGGCAAT GCGGCACTTAAAGCAGCAGTT	619
	5'	P4974	P5517	TTTAAGTGCCGCATTGCCGTGT GCTCCCAGGCTCATGTTGAT	620

Tabela 11-10: Mutações introduzidas nas bibliotecas RCL6

Mutações introduzidas	Fragmento do gene	Nomes do iniciador comum que flanqueia o gene em posição 5' e 3'	Nome do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID nº
A134T	3'	P4976	P5518	AAGCGGCAGTGCGACACTTAA AGCAGCAGTTGATAAAG	621
	5'	P4974	P5519	AACTGCTGCTTTAAGTGTGCGCA CTGCCGCTTGGTGCTC	622
G97R, insG, A98C	3'	P4976	P5520	GTAAAGTTCTTCGTGGTTGTG ACGGATCAGGCCAATACTC	623
	5'	P4974	P5521	CTGATCCGTCACAACCACGAA GAACTTTAACGGCGTAGAGC	624
A98G, D99G	3'	P4976	P5522	TTAAAGTTCTTGCAGGAGGCG GATCAGGCCAATACTCATG	625
	5'	P4974	P5523	TATTGGCCTGATCCGCCTCCTG CAAGAACTTTAACGGCGTAG	626
A98G, insR	3'	P4976	P5524	TTAAAGTTCTTGCAGGACGTGA CGGATCAGGCCAATACTCA	627
	5'	P4974	P5525	CTGATCCGTCACGTCCTGCAA GAACTTTAACGGCGTAG	628

Tabela 11-10: Mutações introduzidas nas bibliotecas RCL6

Mutações introduzidas	Fragmento do gene	Nomes do iniciador comum que flanqueia o gene em posição 5' e 3'	Nome do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID nº
A98D, D99G	3'	P4976	P5526	TTAAAGTTCTTGCAGACGGCG GATCAGGCCAATACTCATG	629
	5'	P4974	P5527	TATTGGCCTGATCCGCCGTCT GCAAGAACTTTAACGGCGTAG	630
A98H, D99G, G100D	3'	P4976	P5528	TAAAGTTCTTGCACATGGAGAT TCAGGCCAATACTCATGGATTA T	631
	5'	P4974	P5529	AGTATTGGCCTGAATCTCCATG TGCAAGAACTTTAACGGCGTAG	632
D99R, insN	3'	P4976	P5530	AAGTTCTTGCAGCACGTAACG GATCAGGCCAATACTCATG	633
	5'	P4974	P5531	TATTGGCCTGATCCGTTACGTG CTGCAAGAACTTTAACGGCGTA	634
D99V, S101D	3'	P4976	P5532	AGTTCTTGCAGCAGTAGGAGAT GGCCAATACTCATGGATTATCA A	635

Tabela 11-10: Mutações introduzidas nas bibliotecas RCL6

Mutações introduzidas	Fragmento do gene	Nomes do iniciador comum que flanqueia o gene em posição 5' e 3'	Nome do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID nº
	5'	P4974	P5533	TGAGTATTGGCCATCTCCTACT GCTGCAAGAACTTTAACGGCG TA	636
D99C, insS	3'	P4976	P5534	TTAAAGTTCTTGCAGCATGTAG CGGATCAGGCCAATACTCATG	637
	5'	P4974	P5535	TATTGGCCTGATCCGCTACATG CTGCAAGAACTTTAACGGCGTA	638
G100S	3'	P4976	P5536	AAGTTCTTGCAGCAGACTCTTC AGGCCAATACTCATGGATTAT	639
	5'	P4974	P5537	ATGAGTATTGGCCTGAAGAGTC TGCTGCAAGAACTTTAACG	640
G100S, S101V	3'	P4976	P5538	TTCTTGCAGCAGACTCTGTAGG CCAATACTCATGGATTATCA	641
	5'	P4974	P5539	CATGAGTATTGGCCTACAGAGT CTGCTGCAAGAACTTTAACG	642
G100D	3'	P4976	P5540	AAGTTCTTGCAGCAGACGATTC AGGCCAATACTCATGGATTAT	643

Tabela 11-10: Mutações introduzidas nas bibliotecas RCL6

Mutações introduzidas	Fragmento do gene	Nomes do iniciador comum que flanqueia o gene em posição 5' e 3'	Nome do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID nº
	5'	P4974	P5541	ATGAGTATTGGCCTGAATCGTC TGCTGCAAGAACTTTAACG	644
G100N	3'	P4976	P5542	AAGTTCTTGCAGCAGACAATTC AGGCCAATACTCATGGATTAT	645
	5'	P4974	P5543	ATGAGTATTGGCCTGAATTGTC TGCTGCAAGAACTTTAACG	646
S100N, S101L	3'	P4976	P5544	TTCTTGCAGCAGACAATCTAGG CCAATACTCATGGATTATCA	647
	5'	P4974	P5545	CATGAGTATTGGCCTAGATTGT CTGCTGCAAGAACTTTAACG	648
S101G	3'	P4976	P5546	TTCTTGCAGCAGACGGAGGAG GCCAATACTCATGGATTATCAA	649
	5'	P4974	P5547	ATGAGTATTGGCCTCCTCCGTC TGCTGCAAGAACTTTA	650
S101D	3'	P4976	P5548	TTCTTGCAGCAGACGGAGATG GCCAATACTCATGGATTATCAA	651

Tabela 11-10: Mutações introduzidas nas bibliotecas RCL6					
Mutações introduzidas	Fragmento do gene	Nomes do iniciador comum que flanqueia o gene em posição 5' e 3'	Nome do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID nº
	5'	P4974	P5549	ATGAGTATTGGCCATCTCCGTC TGCTGCAAGAACTTTA	652
S101V, Q103N	3'	P4976	P5550	TGCAGCAGACGGAGTAGGCAA CTACTCATGGATTATCAACGGC AT	653
	5'	P4974	P5551	ATAATCCATGAGTAGTTGCCTA CTCCGTCTGCTGCAAGAACTTT A	654
S101E	3'	P4976	P5552	TTCTTGCAGCAGACGGACGTG GCCAATACTCATGGATTATCAA	655
	5'	P4974	P5553	ATGAGTATTGGCCACGTCCGT CTGCTGCAAGAACTTTA	656
A116S, N117G, N118R	3'	P4976	P5554	AATGGGCCATCTCTGGTAGAAT GGATGTAATCAACATGAGCCT	657
	5'	P4974	P5555	GATTACATCCATTCTACCAGAG ATGGCCCATTCGATGCCGTT	658

Tabela 11-10: Mutações introduzidas nas bibliotecas RCL6					
Mutações introduzidas	Fragmento do gene	Nomes do iniciador comum que flanqueia o gene em posição 5' e 3'	Nome do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID nº
A116G, N117R	3'	P4976	P5556	AATGGGCCATCGGACGTAACA TGGATGTAATCAACATGAG	659
	5'	P4974	P5557	GATTACATCCATGTTACGTCCG ATGGCCCATTTCGATGCCGTT	660
A116N, N117S, N118G	3'	P4976	P5558	AATGGGCCATCAATTCTGGAAT GGATGTAATCAACATGAGCCT	661
	5'	P4974	P5559	GATTACATCCATTCCAGAATTG ATGGCCCATTTCGATGCCGTT	662
M222Q	3'	P4976	P5560	AAAACGGGACTTCCCAGGCCT CGCCGCATGTAGCTG	663
	5'	P4974	P5561	TACATGCGGCGAGGCCTGGGA AGTCCCGTTTTGCGCAC	664
S24R	3'	P4976	P5562	AAGGCTACACTGGAAGAAATGT TAAAGTAGCGGTTATCGA	665
	5'	P4974	P5563	CTACTTTAACATTTCTTCCAGT GTAGCCTTGAGAGTG	666

Tabela 11-10: Mutações introduzidas nas bibliotecas RCL6

Mutações introduzidas	Fragmento do gene	Nomes do iniciador comum que flanqueia o gene em posição 5' e 3'	Nome do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID nº
N25Y	3'	P4976	P5564	CTACACTGGATCATATGTTAAA GTAGCGGTTATCGACA	667
	5'	P4974	P5565	TAACCGCTACTTTAACATATGA TCCAGTGTAGCCTTGAGA	668
P52D	3'	P4976	P5566	CTTCTATGGTGGATTCCGAAAC AAACCCGTTTCAAG	669
	5'	P4974	P5567	GGTTTGTTTCGGAATCCACCAT AGAAGCCCCTCCAG	670
S63T	3'	P4976	P5568	TTTCAAGATAACAATACACATG GCACACACGTCGCAGGA	671
	5'	P4974	P5569	TGTGTGCCATGTGTATTGTTAT CTTGAAACGGGTTTGT	672
N61E	3'	P4976	P5570	GTTTCAAGATGAAAATTCTCAT GGCACACACGTC	673
	5'	P4974	P5571	TGTGCCATGAGAATTTTCATCT TGAAACGGGTTTGTTCG	674

Tabela 11-10: Mutações introduzidas nas bibliotecas RCL6

Mutações introduzidas	Fragmento do gene	Nomes do iniciador comum que flanqueia o gene em posição 5' e 3'	Nome do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID nº
N61P	3'	P4976	P5572	AACCCGTTTCAAGATCCAAATT CTCATGGCACACACGTC	675
	5'	P4974	P5573	TGCCATGAGAATTTGGATCTTG AAACGGGTTTGTTCG	676
N62Q	3'	P4976	P5574	GTTTCAAGATAACCAATCTCAT GGCACACACGTCGCAGGAA	677
	5'	P4974	P5575	TGTGTGCCATGAGATTGGTTAT CTTGAAACGGGTTTGTTT	678
N62D	3'	P4976	P5576	GTTTCAAGATAACGATTCTCAT GGCACACACGTCGCAGGAA	679
	5'	P4974	P5577	TGTGTGCCATGAGAATCGTTAT CTTGAAACGGGTTTGTTT	680
S63Q	3'	P4976	P5578	TCAAGATAACAATCAACATGGC ACACACGTCGCAGG	681
	5'	P4974	P5579	ACGTGTGTGCCATGTTGATTGT TATCTTGAAACGGGTTTG	682

Tabela 11-10: Mutações introduzidas nas bibliotecas RCL6

Mutações introduzidas	Fragmento do gene	Nomes do iniciador comum que flanqueia o gene em posição 5' e 3'	Nome do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID nº
V68A	3'	P4976	P5580	TCATGGCACACACGCAGCAGG AACGGTTGCGGCGTTAA	683
	5'	P4974	P5581	CAACCGTTCCTGCTGCGTGTG TGCCATGAGAATTGTTA	684
S87D	3'	P4976	P5582	TGTAGCCCCGGATGCTTCGCT CTACGCCGTTAA	685
	5'	P4974	P5583	CGTAGAGCGAAGCATCCGGGG CTACACCAAGCACG	686
L96T	3'	P4976	P5584	CGTTAAAGTTACAGCAGCAGAC GGATCAGGCCAATA	687
	5'	P4974	P5585	TGATCCGTCTGCTGCTGTA ACT TTAACGGCGTAGAGCGAA	688
L126A	3'	P4976	P5586	TAATCAACATGAGCGCGGGAG CACCAAGCGGCAGTG	689
	5'	P4974	P5587	TTGGTGCTCCCGCGCTCATGTT GATTACATCCATG	690

Tabela 11-10: Mutações introduzidas nas bibliotecas RCL6

Mutações introduzidas	Fragmento do gene	Nomes do iniciador comum que flanqueia o gene em posição 5' e 3'	Nome do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID nº
L126T	3'	P4976	P5588	TAATCAACATGAGCACGGGAG CACCAAGCGGCAGTG	691
	5'	P4974	P5589	TTGGTGCTCCCGTGCTCATGTT GATTACATCCATG	692
S125A	3'	P4976	P5590	ATGTAATCAACATGGCACTGGG AGCACCAAGCGGCAGT	693
	5'	P4974	P5591	TTGGTGCTCCCAAGTGCCATGTT GATTACATCCATGTTATT	694
S130P	3'	P4976	P5592	TGGGAGCACCAAGGCAGTG CGGCACTTAAAGC	695
	5'	P4974	P5593	GTGCCGCACTGCCTGGTGGTG CTCCCAGGCTCATGT	696
P129L	3'	P4976	P5594	TGAGCCTGGGAGCACTTAGCG GCAGTGCGGCACTTAA	697
	5'	P4974	P5595	TGCCGCACTGCCGCTAAGTGC TCCCAGGCTCATGTTGAT	698

Tabela 11-10: Mutações introduzidas nas bibliotecas RCL6

Mutações introduzidas	Fragmento do gene	Nomes do iniciador comum que flanqueia o gene em posição 5' e 3'	Nome do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID nº
P129E	3'	P4976	P5596	TGAGCCTGGGAGCAGAAAGCG GCAGTGCGGCACTTAA	699
	5'	P4974	P5597	TGCCGCACTGCCGCTTTCTGC TCCCAGGCTCATGTTGAT	700
P129S	3'	P4976	P5598	TGAGCCTGGGAGCATCTAGCG GCAGTGCGGCACTTAA	701
	5'	P4974	P5599	TGCCGCACTGCCGCTAGATGC TCCCAGGCTCATGTTGAT	702
P40E	3'	P4976	P5600	GACTCGAGCCATGAAGATCTTA AAGTCGCTGGAGG	703
	5'	P4974	P5601	GACTTTAAGATCTTCATGGCTC GAGTCGATAACCGCT	704
Y6Q	3'	P4976	P5602	GCAGTCCGTGCCTCAAGGCGT ATCACAAATTAAAGCCCCT	705
	5'	P4974	P5603	ATTTGTGATACGCCTTGAGGCA CGGACTGCGCGTACGCAT	706

Tabela 11-10: Mutações introduzidas nas bibliotecas RCL6

Mutações introduzidas	Fragmento do gene	Nomes do iniciador comum que flanqueia o gene em posição 5' e 3'	Nome do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID nº
G102A	3'	P4976	P5604	CAGACGGATCAGCACAATACT CATGGATTATCAACGGCAT	707
	5'	P4974	P5605	TAATCCATGAGTATTGTGCTGA TCCGTCTGCTGCAAGAAC	708
S101N	3'	P4976	P5606	GCAGCAGACGGAAACGGCCAA TACTCATGGATTATCAA	709
	5'	P4974	P5607	CATGAGTATTGGCCGTTTCCGT CTGCTGCAAGAACTTTA	710
G100E	3'	P4976	P5608	TTCTTGCAGCAGACGAATCAG GCCAATACTCATGGATTAT	711
	5'	P4974	P5609	TGAGTATTGGCCTGATTCGTCT GCTGCAAGAACTTTAACG	712
I115V	3'	P4976	P5610	ATCGAATGGGCCGTAGCGAAT AACATGGATGTAATCAA	713
	5'	P4974	P5611	CATCCATGTTATTCGCTACGGC CCATTCGATGCCGTTGAT	714

Tabela 11-10: Mutações introduzidas nas bibliotecas RCL6

Mutações introduzidas	Fragmento do gene	Nomes do iniciador comum que flanqueia o gene em posição 5' e 3'	Nome do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID nº
A144K	3'	P4976	P5612	GTTGATAAAGCTGTTAAATCTG GTGTCGTCGTAGTAGC	715
	5'	P4974	P5613	GACGACACCAGATTTAACAGCT TTATCAACTGCTGCTT	716
S145D	3'	P4976	P5614	GATAAAGCTGTTGCAGATGGT GTCGTCGTAGTAGCGGCA	717
	5'	P4974	P5615	TACTACGACGACACCATCTGCA ACAGCTTTATCAACTGCT	718
S159K	3'	P4976	P5616	AATGAGGGAACAAAAGGATCAT CGAGTACCGTCGGTTA	719
	5'	P4974	P5617	ACGGTACTCGATGATCCTTTTG TTCCCTCATTCCCAGCTG	720
S162K	3'	P4976	P5618	AACATCCGGATCAAAAAGTACC GTCGGTTATCCAGGCAA	721
	5'	P4974	P5619	ATAACCGACGGTACTTTTTGAT CCGGATGTTCCCTCATT	722

Tabela 11-10: Mutações introduzidas nas bibliotecas RCL6

Mutações introduzidas	Fragmento do gene	Nomes do iniciador comum que flanqueia o gene em posição 5' e 3'	Nome do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID nº
V147P	3'	P4976	P5620	TGTTGCATCTGGTCCAGTCGTA GTAGCGGCAGCTGGGAAT	723
	5'	P4974	P5621	TGCCGCTACTACGACTGGACC AGATGCAACAGCTTTATCA	724
S161P	3'	P4976	P5622	AGGGAACATCCGGACCATCGA GTACCGTCGGTTATCCA	725
	5'	P4974	P5623	ACCGACGGTACTCGATGGTCC GGATGTTCCCTCATTCCCA	726
A187D	3'	P4976	P5624	CTTCAAATCAACGTGACTCTTT TTCCTCCGTGGGACCGGA	727
	5'	P4974	P5625	ACGGAGGAAAAAGAGTCACGT TGATTTGAAGAGTCTACAG	728
F189D	3'	P4976	P5626	TCAACGTGCCTCTGATTCCTCC GTGGGACCGGAGCTGGAT	729
	5'	P4974	P5627	TCCCACGGAGGAATCAGAGGC ACGTTGATTTGAAGAG	730

Tabela 11-10: Mutações introduzidas nas bibliotecas RCL6

Mutações introduzidas	Fragmento do gene	Nomes do iniciador comum que flanqueia o gene em posição 5' e 3'	Nome do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID nº
L267V	3'	P4976	P5628	TACTATGGAAAAGGGGTAATCA ACGTACAGGCGGCAGC	731
	5'	P4974	P5629	CTGTACGTTGATTACCCCTTTT CCATAGTAGAAAGAAT	732
Q206E	3'	P4976	P5630	TGGCGTTTCTATTGAATCGACG CTTCCAGGGAACAA	733
	5'	P4974	P5631	CTGGAAGCGTCGATTCAATAGA AACGCCAGGGGCCAT	734
K213T	3'	P4976	P5632	CTTCCAGGGAACACATATGGT GCGCAAACGGGACT	735
	5'	P4974	P5633	GTTTTGCGCACCATATGTGTTC CCTGGAAGCGTCGATT	736
K213L	3'	P4976	P5634	CTTCCAGGGAACCTTTATGGTG CGCAAACGGGACT	737
	5'	P4974	P5635	GTTTTGCGCACCATAAAGGTTC CCTGGAAGCGTCGATT	738

Tabela 11-10: Mutações introduzidas nas bibliotecas RCL6

Mutações introduzidas	Fragmento do gene	Nomes do iniciador comum que flanqueia o gene em posição 5' e 3'	Nome do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID n°
K265N	3'	P4976	P5636	TTTCTACTATGGAAACGGGCTG ATCAACGTACAGGCGGCA	739
	5'	P4974	P5637	ACGTTGATCAGCCCGTTTCCAT AGTAGAAAGAATCACCAA	740
N240K	3'	P4976	P5638	TTTCTAAGCACCCGAAATGGAC AAACACTCAAGTCCGCA	741
	5'	P4974	P5639	GAGTGTTTGTCCATTTCTGGGTG CTTAGAAAGAATCAAT	742
P239R	3'	P4976	P5640	TTCTTTCTAAGCACCGTAACTG GACAAACACTCAAGTCC	743
	5'	P4974	P5641	TGTTTGTCCAGTTACGGTGCTT AGAAAGAATCAATGCG	744
T242R	3'	P4976	P5642	CACCCGAACTGGCGTAACACT CAAGTCCGCAGCAGT	745
	5'	P4974	P5643	TGCGGACTTGAGTGTTACGCC AGTTCGGGTGCTTAGAAAG	746

Tabela 11-10: Mutações introduzidas nas bibliotecas RCL6

Mutações introduzidas	Fragmento do gene	Nomes do iniciador comum que flanqueia o gene em posição 5' e 3'	Nome do iniciador mutagênico	Sequência do iniciador mutagênico	SEQ ID nº
S89Y	3'	P4976	P5644	CGTCTGCTTACCTCTACGCCGT TAAAGTTCTTG	747
	5'	P4974	P5645	ACTTTAACGGCGTAGAGGTAA GCAGACGGGGCTACACCAA	748
P129Q	3'	P4976	P5646	AGCCTGGGAGCACAAAGCGGC AGTGCGGCACTTAAA	749
	5'	P4974	P5647	CACTGCCGCTTTGTGCTCCCA GGCTCATGTTGAT	750
G211T	3'	P4976	P5648	TTCAATCGACGCTTCCAACGAA CAAGTATGGTGCGCAAAAC	751
	5'	P4974	P5649	CACCATACTTGTTTCGTTGGAAG CGTCGATTGAATAGAAA	752
I111V	3'	P4976	P5650	TGGATTATCAACGGCGTAGAAT GGGCCATCGCGAATAAC	753
	5'	P4974	P5651	CGATGGCCCATTCTACGCCGT TGATAATCCATGAGTATT	754

Variantes combinatórias RCL 7

[00530] "RCL7" refere-se a um conjunto de variantes combinatórias criadas por fusão por PCR usando vários mutantes de BPN' como plasmídeo original (molde). As mutações introduzidas em cada plasmídeo original estão mostradas na tabela 11-11, e os iniciadores mutagênicos usados para criar os mutantes estão descritos na tabela 11-10.

[00531] Para criar cada mutante, duas reações de PCR foram executadas usando o iniciador comum que flanqueia o gene em posição 3' (P4976, CCTCTCGGTTATGAGTTAGTTC; SEQ ID n° 61) e o iniciador mutagênico, ou o iniciador comum que flanqueia o gene em posição 5' (P4974, GCCTCACATTTGTGCCACCTA; SEQ ID n° 60) e o iniciador mutagênico, conforme mostrado para cada biblioteca na tabela 11-10. Estas reações de PCR geraram dois fragmentos de PCR, um codificando a metade 5' do gene BPN' mutante (fragmento 5' do gene) e o outro codificando a metade 3' do gene de BPN' mutante (fragmento 3' do gene). Cada reação de amplificação por PCR continha 30 pmol de cada iniciador e 100 ng das moléculas originais mostradas na tabela 11-11. As amplificações foram executadas usando a Vent DNA polimerase (NEB). A reação de PCR (20 µL) foi inicialmente aquecida a 95°C durante 2,5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 15 seg., anelamento a 55°C durante 15 seg. e extensão a 72°C durante 40 seg. Após a amplificação, os fragmentos 5' e 3' do gene foram purificados em gel pelo kit de purificação de bandas em gel QIAGEN®, misturados (50 ng de cada fragmento) e amplificados por PCR novamente usando os iniciadores P4973 (AAAGGATCCTAATCGGCGCTTTTC; SEQ ID n° 62) e P4950 (CTTGTCTCCAAGCTTAAATAAAA; SEQ ID n° 63) para gerar o fragmento do gene de extensão completa. As condições da PCR foram as mesmas descritas acima, com a exceção da fase de extensão, que

foi executada a 72°C durante 2 minutos. O fragmento de DNA de extensão completa foi purificado em gel usando um kit de purificação de bandas em gel QIAGEN®, digerido pelas enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III e ligado com pHPLT-BPN' parcial opt que também foi digerido com as mesmas enzimas de restrição. As misturas de ligação foram amplificadas usando amplificação por círculo rolante pelo kit Illustra Templiphi de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare) para gerar DNA multimérico para a transformação em *Bacillus subtilis*. Para este propósito, 1 µl da mistura de ligação foi misturado com 5 µl do tampão de amostra, aquecido até 95°C durante 3 min e resfriado sobre gelo. A seguir, 5 µl do tampão de reação e 0,2 µl da enzima foram adicionados a cada tubo, seguido de incubação a 30°C durante 10 horas. Os produtos da amplificação por círculo rolante foram diluídos 100 vezes e usados para transformar células de *B. subtilis* (Δ aprE, Δ nprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo). Uma alíquota da mistura de transformação foi plaqueada sobre placas com meio LB contendo 1,6% de leite desnatado e 10 µg/mL de neomicina e incubadas de um dia para o outro a 37°C. Subsequentemente, as colônias com halos foram inoculadas em 120 µl de meio LB contendo 10 µg/mL de neomicina.

Tabela 11-11: Lista de plasmídios originais e mutações introduzidas nas variantes de RCL7		
N° da variante combinatória	Plasmídio original	Mutação(ões) introduzida(s)
1	G97A-G128A-Y217Q-T55P	S24R
2	G97A-G128A-Y217Q-N61E	S24R
3	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H	S24R
4	G97A-G128A-Y217Q-L75S-N76Y	S24R
5	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G	S24R
6	G97A-G128A-Y217Q-S89Y	S24R
7	G97A-G128A-Y217Q-I111V	S24R
8	G97A-G128A-Y217Q-I115V	S24R

Tabela 11-11: Lista de plasmídios originais e mutações introduzidas nas variantes de RCL7		
N° da variante combinatória	Plasmídio original	Mutação(ões) introduzida(s)
9	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S	S24R
10	G97A-G128A-Y217Q-P129Q	S24R
11	G97A-G128A-Y217Q-A134T	S24R
12	G97A-G128A-Y217Q-A144K	S24R
13	G97A-G128A-Y217Q-S145D	S24R
14	G97A-G128A-Y217Q-S159K	S24R
15	G97A-G128A-Y217Q-S162K	S24R
16	G97A-G128A-Y217Q-S161P-S78N	S24R
17	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	S24R
18	G97A-G128A-Y217Q-G211T-S78N	S24R
19	G97A-G128A-Y217Q-K213T	S24R
20	G97A-G128A-Y217Q-P239R	S24R
21	G97A-G128A-Y217Q-N240K	S24R
22	G97A-G128A-Y217Q-L267V-S78N	S24R
23	G97A-G128A-Y217Q-A273S-S78N	S24R
24	G97A-G128A-Y217Q-L75S-N76Y	T55P
25	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G	T55P
26	G97A-G128A-Y217Q-S89Y	T55P
27	G97A-G128A-Y217Q-I111V	T55P
28	G97A-G128A-Y217Q-I115V	T55P
29	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S	T55P
30	G97A-G128A-Y217Q-P129Q	T55P
31	G97A-G128A-Y217Q-A134T	T55P
32	G97A-G128A-Y217Q-A144K	T55P
33	G97A-G128A-Y217Q-S145D	T55P
34	G97A-G128A-Y217Q-S159K	T55P
35	G97A-G128A-Y217Q-S162K	T55P
36	G97A-G128A-Y217Q-S161P	T55P
37	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	T55P
38	G97A-G128A-Y217Q-G211T	T55P
39	G97A-G128A-Y217Q-K213T	T55P
40	G97A-G128A-Y217Q-P239R	T55P

Tabela 11-11: Lista de plasmídios originais e mutações introduzidas nas variantes de RCL7		
N° da variante combinatória	Plasmídio original	Mutação(ões) introduzida(s)
41	G97A-G128A-Y217Q-N240K	T55P
42	G97A-G128A-Y217Q-L267V	T55P
43	G97A-G128A-Y217Q-A273S	T55P
44	G97A-G128A-Y217Q-L75S-N76Y	N61E
45	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G	N61E
46	G97A-G128A-Y217Q-S89Y	N61E
47	G97A-G128A-Y217Q-I111V	N61E
48	G97A-G128A-Y217Q-I115V	N61E
49	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S	N61E
50	G97A-G128A-Y217Q-P129Q	N61E
51	G97A-G128A-Y217Q-A134T	N61E
52	G97A-G128A-Y217Q-A144K	N61E
53	G97A-G128A-Y217Q-S145D	N61E
54	G97A-G128A-Y217Q-S159K	N61E
55	G97A-G128A-Y217Q-S162K	N61E
56	G97A-G128A-Y217Q-S161P	N61E
57	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	N61E
58	G97A-G128A-Y217Q-G211T	N61E
59	G97A-G128A-Y217Q-K213T	N61E
60	G97A-G128A-Y217Q-P239R	N61E
61	G97A-G128A-Y217Q-N240K	N61E
62	G97A-G128A-Y217Q-L267V	N61E
63	G97A-G128A-Y217Q-A273S	N61E
64	G97A-G128A-Y217Q-L75S-N76Y	N61P-S63H
65	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G	N61P-S63H
66	G97A-G128A-Y217Q-S89Y	N61P-S63H
67	G97A-G128A-Y217Q-I111V	N61P-S63H
68	G97A-G128A-Y217Q-I115V	N61P-S63H
69	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S	N61P-S63H
70	G97A-G128A-Y217Q-P129Q	N61P-S63H
71	G97A-G128A-Y217Q-A134T	N61P-S63H
72	G97A-G128A-Y217Q-A144K	N61P-S63H

Tabela 11-11: Lista de plasmídios originais e mutações introduzidas nas variantes de RCL7

N° da variante combinatória	Plasmídio original	Mutação(ões) introduzida(s)
73	G97A-G128A-Y217Q-S145D	N61P-S63H
74	G97A-G128A-Y217Q-S159K	N61P-S63H
75	G97A-G128A-Y217Q-S162K	N61P-S63H
76	G97A-G128A-Y217Q-S161P	N61P-S63H
77	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	N61P-S63H
78	G97A-G128A-Y217Q-G211T	N61P-S63H
79	G97A-G128A-Y217Q-K213T	N61P-S63H
80	G97A-G128A-Y217Q-P239R	N61P-S63H
81	G97A-G128A-Y217Q-N240K	N61P-S63H
82	G97A-G128A-Y217Q-L267V	N61P-S63H
83	G97A-G128A-Y217Q-A273S	N61P-S63H
84	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G	L75S-N76Y
85	G97A-G128A-Y217Q-S89Y	L75S-N76Y
86	G97A-G128A-Y217Q-I111V	L75S-N76Y
87	G97A-G128A-Y217Q-I115V	L75S-N76Y
88	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S	L75S-N76Y
89	G97A-G128A-Y217Q-P129Q	L75S-N76Y
90	G97A-G128A-Y217Q-A134T	L75S-N76Y
91	G97A-G128A-Y217Q-A144K	L75S-N76Y
92	G97A-G128A-Y217Q-S145D	L75S-N76Y
93	G97A-G128A-Y217Q-S159K	L75S-N76Y
94	G97A-G128A-Y217Q-S162K	L75S-N76Y
95	G97A-G128A-Y217Q-S161P	L75S-N76Y
96	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	L75S-N76Y
97	G97A-G128A-Y217Q-G211T	L75S-N76Y
98	G97A-G128A-Y217Q-K213T	L75S-N76Y
99	G97A-G128A-Y217Q-P239R	L75S-N76Y
100	G97A-G128A-Y217Q-N240K	L75S-N76Y
101	G97A-G128A-Y217Q-L267V	L75S-N76Y
102	G97A-G128A-Y217Q-A273S	L75S-N76Y
103	G97A-G128A-Y217Q-I111V	S87T-A88L-S89G

Tabela 11-11: Lista de plasmídios originais e mutações introduzidas nas variantes de RCL7		
N° da variante combinatória	Plasmídio original	Mutação(ões) introduzida(s)
104	G97A-G128A-Y217Q-I115V	S87T-A88L-S89G
105	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S	S87T-A88L-S89G
106	G97A-G128A-Y217Q-P129Q	S87T-A88L-S89G
107	G97A-G128A-Y217Q-A134T	S87T-A88L-S89G
108	G97A-G128A-Y217Q-A144K	S87T-A88L-S89G
109	G97A-G128A-Y217Q-S145D	S87T-A88L-S89G
110	G97A-G128A-Y217Q-S159K	S87T-A88L-S89G
111	G97A-G128A-Y217Q-S162K	S87T-A88L-S89G
112	G97A-G128A-Y217Q-S161P	S87T-A88L-S89G
113	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	S87T-A88L-S89G
114	G97A-G128A-Y217Q-G211T	S87T-A88L-S89G
115	G97A-G128A-Y217Q-K213T	S87T-A88L-S89G
116	G97A-G128A-Y217Q-P239R	S87T-A88L-S89G
117	G97A-G128A-Y217Q-N240K	S87T-A88L-S89G
118	G97A-G128A-Y217Q-L267V	S87T-A88L-S89G
119	G97A-G128A-Y217Q-A273S	S87T-A88L-S89G
120	G97A-G128A-Y217Q-I111V	S89Y
121	G97A-G128A-Y217Q-I115V	S89Y
122	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S	S89Y
123	G97A-G128A-Y217Q-P129Q	S89Y
124	G97A-G128A-Y217Q-A134T	S89Y

Tabela 11-11: Lista de plasmídios originais e mutações introduzidas nas variantes de RCL7		
N° da variante combinatória	Plasmídio original	Mutação(ões) introduzida(s)
125	G97A-G128A-Y217Q-A144K	S89Y
126	G97A-G128A-Y217Q-S145D	S89Y
127	G97A-G128A-Y217Q-S159K	S89Y
128	G97A-G128A-Y217Q-S162K	S89Y
129	G97A-G128A-Y217Q-S161P	S89Y
130	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	S89Y
131	G97A-G128A-Y217Q-G211T	S89Y
132	G97A-G128A-Y217Q-K213T	S89Y
133	G97A-G128A-Y217Q-P239R	S89Y
134	G97A-G128A-Y217Q-N240K	S89Y
135	G97A-G128A-Y217Q-L267V	S89Y
136	G97A-G128A-Y217Q-A273S	S89Y
137	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S	I111V
138	G97A-G128A-Y217Q-P129Q	I111V
139	G97A-G128A-Y217Q-A134T	I111V
140	G97A-G128A-Y217Q-A144K	I111V
141	G97A-G128A-Y217Q-S145D	I111V
142	G97A-G128A-Y217Q-S159K	I111V
143	G97A-G128A-Y217Q-S162K	I111V
144	G97A-G128A-Y217Q-S161P	I111V
145	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	I111V
146	G97A-G128A-Y217Q-G211T	I111V
147	G97A-G128A-Y217Q-K213T	I111V
148	G97A-G128A-Y217Q-P239R	I111V
149	G97A-G128A-Y217Q-N240K	I111V
150	G97A-G128A-Y217Q-L267V	I111V
151	G97A-G128A-Y217Q-A273S	I111V
152	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S	I115V
153	G97A-G128A-Y217Q-P129Q	I115V
154	G97A-G128A-Y217Q-A134T	I115V
155	G97A-G128A-Y217Q-A144K	I115V
156	G97A-G128A-Y217Q-S145D	I115V

Tabela 11-11: Lista de plasmídios originais e mutações introduzidas nas variantes de RCL7		
N° da variante combinatória	Plasmídio original	Mutação(ões) introduzida(s)
157	G97A-G128A-Y217Q-S159K	I115V
158	G97A-G128A-Y217Q-S162K	I115V
159	G97A-G128A-Y217Q-S161P	I115V
160	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	I115V
161	G97A-G128A-Y217Q-G211T	I115V
162	G97A-G128A-Y217Q-K213T	I115V
163	G97A-G128A-Y217Q-P239R	I115V
164	G97A-G128A-Y217Q-N240K	I115V
165	G97A-G128A-Y217Q-L267V	I115V
166	G97A-G128A-Y217Q-A273S	I115V
167	G97A-G128A-Y217Q-A144K	P129Q-S130G-G131S
168	G97A-G128A-Y217Q-S145D	P129Q-S130G-G131S
169	G97A-G128A-Y217Q-S159K	P129Q-S130G-G131S
170	G97A-G128A-Y217Q-S162K	P129Q-S130G-G131S
171	G97A-G128A-Y217Q-S161P	P129Q-S130G-G131S
172	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	P129Q-S130G-G131S
173	G97A-G128A-Y217Q-G211T	P129Q-S130G-G131S
174	G97A-G128A-Y217Q-K213T	P129Q-S130G-G131S
175	G97A-G128A-Y217Q-P239R	P129Q-S130G-G131S
176	G97A-G128A-Y217Q-N240K	P129Q-S130G-G131S
177	G97A-G128A-Y217Q-L267V	P129Q-S130G-G131S
178	G97A-G128A-Y217Q-A273S	P129Q-S130G-G131S
179	G97A-G128A-Y217Q-A144K	P129Q
180	G97A-G128A-Y217Q-S145D	P129Q

Tabela 11-11: Lista de plasmídios originais e mutações introduzidas nas variantes de RCL7

N° da variante combinatória	Plasmídio original	Mutação(ões) introduzida(s)
181	G97A-G128A-Y217Q-S159K	P129Q
182	G97A-G128A-Y217Q-S162K	P129Q
183	G97A-G128A-Y217Q-S161P	P129Q
184	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	P129Q
185	G97A-G128A-Y217Q-G211T	P129Q
186	G97A-G128A-Y217Q-K213T	P129Q
187	G97A-G128A-Y217Q-P239R	P129Q
188	G97A-G128A-Y217Q-N240K	P129Q
189	G97A-G128A-Y217Q-L267V	P129Q
190	G97A-G128A-Y217Q-A273S	P129Q
191	G97A-G128A-Y217Q-A144K	A134T
192	G97A-G128A-Y217Q-S145D	A134T
193	G97A-G128A-Y217Q-S159K	A134T
194	G97A-G128A-Y217Q-S162K	A134T
195	G97A-G128A-Y217Q-S161P	A134T
196	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	A134T
197	G97A-G128A-Y217Q-G211T	A134T
198	G97A-G128A-Y217Q-K213T	A134T
199	G97A-G128A-Y217Q-P239R	A134T
200	G97A-G128A-Y217Q-N240K	A134T
201	G97A-G128A-Y217Q-L267V	A134T
202	G97A-G128A-Y217Q-A273S	A134T
203	G97A-G128A-Y217Q-S159K	A144K
204	G97A-G128A-Y217Q-S162K	A144K
205	G97A-G128A-Y217Q-S161P	A144K
206	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	A144K
207	G97A-G128A-Y217Q-G211T	A144K
208	G97A-G128A-Y217Q-K213T	A144K
209	G97A-G128A-Y217Q-P239R	A144K
210	G97A-G128A-Y217Q-N240K	A144K
211	G97A-G128A-Y217Q-L267V	A144K
212	G97A-G128A-Y217Q-A273S	A144K
213	G97A-G128A-Y217Q-S159K	S145D

Tabela 11-11: Lista de plasmídios originais e mutações introduzidas nas variantes de RCL7

N° da variante combinatória	Plasmídio original	Mutação(ões) introduzida(s)
214	G97A-G128A-Y217Q-S162K	S145D
215	G97A-G128A-Y217Q-S161P	S145D
216	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	S145D
217	G97A-G128A-Y217Q-G211T	S145D
218	G97A-G128A-Y217Q-K213T	S145D
219	G97A-G128A-Y217Q-P239R	S145D
220	G97A-G128A-Y217Q-N240K	S145D
221	G97A-G128A-Y217Q-L267V	S145D
222	G97A-G128A-Y217Q-A273S	S145D
223	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	S159K
224	G97A-G128A-Y217Q-G211T	S159K
225	G97A-G128A-Y217Q-K213T	S159K
226	G97A-G128A-Y217Q-P239R	S159K
227	G97A-G128A-Y217Q-N240K	S159K
228	G97A-G128A-Y217Q-L267V	S159K
229	G97A-G128A-Y217Q-A273S	S159K
230	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	S162K
231	G97A-G128A-Y217Q-G211T	S162K
232	G97A-G128A-Y217Q-K213T	S162K
233	G97A-G128A-Y217Q-P239R	S162K
234	G97A-G128A-Y217Q-N240K	S162K
235	G97A-G128A-Y217Q-L267V	S162K
236	G97A-G128A-Y217Q-A273S	S162K
237	G97A-G128A-Y217Q-V203Y	S161P
238	G97A-G128A-Y217Q-G211T	S161P
239	G97A-G128A-Y217Q-K213T	S161P
240	G97A-G128A-Y217Q-239R	S161P
241	G97A-G128A-Y217Q-N240K	S161P
242	G97A-G128A-Y217Q-L267V	S161P
243	G97A-G128A-Y217Q-A273S	S161P
244	G97A-G128A-Y217Q-G211T	V203Y
245	G97A-G128A-Y217Q-K213T	V203Y
246	G97A-G128A-Y217Q-P239R	V203Y

Tabela 11-11: Lista de plasmídios originais e mutações introduzidas nas variantes de RCL7

N° da variante combinatória	Plasmídio original	Mutação(ões) introduzida(s)
247	G97A-G128A-Y217Q-N240K	V203Y
248	G97A-G128A-Y217Q-L267V	V203Y
249	G97A-G128A-Y217Q-A273S	V203Y
250	G97A-G128A-Y217Q-P239R	G211T
251	G97A-G128A-Y217Q-N240K	G211T
252	G97A-G128A-Y217Q-L267V	G211T
253	G97A-G128A-Y217Q-A273S	G211T
254	G97A-G128A-Y217Q-P239R	K213T
255	G97A-G128A-Y217Q-N240K	K213T
256	G97A-G128A-Y217Q-L267V	K213T
257	G97A-G128A-Y217Q-A273S	K213T
258	G97A-G128A-Y217Q-L267V	P239R
259	G97A-G128A-Y217Q-A273S	P239R
260	G97A-G128A-Y217Q-L267V	N240K
261	G97A-G128A-Y217Q-A273S	N240K

Exemplo 12Tabela de detergentes

[00532] As composições dos detergentes usados nos testes para o exemplo 12 da parte I são mostradas na tabela 12-1. As amostras da proteína variante BPN' foram adicionadas às composições detergentes conforme descrito no exemplo 1 da parte I para testar as várias propriedades mostradas.

Tabela 12-1: Composição de detergentes usados nos testes para testar as variantes BPN'

Ingrediente	Composição (%, em peso, da composição)		
	1	2	3
C ₁₂₋₁₅ Alquiletóxi(1.8)sulfato	14,7	11,6	
Sulfonato de C _{11,8} alquilbenzeno	4,3	11,6	8,3
sulfato de C ₁₆₋₁₇ alquila ramificado	1,7	1,29	
C ₁₂₋₁₄ alquil-9-etoxilato	0,9	1,07	
óxido de dimetilamina C ₁₂	0,6	0,64	

Tabela 12-1: Composição de detergentes usados nos testes para testar as variantes BPN'

Ingrediente	Composição (%, em peso, da composição)		
	1	2	3
Ácido cítrico	3,5	0,65	3
Ácido graxo C ₁₂₋₁₈	1,5	2,32	3,6
Borato de sódio (Borax)	2,5	2,46	1,2
C ₁₂₋₁₄ alquiletóxi-3-sulfato de sódio			2,9
C ₁₄₋₁₅ alquil-7-etoxilato			4,2
C ₁₂₋₁₄ alquil-7-etoxilato			1,7
Formiato de Ca	0,09	0,09	
um composto que tem a seguinte estrutura geral: bis((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n)(CH ₃)-N ⁺ -C _x H _{2x} -N ⁺ -(CH ₃)-bis((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n), sendo que n = de 20 a 30, e x = de 3 a 8, ou variantes sulfatadas ou sulfonatadas dos mesmos			1,2
Copolímero enxertado aleatório ¹		1,46	0,5
Polietilenoimina etoxilada ²	1,5	1,29	
ácido dietileno triamina penta-acético	0,34	0,64	
Dietileno triamina penta(ácido metilenofosfônico)			0,3
Tinopal AMS-GX		0,06	
Tinopal CBS-X	0,2	0,17	
Polímero anfifílico alcoxilado para limpeza de gordura ³	1,28	1	0,4
Etanol	2	1,58	1,6
Propileno glicol	3,9	3,59	1,3
Dietileno glicol	1,05	1,54	
Polietileno glicol	0,06	0,04	
Monoetanolamina	3,05	2,41	0,4
NaOH	2,44	1,8	
Cumenossulfonato de sódio			1
Formiato de sódio		0,11	
Água, estética (corantes, perfumes) e secundários (enzimas, solventes, estruturantes)	q.s.	q.s.	q.s.

¹"Copolímero enxertado aleatório" é um copolímero de

óxido de polietileno enxertado e acetato de polivinila que tem uma cadeia principal de óxido de polietileno e múltiplas cadeias laterais de acetato de polivinila. O peso molecular da cadeia principal de óxido de polietileno é cerca de 6000 e a razão entre o peso do óxido de polietileno e o peso do acetato de polivinila é cerca de 40 a 60 e não mais que 1 ponto de enxertia por 50 unidades de óxido de etileno.

²Polietilenoimina (MW = 600) com 20 grupos etoxilato por -NH.

³O polímero anfifílico alcoxilado para limpeza de gordura é uma polietilenoimina (MW = 600) com 24 grupos etoxilato por -NH e 16 grupos propoxilato por -NH.

Desempenho de remoção de manchas das variantes combinatórias de BPN'

[00533] Experimentos para avaliar o desempenho de remoção de manchas de variantes combinatórias de BPN' geradas conforme descrito no exemplo 11 foram feitos usando pequenas amostras de tecido com SLT. O teste foi feito conforme descrito no exemplo 1 (teste em amostras de tecido com SLT). A tabela 12-2 fornece os valores do índice de desempenho (PI) de variantes geradas a partir da biblioteca RCL4 usando o teste em amostras de tecido com SLT na composição detergente 1 a pH 8 e 16°C e na composição detergente 1 a pH 8 e 32°C e o teste em amostras de tecido com SLT no detergente comercial TIDE® 2X Frio (Procter & Gamble) inativado por calor a 16°C e pH 8. A inativação por calor de fórmulas detergentes comerciais serve para destruir a atividade enzimática endógena de quaisquer componentes de proteína, mas mantendo as propriedades de componentes não enzimáticos. A inativação por calor dos detergentes foi feita por colocar quantidades pré-pesadas de detergente líquido (em um frasco de vidro) em um banho-maria a 95°C durante 2 horas. O detergente TIDE® 2X Frio foi comprado em

supermercados locais. Os detergentes aquecidos e não aquecidos foram testados dentro de 5 minutos da dissolução do detergente, de modo a determinar precisamente a porcentagem desativada. A atividade enzimática foi testada pelo teste AAPF. As soluções de trabalho foram feitas a partir do estoque inativado por calor. As quantidades adequadas de dureza da água e tampão foram adicionadas às soluções detergentes para se assemelhar às condições desejadas (tabela 12-2). As soluções foram misturadas através de vortexação ou inversão dos frascos.

Tabela 12-2: Soluções detergentes de trabalho					
Detergente	Temp (°C)	Detergente g/L	pH	Tampão	Gpg de dureza
TIDE® 2X Frio	16, 32	0,98	8	HEPES a 5 mM	6

[00534] As sequências das variantes mencionadas na tabela 12-3 são em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q. Os valores de PI são calculados em relação a BPN'-v3. Todos os mutantes nesta lista possuem um ponto de corte de PI igual a ou maior que 0,5 para pelo menos uma propriedade testada. "Comp. Det." significa composição detergente.

Tabela 12-3: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir da biblioteca RCL4				
Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI do Detergente TIDE® pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 32°C, SLT
S87T-A88L-S89G-G97A-G128A-Y217Q	S87T-A88L-S89G	1,00	1,12	0,99
N61P-S63H-G97A-G128A-Y217Q	N61P-S63H	1,03	1,12	1,01
S87G-A88V-S89A-G97A-G128A-Y217Q	S87G-A88V-S89A	1,02	1,11	0,99
P86S-S87G-A88V-G97A-G128A-Y217Q	P86S-S87G-A88V	1,00	1,10	1,00
Q59S-N61P-G97A-G128A-Y217Q	Q59S-N61P	1,01	1,09	1,00
S24G-N25G-G97A-G128A-Y217Q	S24G-N25G	0,99	1,09	1,02
N61P-N62S-G97A-G128A-Y217Q	N61P-N62S	0,99	1,06	0,98
G97A-G128A-P129Q-S130G-G131S-Y217Q	P129Q-S130G-G131S	0,96	1,06	0,99
L75S-N76Y-G97A-G128A-Y217Q	L75S-N76Y	0,99	1,06	1,00
G97A-G128A-V203Y-Y217Q	V203Y	0,99	1,05	1,01
T55P-G97A-G128A-Y217Q	T55P	0,98	1,04	0,98

Tabela 12-3: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir da biblioteca RCL4				
Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI do Detergente TIDE® pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 32°C, SLT
A88V-L90I-G97A-G128A-Y217Q	A88V-L90I	0,99	1,04	1,00
G97A-G128A-G211R-N212S-K213V-Y217Q	G211R-N212S-K213V	0,97	1,04	0,98
G23A-S24G-N25G-G97A-G128A-Y217Q	G23A-S24G-N25G	0,98	1,04	0,98
T22N-S24A-G97A-G128A-Y217Q	T22N-S24A	0,98	1,03	0,97
S24R-G97A-G128A-Y217Q	S24R	0,95	1,02	0,99
G97A-A98S-G128A-Y217Q	A98S	0,95	1,02	0,99
BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	BPN'-v3	1,00	1,00	1,00
G97A-G128A-T158G-S159G-Y217Q	T158G-S159G	0,95	0,99	0,97
Q59E-N61P-G97A-G128A-Y217Q	Q59E-N61P	0,90	0,94	0,90
G97A-A98E-G128A-Y217Q	A98E	0,92	0,91	0,90

[00535] A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a
5 sequência de SEQ ID nº 2 e pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir daquelas presentes na tabela 12-3, sendo que as posições da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência SEQ ID nº 2. A atividade proteolítica desta variante de protease pode ser maior que a
10 da protease BPN' ou BPN'-v3. Cada variante de protease pode ser uma variante de protease isolada, recombinante, substancialmente pura, ou que não tem ocorrência natural. Também estão incluídas composições, incluindo composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante de protease e métodos de limpeza utilizando
15 pelo menos uma tal variante de protease, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00536] A tabela 12-4 fornece os valores do índice de desempenho (PI) das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3 usando o teste em amostras de tecido com SLT na composição detergente 1 a 16°C e
20 pH 8, o teste em amostras de tecido com SLT na composição detergente 2 a 16°C e pH 8, e a estabilidade medida na composição detergente 3. Os valores de PI para atividade específica por hidrólise de AAPF (PI específica para AAPF) também foram determinados. Todos os testes foram feitos conforme descrito no exemplo 1. As
25 sequências das variantes mostradas são em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q. Os valores de PI foram calculados em relação a BPN'-v3. Todos os mutantes nesta lista possuem um ponto de corte de PI igual a ou maior que 0,5 para pelo menos uma propriedade testada. Valores de PI menores que 0,01 foram modificados para mostrar 0,01
30 em letras em itálico e negrito.

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3

Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-P86S-S87G-A88V-A116N-N117S-N118G	P86S-S87G-A88V-A116N-N117S-N118G	1,21	1,14	1,17	0,03
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-N61P-S101N	S24G-N25G-N61P-S101N	1,05	1,12	1,96	1,00
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	S24G-N25G-S53G-T55P-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	1,04	1,10	1,71	0,03
FS1	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S78N-S101N-V203Y	N61P-S78N-S101N-V203Y	1,03	1,10	1,73	0,33
FS1	G97A-G128A-Y217Q-T55P-N61P-S78N-S101N-V203Y	T55P-N61P-S78N-S101N-V203Y	1,06	1,10	1,97	0,39

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3						
Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N	S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N	1,03	1,10	2,22	0,33
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-V203Y-L267V	V203Y-L267V	1,10	1,09	1,12	0,09
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-T55P-S101N	S24G-N25G-T55P-S101N	1,04	1,09	1,82	1,13
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-A134T-L267V	A134T-L267V	1,13	1,08	0,93	0,66
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G	S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G	1,01	1,08	1,10	0,29

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3						
Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-N61P-S101N-V203Y	S24G-N25G-S53G-N61P-S101N-V203Y	1,07	1,08	2,11	0,09
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-N25Y-Q59S-N61P	N25Y-Q59S-N61P	1,07	1,08	0,85	0,66
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-I111V-S161P	I111V-S161P	1,10	1,08	0,66	0,98
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-I115V-L267V	I115V-L267V	1,10	1,08	1,07	0,63
FS1	G97A-G128A-Y217Q-T55P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	T55P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	0,99	1,08	1,39	0,16
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-N25Y-P129Q-S130G-G131S-A137T	N25Y-P129Q-S130G-G131S-A137T	1,07	1,08	0,88	0,67

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3

Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H-A128S-P129Q	N61P-S63H-A128S-P129Q	1,04	1,08	1,59	0,78
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S53G-N61P-S101N-V203Y	S53G-N61P-S101N-V203Y	1,03	1,08	1,91	0,09
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N	S24G-N25G-S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N	1,08	1,07	1,44	0,33
FS1	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N	N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N	1,07	1,07	1,80	0,31
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-N25Y-N61P-S63H	N25Y-N61P-S63H	1,06	1,07	0,74	0,60
RCL5	G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P-V203Y	Q59S-N61P-V203Y	0,99	1,07	0,69	0,09

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3						
Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-V8L-N25Y-P129Q-S130G-G131S	V8L-N25Y-P129Q-S130G-G131S	1,08	1,07	1,22	0,03
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-P86S-S87G-A88V-P239R	P86S-S87G-A88V-P239R	1,16	1,07	1,26	0,03
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S101N-V203Y	S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S101N-V203Y	1,02	1,07	2,07	0,11
RCL5	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-P129Q-S130G-G131S	S24G-N25G-P129Q-S130G-G131S	1,09	1,06	1,25	1,00
FS3	G97A-G128A-Y217Q-N240K	N240K	1,04	1,06	0,90	0,94

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3

Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
RCL5	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G-G211R-N212S-K213V	G23A-S24G-N25G-G211R-N212S-K213V	1,06	1,06	1,05	0,06
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H-S78N-I111V-A134T	N61P-S63H-S78N-I111V-A134T	1,03	1,06	0,43	1,14
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S63T-P86S-S87G-A88V	S63T-P86S-S87G-A88V	1,17	1,06	1,46	0,02
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G-A116N-N117S-N118G	G23A-S24G-N25G-A116N-N117S-N118G	1,08	1,06	0,91	0,21
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N	S78N-S87T-A88L-S89G-S101N	1,03	1,06	1,40	0,33

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3						
Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-A116N-N117S-N118G	S24G-N25G-A116N-N117S-N118G	1,06	1,06	0,74	1,05
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-T55P-N240K	T55P-N240K	1,02	1,06	0,91	0,93
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-T55P-P129V-P194S	T55P-P129V-P194S	1,07	1,06	0,85	0,86
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-N25Y-S87G-A88V-S89A	N25Y-S87G-A88V-S89A	1,07	1,05	1,14	0,08
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S87T-A88L-S89G-S101N	S24G-N25G-S87T-A88L-S89G-S101N	1,02	1,05	1,19	0,06
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-V203Y	P129Q-S130G-G131S-V203Y	1,04	1,05	0,94	0,05

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3						
Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P-N240K	Q59S-N61P-N240K	1,05	1,05	0,80	0,84
FS3	G97A-G128A-Y217Q-S24R-P40E-P129E-S159K-K265R	S24R-P40E-P129E-S159K-K265R	1,13	1,05	1,08	1,31
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-P52S-T55P-V203Y	P52S-T55P-V203Y	1,09	1,05	0,53	0,15
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24R-P129E	S24R-P129E	1,11	1,05	0,88	0,59
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-N61P-S78N	S24G-N25G-S53G-N61P-S78N	0,98	1,05	1,17	1,16
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-T55P-S78N-S101N	S24G-N25G-T55P-S78N-S101N	1,07	1,05	1,71	1,29

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3

Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-P86S-S87G-A88V-A116S-N117G-N118R	P86S-S87G-A88V-A116S-N117G-N118R	1,10	1,05	0,76	0,05
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S87T-A88L-S89G	N61P-S87T-A88L-S89G	1,00	1,05	1,12	0,05
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-S78N-S87T-A88L-S89G	S24G-N25G-S53G-T55P-S78N-S87T-A88L-S89G	0,96	1,05	0,96	0,29
RCL5	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G-N61P-S63H	G23A-S24G-N25G-N61P-S63H	1,06	1,05	0,89	0,13
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24R-Q59S-N61P	S24R-Q59S-N61P	1,07	1,05	0,94	0,49

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3						
Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-N61P-P129Q-S130G-G131S	N61P-P129Q-S130G-G131S	1,07	1,05	1,13	0,78
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N	S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N	1,05	1,04	1,98	0,32
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-S101N-V203Y	S24G-N25G-S53G-T55P-S101N-V203Y	1,05	1,04	1,57	0,15
FS1	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	1,02	1,04	1,60	0,12

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3						
Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-S78N-S101N	S24G-N25G-S53G-T55P-S78N-S101N	1,03	1,04	2,01	1,27
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S101N-V203Y	S24G-N25G-S53G-S101N-V203Y	1,01	1,04	1,77	0,07
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S78N-S101N-V203Y	S24G-N25G-S78N-S101N-V203Y	1,09	1,04	1,54	0,28
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-A133V-L267V	P129Q-S130G-G131S-A133V-L267V	1,14	1,04	1,37	0,56
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-S101N	S87T-A88L-S89G-S101N	1,05	1,04	1,44	0,07

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3						
Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G-P239R	G23A-S24G-N25G-P239R	1,07	1,04	0,92	0,16
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S87G-A88V-S89A-A116N-N117S-N118G	S87G-A88V-S89A-A116N-N117S-N118G	1,07	1,04	0,92	0,37
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P-A116S-N117G-N118R	Q59S-N61P-A116S-N117G-N118R	1,09	1,04	0,68	0,91
RCL5	G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P-S87T-A88L-S89G	Q59S-N61P-S87T-A88L-S89G	1,03	1,04	0,81	0,08
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S87T-A88L-S89G-V203Y	S24G-N25G-S53G-S87T-A88L-S89G-V203Y	0,96	1,04	0,73	0,04

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3

Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-A134T-G211T	A134T-G211T	1,11	1,04	0,71	0,35
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-T55P-A128S-P129Q	T55P-A128S-P129Q	1,03	1,04	2,71	1,02
FS1	G97A-G128A-Y217Q-T55P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N	T55P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N	1,05	1,04	1,56	0,33
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-P86S-S87G-A88V-T242R	P86S-S87G-A88V-T242R	1,09	1,04	0,83	0,04
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S161P-V203Y	S161P-V203Y	1,04	1,04	0,81	0,09
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-T55P-N61P-S78N-S101N-V203Y	S24G-N25G-T55P-N61P-S78N-S101N-V203Y	1,05	1,04	2,01	0,44

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3						
Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-G211T-L267V	G211T-L267V	1,08	1,03	1,16	0,30
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-P40E-T55P-N269K	P40E-T55P-N269K	1,08	1,03	0,71	0,05
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24R-A128S-P129G	S24R-A128S-P129G	1,08	1,03	1,63	0,64
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-N61P-N62S-P194L-A232T	S24G-N25G-N61P-N62S-P194L-A232T	1,15	1,03	3,06	0,35
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-T55P-A116S-N117G-N118R	T55P-A116S-N117G-N118R	1,07	1,03	0,83	1,06
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S78N-S101N-V203Y	S24G-N25G-S53G-S78N-S101N-V203Y	1,03	1,03	1,76	0,32

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3						
Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-N240K	P129Q-S130G-G131S-N240K	1,08	1,03	0,90	0,83
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G	S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G	0,93	1,03	1,00	0,33
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-N25Y-P129Q-S130G-G131S	N25Y-P129Q-S130G-G131S	1,08	1,03	0,93	0,69
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-T55P-I115V	T55P-I115V	1,06	1,03	1,07	1,07
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-N25Y-T55P	N25Y-T55P	1,05	1,03	1,00	0,80
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G-A128S-P129D	G23A-S24G-N25G-A128S-P129D	0,97	1,03	1,75	0,15

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3

Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-P129S-V203Y	S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-P129S-V203Y	1,00	1,03	1,68	0,13
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-T55P-A134T	T55P-A134T	1,06	1,03	0,94	1,05
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H-S78N-I111V	N61P-S63H-S78N-I111V	1,03	1,02	0,49	1,18
FS2	Y217Q-N61P-A97G-G102A-A128G-P129S	N61P-A97G-G102A-A128G-P129S	0,98	1,02	NA	NA
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S53G-N61P-S101N	S53G-N61P-S101N	1,02	1,02	2,08	0,88
RCL5	G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P-S87G-A88V-S89A	Q59S-N61P-S87G-A88V-S89A	1,01	1,02	0,90	0,20

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3

Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S53G-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	S53G-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	0,96	1,02	1,11	0,04
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-P129S	S87T-A88L-S89G-P129S	1,06	1,02	1,21	0,10
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S53G-T55P-S78N-S101N-V203Y	S53G-T55P-S78N-S101N-V203Y	1,03	1,02	1,70	0,48
RCL5	G97A-G128A-Y217Q-T55P-P129Q-S130G-G131S	T55P-P129Q-S130G-G131S	1,01	1,02	1,18	0,91
RCL5	G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P-P129Q-S130G-G131S	Q59S-N61P-P129Q-S130G-G131S	0,98	1,02	0,83	0,80
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-A134T-P239R	A134T-P239R	1,03	1,02	0,53	0,98

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3						
Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
RCL5	G97A-G128A-Y217Q-T55P-V203Y	T55P-V203Y	1,01	1,01	1,02	0,23
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-T55P-S78N-S89Y	T55P-S78N-S89Y	1,03	1,01	1,05	1,25
RCL5	G97A-G128A-Y217Q-T22N-S24A-N61P-S63H	T22N-S24A-N61P-S63H	1,00	1,01	0,69	0,46
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S161P-L267V	S161P-L267V	1,05	1,01	1,00	0,66
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-T55P-L75H-N76G	T55P-L75H-N76G	1,06	1,01	0,69	0,59
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-A134T-S161P	A134T-S161P	1,07	1,01	0,73	1,00
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-A134T	S87T-A88L-S89G-A134T	1,08	1,01	0,66	0,13

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3

Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-T55P-A116N-N117S-N118G	T55P-A116N-N117S-N118G	1,06	1,01	1,06	1,11
v12	G97A-G128S-Y217Q	A128S	1,02	1,01	1,65	1,00
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-T55P-S78N-I115V	T55P-S78N-I115V	1,07	1,00	1,00	1,32
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-Y6Q-P129Q-S130G-G131S	Y6Q-P129Q-S130G-G131S	1,03	1,00	0,98	0,23
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S24R-P129Q-S130G-G131S	S24R-P129Q-S130G-G131S	1,06	1,00	1,11	0,61
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S78N-S101N	S24G-N25G-S53G-S78N-S101N	0,99	1,00	1,61	1,21

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3

Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-T55P-P129V	T55P-P129V	1,07	1,00	0,70	1,00
v3	G97A-G128A-Y217Q	BPN'-v3	1,00	1,00	1,00	1,00
FS2	G97A-Y217Q-N61P-N62Q-G100N-A128G	N61P-N62Q-G100N-A128G	0,95	1,00	NA	NA
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-T55P-P129Q	T55P-P129Q	1,10	1,00	1,77	1,15
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	1,05	1,00	1,84	0,12
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-N240K	S87T-A88L-S89G-N240K	1,04	1,00	0,83	0,10

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3						
Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-A134T-N240K	A134T-N240K	1,07	0,99	0,61	0,96
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-P239R	S87T-A88L-S89G-P239R	1,04	0,99	0,68	0,14
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-L267V	P129Q-S130G-G131S-L267V	1,08	0,99	1,35	0,61
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-N240K	P129Q-N240K	1,06	0,99	1,39	1,00
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S78N-S87T-A88L-S89G-V203Y	S78N-S87T-A88L-S89G-V203Y	0,93	0,99	0,74	0,15
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-I111V-A273S	I111V-A273S	1,00	0,99	0,48	0,27

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3

Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-T55P-S78N-A88V-S101N	S24G-N25G-T55P-S78N-A88V-S101N	1,03	0,99	2,17	0,71
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-T55P-S78N	S24G-N25G-T55P-S78N	0,96	0,98	1,15	1,20
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S78N-S87T-A88L-S101N-V203Y	S24G-N25G-S53G-S78N-S87T-A88L-S101N-V203Y	1,02	0,98	1,27	0,10
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-V203Y	S24G-N25G-S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-V203Y	0,97	0,98	0,75	0,14
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	S24G-N25G-S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	1,06	0,98	1,21	0,14

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3						
Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
RCL5	G97A-G128A-Y217Q-S87G-A88V-S89A-P129Q-S130G-G131S	S87G-A88V-S89A-P129Q-S130G-G131S	1,01	0,98	1,18	0,29
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H-S78N-S161P	N61P-S63H-S78N-S161P	1,03	0,98	0,73	1,16
FS1	G97A-G128A-Y217Q-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	1,04	0,98	1,75	0,14
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-I111V-P129Q-S130G-G131S	I111V-P129Q-S130G-G131S	1,00	0,98	0,52	0,97
RCL5	G97A-G128A-Y217Q-T22N-S24A-T55P	T22N-S24A-T55P	0,96	0,98	0,94	0,64

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3

Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-I115V-N240K	I115V-N240K	1,04	0,98	0,66	0,90
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S87G-A88V-S89A-A116N-N117S-N118G-P172H	S87G-A88V-S89A-A116N-N117S-N118G-P172H	0,98	0,98	0,66	0,40
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N	S24G-N25G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N	1,01	0,98	1,28	0,31
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-I115V-A134T	S24G-N25G-I115V-A134T	1,03	0,98	0,59	1,13
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-T55P-A128S-P129D	T55P-A128S-P129D	0,97	0,97	1,39	1,00
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-I111V-S159K	I111V-S159K	0,99	0,97	0,64	1,12

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3

Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-N240K-A273S	N240K-A273S	1,03	0,96	0,64	0,19
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S159K-L267V	S159K-L267V	1,00	0,96	1,08	0,79
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-I111V-P129Q-G211T	I111V-P129Q-G211T	1,01	0,96	0,83	0,42
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-I115V-A273S	I115V-A273S	1,05	0,95	0,74	0,20
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S89Y	S89Y	0,99	0,95	0,70	0,88
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24R-A116N-N117S-N118G	S24R-A116N-N117S-N118G	1,08	0,95	0,91	0,60
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-N61E-A144K	N61E-A144K	1,03	0,95	0,97	1,10

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3

Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-P239R	P129Q-S130G-G131S-P239R	1,02	0,95	0,85	0,99
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-I115V	S87T-A88L-S89G-I115V	0,97	0,95	0,59	0,13
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-T55P-A92G	T55P-A92G	0,96	0,94	0,56	0,91
FS3	G97A-G128A-Y217Q-S145D-S159K-N240K-Q275E	S145D-S159K-N240K-Q275E	0,98	0,94	0,76	1,08
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S89Y-P129Q-S130G-G131S	S89Y-P129Q-S130G-G131S	1,04	0,94	0,71	0,70
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-S162K	P129Q-S130G-G131S-S162K	1,01	0,94	1,00	0,93

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3

Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-I111V-A134T	I111V-A134T	0,98	0,94	0,37	1,06
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-P40E-S53Y-S78Y-P86S-S87G-A88V	P40E-S53Y-S78Y-P86S-S87G-A88V	0,99	0,94	0,97	0,35
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-L75H-N76G	S24G-N25G-L75H-N76G	0,93	0,93	0,58	0,52
FS2	G97A-Y217Q-N61P-A128G-P129S-S130P	N61P-A128G-P129S-S130P	0,85	0,93	0,65	0,92
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24R-S145D	S24R-S145D	0,99	0,93	0,89	0,59
FS3	G97A-G128A-Y217Q-S24R-S145D-P239R-Q275E	S24R-S145D-P239R-Q275E	0,92	0,92	0,63	0,68

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3

Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S24R-S78N-S182P-L267V	S24R-S78N-S182P-L267V	0,95	0,92	1,16	0,55
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S53G-N61P-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	S53G-N61P-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	1,04	0,92	1,67	0,02
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-P5S-S87G-A88V-S89A-A116G-N117R	P5S-S87G-A88V-S89A-A116G-N117R	0,98	0,92	0,64	0,07
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S53G-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	S53G-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	0,99	0,92	1,65	0,11
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-Q59S-N61P-A116N-N117S-N118G	Q59S-N61P-A116N-N117S-N118G	0,93	0,92	0,42	1,04

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3						
Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-P239R-A273S	P239R-A273S	0,94	0,91	0,52	0,23
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	0,94	0,91	1,16	0,13
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24R-P129V	S24R-P129V	0,98	0,91	0,52	0,58
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-I111V-P239R	I111V-P239R	0,97	0,91	0,38	1,08
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	0,90	0,91	0,79	0,05
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-T55P-P129L	T55P-P129L	0,99	0,91	0,62	0,98

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3						
Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-I111V	S87T-A88L-S89G-I111V	0,92	0,90	0,42	0,13
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S145D-A273S	S145D-A273S	0,91	0,90	0,66	0,17
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-T242R	P129Q-S130G-G131S-T242R	0,94	0,90	0,51	0,89
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S3F-S87T-A88L-S89G-G211T	S3F-S87T-A88L-S89G-G211T	0,93	0,89	0,55	0,07
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S87G-A88V-S89A-S162K	S87G-A88V-S89A-S162K	0,97	0,89	1,21	0,37
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S89Y-G211T	S89Y-G211T	0,89	0,88	0,53	0,41

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3						
Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-A144K	S87T-A88L-S89G-A144K	0,93	0,88	0,74	0,12
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-S159K	P129Q-S130G-G131S-S159K	0,95	0,88	1,21	0,96
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-A116N-N117S-N118G-P129Q-S130G-G131S	A116N-N117S-N118G-P129Q-S130G-G131S	0,90	0,88	0,54	0,95
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-P129V	S24G-N25G-P129V	0,86	0,87	0,44	1,02
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	S24G-N25G-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-V203Y	0,87	0,86	0,83	0,12
FS2	G97A-Y217Q-N123G-A128G	N123G-A128G	0,83	0,86	1,00	0,14

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3

Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
FS2	G97A-G128A-Y217Q-N61P-N62Q-G100N-G102A-M124I	N61P-N62Q-G100N-G102A-M124I	0,82	0,86	5,52	0,40
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-K141E-T242R	S24G-N25G-K141E-T242R	0,90	0,85	0,65	1,10
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S87G-A88V-S89A-A116N-N117S-N118G-A144T	S87G-A88V-S89A-A116N-N117S-N118G-A144T	0,89	0,85	0,44	0,32
FS1	G97A-G128A-Y217Q-T55P-N61P-S87T-A88L-S89G-G110C-S130P	T55P-N61P-S87T-A88L-S89G-G110C-S130P	0,83	0,85	0,92	0,30
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-L75S-N76Y-A116S-N117G-N118R	L75S-N76Y-A116S-N117G-N118R	0,84	0,83	0,41	0,13

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3

Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
FS3	G97A-G128A-Y217Q-S145D-S159K-K213L-P239R-N240K	S145D-S159K-K213L-P239R-N240K	0,74	0,81	0,38	0,65
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24R-S87T-A88L-S89G	S24R-S87T-A88L-S89G	0,86	0,80	0,53	0,08
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G-P129V	G23A-S24G-N25G-P129V	0,88	0,79	0,53	0,20
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-A134T-K213L	A134T-K213L	0,87	0,79	0,51	0,81
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S89Y-A273S	S89Y-A273S	0,81	0,79	0,48	0,19
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S24R-P239R	S24R-P239R	0,90	0,78	0,71	0,69

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3

Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
FS2	G97A-Y217Q-N123G-A128G-P129S	N123G-A128G-P129S	0,76	0,78	0,71	0,12
RCL7	G97A-G128A-Y217Q-S89Y-P239R	S89Y-P239R	0,77	0,76	0,38	0,90
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-A92G	S24G-N25G-A92G	0,71	0,76	0,25	0,59
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H-I115V-A228V	N61P-S63H-I115V-A228V	0,73	0,74	0,24	0,42
FNA	Y217L	A97G-A128G-Q217L	0,73	0,74	1,81	1,21
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-L75S-N76Y-P129V	L75S-N76Y-P129V	0,73	0,73	0,34	0,09
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24R-P129L	S24R-P129L	0,80	0,73	0,35	0,58

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3

Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S87G-A88V-S89A-P129Q-S182Y-S204Y-P239Q	S87G-A88V-S89A-P129Q-S182Y-S204Y-P239Q	0,69	0,73	0,90	0,36
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24R-A92G	S24R-A92G	0,75	0,73	0,28	0,44
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24R-A116S-N117G-N118R	S24R-A116S-N117G-N118R	0,81	0,72	0,48	0,58
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G-A116G-N117R	G23A-S24G-N25G-A116G-N117R	0,85	0,66	0,63	0,20
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-P129L	S24G-N25G-P129L	0,72	0,66	0,39	1,03
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S87T-A88L-S89G-S101G	S87T-A88L-S89G-S101G	0,78	0,66	0,65	0,11

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3

Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-G23A-S24G-N25G-P129L	G23A-S24G-N25G-P129L	0,52	0,59	0,37	0,20
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S53G-N61P-G102A-V203Y	S53G-N61P-G102A-V203Y	0,55	0,58	0,29	0,16
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-T55P-V147P	T55P-V147P	0,56	0,57	0,22	1,09
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-Y6Q-L75S-N76Y	Y6Q-L75S-N76Y	0,55	0,52	0,24	0,17
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-N61P-S63H-V147P	N61P-S63H-V147P	0,36	0,37	0,14	0,95
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24R-V147P	S24R-V147P	0,16	0,22	0,08	0,85

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3

Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-V68C-A69G	S24G-N25G-V68C-A69G	0,21	0,18	0,06	0,71
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-N61P-L75S-N76Y-S101N-V203Y	S24G-N25G-N61P-L75S-N76Y-S101N-V203Y	0,19	0,18	0,08	0,38
FS1	G97A-G128A-Y217Q-L75S-N76Y-S78N-S101N-V203Y	L75S-N76Y-S78N-S101N-V203Y	0,13	0,12	0,05	0,72
FS1	G97A-G128A-Y217Q-L75S-N76Y-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-S130P	L75S-N76Y-S78N-S87T-A88L-S89G-S101N-S130P	0,04	0,04	0,07	0,73
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-S53G-S101N-S130P-V203Y	S24G-N25G-S53G-S101N-S130P-V203Y	0,06	0,04	0,06	0,33

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3

Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-G47E-M50I-L75S-N76Y-S162K	G47E-M50I-L75S-N76Y-S162K	0,01	0,03	0,02	1,21
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S53G-T55P-S87T-A88L-S89G-S101N-S130P-V203Y	S53G-T55P-S87T-A88L-S89G-S101N-S130P-V203Y	0,01	0,02	0,05	0,45
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S24G-N25G-L75S-N76Y-A128T-P129T-S130G-G131Q-S132C-A133G-A134T	S24G-N25G-L75S-N76Y-A128T-P129T-S130G-G131Q-S132C-A133G-A134T	0,01	0,01	0,02	1,21
RCL6	G97A-G128A-Y217Q-P129Q-S130G-G131S-V147P	P129Q-S130G-G131S-V147P	0,01	0,01	0,03	1,11

Tabela 12-4: Valores do índice de desempenho das variantes geradas a partir de RCL 5-7 e FS1-3						
Fonte de variantes	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT	PI da Comp. Det. 2, pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI de estabilidade, Comp. Det. 3
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S53G-T55P-N61P-L75S-N76Y-S87T-A88L-S89G-G102A-S130P-V203Y	S53G-T55P-N61P-L75S-N76Y-S87T-A88L-S89G-G102A-S130P-V203Y	0,01	0,01	0,02	1,05
FS1	G97A-G128A-Y217Q-S53G-T55P-N61P-L75S-N76Y-S101N-S130P-V203Y	S53G-T55P-N61P-L75S-N76Y-S101N-S130P-V203Y	0,03	0,01	0,02	1,03

[00537] A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 e pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir dos mostrados na tabela 12-4, sendo que as posições da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência da SEQ ID nº 2. Cada variante de protease pode ser uma variante de protease isolada, recombinante, substancialmente pura, ou que não tem ocorrência natural. Também estão incluídas composições, incluindo composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante de protease e métodos de limpeza utilizando pelo menos uma tal variante de protease, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00538] A tabela 12-5 fornece os valores do índice de desempenho (PI) das variantes de BPN' (geradas conforme descrito em "Geração das variantes para melhorar a estabilidade de BPN"; vide Tabela 11-3) para remoção de manchas no teste em amostras de tecido com SLT na composição detergente 1 a 16°C e pH 8 (PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT) e para estabilidade em LAS/EDTA (PI de estabilidade em LAS/EDTA). Os testes foram feitos conforme descrito no exemplo 1 (teste em amostras de tecido com SLT, teste de estabilidade em LAS/EDTA). As sequências das variantes são mostradas em relação a BPN' e FNA. Isto é, cada sequência variante é a sequência de BPN' ou FNA com as substituições de aminoácido variantes especificadas. Os valores de PI são mostrados em relação a FNA original, que é BPN'-Y217L.

Tabela 12-5: Índice de desempenho das variantes de BPN' com estabilidade aprimorada			
Sequência em relação a FNA: BPN' Y217L	Sequência em relação a BPN'	PI da Comp. Det. 1 pH 8, 16°C, SLT	PI da estabilidade em LAS/EDTA
P40E-S78N-S87D	P40E-S78N-S87D-Y217L	0,71	11,65
P40E	P40E-Y217L	0,96	8,33
T22V-S78N-Q206E-K213N	T22V-S78N-Q206E-K213N-Y217L	0,75	5,95
T22V-S78N-K213N	T22V-S78N-K213N-Y217L	0,86	5,71
S87D	S87D-Y217L	0,90	4,04
S78N	S78N-Y217L	0,87	3,86
K213N	K213N-Y217L	0,91	1,84
Q206E	Q206E-Y217L	0,86	1,76
T22V	T22V-Y217L	0,97	1,46
FNA	Y217L	1,00	1,00

[00539] A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica e/ou estabilidade aprimorada em relação a FNA, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID n° 2 e pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir dos mostrados na tabela 12-5, sendo que as posições da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência SEQ ID n° 2. Tal variante de protease pode ter uma atividade proteolítica maior que a de BPN' ou BPN'-v3. Cada variante de protease pode ser uma variante de protease isolada, recombinante, substancialmente pura, ou que não tem ocorrência natural. Também estão incluídas composições, incluindo composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante de protease e métodos de limpeza utilizando pelo menos uma tal variante de protease, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente

documento.

[00540] A tabela 12-6 fornece os valores do índice de desempenho (PI) de variantes de BPN' geradas a partir da biblioteca original: BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q (conforme descrito em "Geração de variantes para melhorar a estabilidade de BPN"; vide Tabela 11-3) para remoção de manchas em um teste em amostras de tecido com SLT na composição detergente 1 a 16°C e pH 8 e para estabilidade em LAS/EDTA. Os testes foram feitos conforme descrito no exemplo 1 teste em amostras de tecido com SLT e teste de estabilidade em LAS/EDTA). O índice de desempenho foi calculado em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q. Todos os mutantes nesta lista possuem um ponto de corte de PI igual a ou maior que 0,5 para pelo menos uma propriedade testada.

Tabela 12-6: Índice de desempenho das variantes de BPN' com estabilidade aprimorada			
Sequência em relação a BPN'-v3: BPN' G97A-G128A-Y217Q	Sequência em relação a BPN'	PI da Comp. Det. 1 pH 8, 16°C, SLT	PI de estabilidade em LAS/EDTA
S87D-N76D-S78N	S87D-N76D-S78N-G97A-G128A-Y217Q	0,62	2,27
P40E-S78N-S87D	P40E-S78N-S87D-G97A-G128A-Y217Q	0,21	2,18
P40E-S87D	P40E-S87D-G97A-G128A-Y217Q	0,18	2,14
S78N-P40E	S78N-P40E-G97A-G128A-Y217Q	0,80	2,03
S87D-N76D	S87D-N76D-G97A-G128A-Y217Q	0,55	1,89
P40E	P40E-G97A-G128A-Y217Q	0,84	1,79
S78N-S87D	S78N-S87D-G97A-G128A-Y217Q	0,79	1,71
S87D	S87D-G97A-G128A-Y217Q	0,78	1,20
S78N	S78N-G97A-G128A-Y217Q	0,93	1,14
BPN'-v3	G97A-G128A-Y217Q	1,00	1,00

[00541] A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica e que tem estabilidade aprimorada em relação a BPN'-v3, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID n° 2 e pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir dos mostrados na tabela 12-6, sendo que as posições da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência SEQ ID n° 2. Cada variante de protease pode ser uma variante de protease isolada, recombinante, substancialmente pura, ou que não tem ocorrência natural. Também estão incluídas composições, incluindo composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante de protease e métodos de limpeza utilizando pelo menos uma tal variante de protease, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00542] A tabela 12-7 fornece os valores do índice de desempenho (PI) de variantes de BPN' (geradas conforme descrito em "Geração das variantes de BPN' a partir de cinco plasmídios diferentes" vide Tabela 11-4) para remoção de manchas em um teste em amostras de tecido com SLT na composição detergente 1 a 16°C e pH 8. Os testes foram feitos conforme descrito no exemplo 1 (teste em amostras de tecido com SLT). O índice de desempenho de cada variante foi calculado em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q. Todos os mutantes nesta lista possuem um ponto de corte de PI igual a ou maior que 0,5 para pelo menos uma propriedade testada.

Tabela 12-7: Índice de desempenho das variantes de BPN'		
Sequência em relação a BPN'-v3	Sequência em relação a BPN'	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT
G97A-G128A-Y217Q		
S101N	G97A-S101N-G128A-Y217Q	1,12

Tabela 12-7: Índice de desempenho das variantes de BPN'		
Sequência em relação a BPN'-v3 G97A-G128A-Y217Q	Sequência em relação a BPN'	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT
A137V	G97A-G128A-A137V-Y217Q	1,12
N61P	N61P-G97A-G128A-Y217Q	1,11
S130P	G97A-G128A-S130P-Y217Q	1,09
Q103N	G97A-Q103N-G128A-Y217Q	1,07
S63T	S63T-G97A-G128A-Y217Q	1,03
G102A	G97A-G102A-G128A-Y217Q	1,02
BPN'-v3	BPN'-v3 (G97A-G128A-Y217Q)	1,00
N109D-S248R	G97A-N109D-G128A-Y217Q-S248R	0,96
S87R	S87R-G97A-G128A-Y217Q	0,95
S188D	G97A-G128A-S188D-Y217Q	0,95
S87D-S248R	S87D-G97A-G128A-Y217Q-S248R	0,94
S188D-S248R	G97A-G128A-S188D-S248R-Y217Q	0,93
S248D	G97A-G128A-S248D-Y217Q	0,86
N109D-S188D-S248R	G97A-N109D-G128A-S188D-S248R-Y217Q	0,83
N109D	G97A-N109D-G128A-Y217Q	0,81
S87R-S248R	S87R-G97A-G128A-Y217Q-S248R	0,79
N109D-S188R	G97A-N109D-G128A-S188R-Y217Q	0,77
N76D	N76D-G97A-G128A-Y217Q	0,75

Tabela 12-7: Índice de desempenho das variantes de BPN'		
Sequência em relação a BPN'-v3 G97A-G128A-Y217Q	Sequência em relação a BPN'	PI da Comp. Det. 1, pH 8, 16°C, SLT
S87D-N109D-S188D-S248R	S87D-G97A-N109D-G128A-S188D-S248R-Y217Q	0,58
S87R-N109D-S188D-S248R	S87R-G97A-N109D-G128A-S188D-Y217Q-S248R	0,55
S87R-S188R-S248R	S87R-G97A-G128A-S188R-Y217Q-S248R	0,52
A187D	G97A-G128A-A187D-Y217Q	0,48
N109D-S248D	G97A-N109D-G128A-Y217Q-S248D	0,47
S87R-N109R-S188R-S248R	S87R-G97A-N109R-G128A-S188R-Y217Q-S248R	0,39
F189D	G97A-G128A-F189D-Y217Q	0,31
G100N	G97A-G100N-G128A-Y217Q	0,28
S87R-N109D-S188D	S87R-G97A-N109D-G128A-S188D-Y217Q	0,24
S87D-N109D-S188D	S87D-G97A-N109D-G128A-S188D-Y217Q	0,12
S87R-S188D-S248D	S87R-G97A-G128A-S188D-S248D-Y217Q	0,09
N62D	N62D-G97A-G128A-Y217Q	0,09
S87D-N109D-S188D-S248D	S87D-G97A-N109D-G128A-S188D-Y217Q-S248D	0,08

[00543] A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 e pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir dos mostrados na tabela 12-7,

sendo que as posições das variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência SEQ ID nº 2. Cada variante de protease pode ser uma variante de protease isolada, recombinante, substancialmente pura, ou que não tem ocorrência natural. Também estão incluídas composições, incluindo composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante de protease e métodos de limpeza utilizando pelo menos uma tal variante de protease, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00544] A tabela 12-8 fornece os valores do índice de desempenho (PI) das variantes de BPN' (geradas conforme descrito em "Geração de bibliotecas combinatórias e variantes de BPN'-v3 + S78N"; conforme descrito no exemplo 3) para remoção de manchas usando um teste em amostras de tecido com SLT na composição detergente 1 a 16°C e pH 8. Os testes foram feitos conforme descrito no exemplo 1 (teste em amostras de tecido com SLT). O índice de desempenho de cada variante foi calculado em relação a BPN'-S78N-G97A-G128A-Y217Q. Valores de PI menores que 0,01 foram modificados e são indicados como 0,01 em letras em itálico e negrito.

Tabela 12-8: Valores de índice de desempenho das variantes de BPN'			
Variante	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	Comp. Det. Comp. 1 pH 8, 16°C, SLT PI
v3/S78N/L267V	S78N-G97A-G128A-Y217Q-L267V	S78N-L267V	1,12
v3/S78N/S161P	S78N-G97A-G128A-Y217Q-S161P	S78N-S161P	1,05
v3/S78N/I115V	S78N-G97A-G128A-Y217Q-I115V	S78N-I115V	1,04

Tabela 12-8: Valores de índice de desempenho das variantes de BPN'			
Variante	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	Comp. Det. Comp. 1 pH 8, 16°C, SLT PI
v3/S78N/A273S	S78N-G97A-G128A-Y217Q-A273S	S78N-A273S	1,03
v3/S78N/G211T	S78N-G97A-G128A-Y217Q-G211T	S78N-G211T	1,00
V3 + S78N	S78N-G97A-G128A-Y217Q	S78N	1,00
v3/S78N/I111V	S78N-G97A-G128A-Y217Q-I111V	S78N-I111V	0,98
v3/S78N/V147L	S78N-G97A-G128A-Y217Q-V147L	S78N-V147L	0,97
v3/S78N/I108V	S78N-G97A-G128A-Y217Q-I108V	S78N-I108V	0,97
v3/S78N/S89Y	S78N-G97A-G128A-Y217Q-S89Y	S78N-S89Y	0,94
v3/S78N/A138T	S78N-G97A-G128A-Y217Q-A138T	S78N-A138T	0,92
v3/S78N/P172V	S78N-G97A-G128A-Y217Q-P172V	S78N-P172V	0,74
v3/S78N/Q59G	S78N-G97A-G128A-Y217Q-Q59G	S78N-Q59G	0,64
GcM96	G97A-G128A-Y217Q-P129T-V147Q-S159D-S161P-S183T-Q185T-G211A-S224A	P129T-V147Q-S159D-S161P-S183T-Q185T-G211A-S224A	0,57
GcM91	G97A-G128A-Y217Q-Q059V-I108V-V147Q-G211A-N252Q	Q059V-I108V-V147Q-G211A-N252Q	0,55

Tabela 12-8: Valores de índice de desempenho das variantes de BPN'			
Variante	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	Comp. Det. Comp. 1 pH 8, 16°C, SLT PI
v3/S78N/Y167A	S78N-G97A-G128A-Y217Q-Y167A	S78N-Y167A	0,53
v3/S78N/A92G	S78N-G97A-G128A-Y217Q-A92G	S78N-A92G	0,49
v3/S78N/P129L	S78N-G97A-G128A-Y217Q-P129L	S78N-P129L	0,48
GcM92	G97A-G128A-Y217Q-N061A-S087E-M124I-S161P-S224A	N061A-S087E-M124I-S161P-S224A	0,36
v3/S78N/N62Q	S78N-G97A-G128A-Y217Q-N62Q	S78N-N62Q	0,27
v3/S78N/V68A	S78N-G97A-G128A-Y217Q-V68A	S78N-V68A	0,24
GcM94	G97A-G128A-Y217Q-S063T-S101A-L126V-S183T-T244N	S063T-S101A-L126V-S183T-T244N	0,12
v3/S78N/M124T	S78N-G97A-G128A-Y217Q-M124T	S78N-M124T	0,05
GcM95	G97A-G128A-Y217Q-P040L-S053G-Q059V-N061A-N062Q-S063T-S087E-G100N	P040L-S053G-Q059V-N061A-N062Q-S063T-S087E-G100N	0,01
GcM93	G97A-G128A-Y217Q-N062Q-G100N-S125A-S159D-N240S	N062Q-G100N-S125A-S159D-N240S	0,01

Tabela 12-8: Valores de índice de desempenho das variantes de BPN'			
Variante	Sequência em relação a BPN'	Sequência em relação a BPN'-v3: G97A-G128A-Y217Q	Comp. Det. Comp. 1 pH 8, 16°C, SLT PI
GcM100	G97A-G128A-Y217Q-V68A-G102A-G211A-S125A	V68A-G102A-G211A-S125A	0,01
GcM90	G97A-G128A-Y217Q-S053G-V068A-G102A-P129T-Q185T	S053G-V068A-G102A-P129T-Q185T	0,01

[00545] A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID n° 2 e pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir dos mostrados na tabela 12-8 sendo que as posições da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência da SEQ ID n° 2. Cada variante de protease pode ser uma variante de protease isolada, recombinante, substancialmente pura, ou que não tem ocorrência natural. Também estão incluídas composições, incluindo composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante de protease e métodos de limpeza utilizando pelo menos uma tal variante de protease, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00546] A tabela 12-9 fornece os valores do índice de desempenho (PI) de variantes de BPN' únicas (construídas usando fusão por PCR, conforme descrito no pedido PCT n° PCT/US09/46156, depositado em 3 de junho de 2009, que está incorporado a título de referência para tal descrição) para remoção de manchas em um teste em amostras de

tecido com SLT na composição detergente 2 a 16°C e pH 8 e para estabilidade medida na composição detergente 3. Os valores de PI para atividade específica por hidrólise de AAPF (PI específica para AAPF) foram determinados. Todos os testes foram feitos conforme descrito no exemplo 1. Os valores do índice de desempenho foram calculados em relação a BPN selvagem. Valores de PI menores que 0,01 estão indicados como 0,01 em letras em itálico e negrito. "Comp. Det." significa composição detergente.

Tabela 12-9: Valores do índice de desempenho para variantes de BPN' únicas

Variante de BPN'	PI da Comp. Det. 2 pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI da estabilidade da Comp. Det. 3
S182E	1,34	1,05	0,50
N109I	1,28	1,22	0,20
N117H	1,15	0,25	0,20
K237D	1,15	0,60	0,70
L257Q	1,14	0,94	0,80
P225N	1,13	1,02	0,70
S105H	1,11	1,07	0,01
S236I	1,10	0,58	0,90
L235H	1,10	0,65	0,70
S249E	1,07	0,72	0,30
N76E	1,07	0,76	0,20
S145N	1,06	1,16	1,10
N243D	1,05	1,03	0,90
R247N	1,04	1,04	0,50
E195N	1,04	1,05	0,40
A98K	1,03	0,75	0,70
S182N	0,99	1,14	0,90
S161H	0,97	1,07	0,90
G83H	0,95	0,72	0,60
G131D	0,95	1,11	1,30
T71C	0,93	1,00	1,30
K136Q	0,93	1,02	0,80

Tabela 12-9: Valores do índice de desempenho para variantes de BPN' únicas

Variante de BPN'	PI da Comp. Det. 2 pH 8, 16°C, SLT	PI específico de AAPF	PI da estabilidade da Comp. Det. 3
P40D	0,93	1,20	1,20
A187H	0,91	0,95	0,60
L250K	0,90	1,02	0,40
S9I	0,87	0,20	0,01
N76M	0,85	0,60	0,60
S132D	0,85	0,88	0,70
Q19F	0,83	0,47	0,30
E112H	0,83	1,02	0,01
S249P	0,80	1,02	0,50
S53D	0,78	0,29	0,10
V68E	0,78	0,59	1,70
D41I	0,72	1,15	0,90
K43H	0,70	0,28	0,10
V4H	0,66	0,37	0,60
A13Y	0,64	0,48	0,01
N62P	0,61	0,60	1,30
L196E	0,56	0,70	0,70
V44D	0,51	0,18	0,01

[00547] A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 e pelo menos uma substituição selecionada a partir das mostradas na tabela 12-9, sendo que as posições da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência da SEQ ID nº 2. Cada variante de protease pode ser uma variante de protease isolada, recombinante, substancialmente pura, ou que não tem ocorrência natural. Também estão incluídas composições, incluindo composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante de protease e métodos de limpeza utilizando

pelo menos uma tal variante de protease, conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

Exemplo 13

Composições detergentes líquidas para lavagem de roupas

[00548] Neste exemplo, são fornecidas várias formulações para composições detergentes líquidas para lavagem de roupas. As seguintes composições detergentes líquidas para lavagem de roupas da presente invenção são preparadas conforme mostrado abaixo. Em cada uma destas formulações, pelo menos uma variante de protease aqui fornecida está incluída a uma concentração de cerca de 0,0001 até cerca de 10 por cento, em peso. Em alguns aspectos alternativos, outras concentrações poderão ser usadas, conforme determinado pelo formulador, com base nas suas necessidades.

Tabela 13-1: Composição detergente líquida para lavagem de roupas					
Composto	Formulações				
	I	II	III	IV	V
LAS	24,0	32,0	6,0	3,0	6,0
NaC ₁₆ -C ₁₇ HSAS	-	-	-	5,0	-
C ₁₂ -C ₁₅ AE _{1,8} S	-	-	8,0	7,0	5,0
C ₈ -C ₁₀ propil dimetilamina	2,0	2,0	2,0	2,0	1,0
Óxido de C ₁₂ -C ₁₄ alquil dimetilamina	-	-	-	-	2,0
C ₁₂ -C ₁₅ AS	-	-	17,0	-	8,0
CFAA	-	5,0	4,0	4,0	3,0
Etoxilato de álcool graxo C ₁₂ -C ₁₄	12,0	6,0	1,0	1,0	1,0
Ácido graxo C ₁₂ -C ₁₈	3,0	-	4,0	2,0	3,0
Ácido cítrico (anidro)	4,5	5,0	3,0	2,0	1,0
DETPMP	-	-	1,0	1,0	0,5
Monoetanolamina	5,0	5,0	5,0	5,0	2,0
Hidróxido de sódio	-	-	2,5	1,0	1,5
Solução aquosa de HCl a 1N	No.1	No.1	-	-	-
Propanodiol	12,7	14,5	13,1	10.	8,0
Etanol	1,8	2,4	4,7	5,4	1,0
DTPA	0,5	0,4	0,3	0,4	0,5
Pectina liase	-	-	-	0,005	-

Tabela 13-1: Composição detergente líquida para lavagem de roupas					
Composto	Formulações				
	I	II	III	IV	V
Amilase	0,001	0,002	-	-	-
Celulase	-	-	0,0002	-	0,0001
Lipase	0,1	-	0,1	-	0,1
NprE (opcional)	0,05	0,3	-	0,5	0,2
PMN	-	-	0,08	-	-
Protease A (opcional)	-	-	-	-	0,1
Aldose Oxidase	-	-	0,3	-	0,003
ZnCl ₂	0,1	0,05	0,05	0,05	0,02
Formiato de Ca	0,05	0,07	0,05	0,06	0,07
DETBCHD	-	-	0,02	0,01	-
SRP1	0,5	0,5	-	0,3	0,3
Ácido bórico	-	-	-	-	2,4
Xileno sulfonato de sódio	-	-	3,0	-	-
Cumeno sulfonato de sódio	-	-	-	0,3	0,5
DC 3225C	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
2-butil-octanol	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03
Alvejante 1	0,12	0,10	0,18	0,08	0,10
qsp 100% perfume/corante e/ou água					

n° 1: Adicionar uma solução aquosa de HCl a 1N para ajustar o pH puro da fórmula na faixa de cerca de 3 a cerca de 5.

[00549] O pH das formulações (I)-(II) na tabela 13-1 é de cerca de 5 a cerca de 7 e das formulações (III)-(V) na tabela 13-1 é de cerca de 7,5 a cerca de 8,5.

Exemplo 14

Composições detergentes líquidas para lavagem de louças à mão

[00550] Neste exemplo, são fornecidas várias formulações detergentes líquidas para lavagem de louças à mão. As composições detergentes líquidas para lavagem de louças à mão da presente invenção são fornecidas abaixo. Em cada uma destas formulações, pelo menos uma variante de protease aqui fornecida está incluída a uma concentração de cerca de 0,0001 até cerca de 10 por cento, em

peso. Em alguns aspectos alternativos, outras concentrações poderão ser usadas, conforme determinado pelo formulador, com base nas suas necessidades.

Tabela 14-1: Composições detergentes líquidas para lavagem de louças à mão						
Composto	Formulações					
	I	II	III	IV	V	VI
C ₁₂ -C ₁₅ AE _{1,8} S	30,0	28,0	25,0	-	15,0	10,0
LAS	-	-	-	5,0	15,0	12,0
sulfonato de parafina	-	-	-	20,0	-	-
Óxido de C ₁₀ -C ₁₈ alquil dimetilamina	5,0	3,0	7,0	-	-	-
Betaína	3,0	-	1,0	3,0	1,0	-
Amida de ácido graxo C ₁₂ poli-OH	-	-	-	3,0	-	1,0
Amida de ácido graxo C ₁₄ poli-OH	-	1,5	-	-	-	-
C ₁₁ E ₉	2,0	-	4,0	-	-	20,0
DTPA	-	-	-	-	0,2	-
Citrato trissódico desidratado	0,25	-	-	0,7	-	-
Diamina	1,0	5,0	7,0	1,0	5,0	7,0
MgCl ₂	0,25	-	-	1,0	-	-
nprE (opcional)	0,02	0,01	-	0,01	-	0,05
PMN	-	-	0,03	-	0,02	-
Protease A (opcional)	-	0,01	-	-	-	-
amilase	0,001	-	-	0,002	-	0,001
Aldose Oxidase	0,03	-	0,02	-	0,05	-
Cumenossulfonato de sódio	-	-	-	2,0	1,5	3,0
PAAC	0,01	0,01	0,02	-	-	-
DETBCHD	-	-	-	0,01	0,02	0,01
qsp 100% perfume/corante e/ou água						

[00551] O pH das formulações (I)-(VI) na tabela 14-1 é de cerca de 8 a cerca de 11.

Exemplo 15

Composições detergentes líquidas para lavagem de louças automática

[00552] Neste exemplo, são fornecidas várias formulações detergentes líquidas para lavagem de louças automática. As composições detergentes líquidas para lavagem de louças à mão da presente invenção são fornecidas abaixo. Em cada uma destas formulações, pelo menos uma variante de protease aqui fornecida está incluída a uma concentração de cerca de 0,0001 até cerca de 10 por cento, em peso. Em alguns aspectos alternativos, outras concentrações poderão ser usadas, conforme determinado pelo formulador, com base nas suas necessidades.

Tabela 15-1: Composições detergentes líquidas para lavagem de louças automática					
Composto	Formulações				
	I	II	III	IV	V
STPP	16	16	18	16	16
Sulfato de potássio	-	10	8	-	10
1,2 propanodiol	6,0	0,5	2,0	6,0	0,5
Ácido bórico	-	-	-	4,0	3,0
Di-hidrato de CaCl ₂	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Não iônico	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
nprE (opcional)	0,1	0,03	-	0,03	-
PMN	-	-	0,05	-	0,06
Protease B (opcional)	-	-	-	0,01	-
amilase	0,02	-	0,02	0,02	-
Aldose Oxidase	-	0,15	0,02	-	0,01
Galactose oxidase	-	-	0,01	-	0,01
PAAC	0,01	-	-	0,01	-
DETBCHD	-	0,01	-	-	0,01
qsp 100% perfume/corante e/ou água					

Exemplo 16

Composições de lavanderia granulares e/ou em tablete

[00553] Este Exemplo fornece várias formulações para detergentes de lavanderia granulares e/ou em tablete. As composições de lavanderia da presente invenção, que podem estar sob a forma de grânulos ou tablete, são fornecidas abaixo. Em cada uma destas

formulações, pelo menos uma variante de protease aqui fornecida está incluída a uma concentração de cerca de 0,0001 até cerca de 10 por cento, em peso. Em alguns aspectos alternativos, outras concentrações poderão ser usadas, conforme determinado pelo formulador, com base nas suas necessidades.

Tabela 16-1: Composições de lavanderia granulares e/ou em tablete					
Composto	Formulações				
	I	II	III	IV	V
Produto-base					
C ₁₄ -C ₁₅ AS ou TAS	8,0	5,0	3,0	3,0	3,0
LAS	8,0	-	8,0	-	7,0
C ₁₂ -C ₁₅ AE ₃ S	0,5	2,0	1,0	-	-
C ₁₂ -C ₁₅ E ₅ ou E ₃	2,0	-	5,0	2,0	2,0
QAS	-	-	-	1,0	1,0
Zeólito A	20,0	18,0	11,0	-	10,0
SKS-6 (adicionar a seco)	-	-	9,0	-	-
MA/AA	2,0	2,0	2,0	-	-
AA	-	-	-	-	4,0
Citrato de 3Na · 2H ₂ O	-	2,0	-	-	-
Ácido cítrico (anidro)	2,0	-	1,5	2,0	-
DTPA	0,2	0,2	-	-	-
EDDS	-	-	0,5	0,1	-
HEDP	-	-	0,2	0,1	-
PB1	3,0	4,8	-	-	4,0
Percarbonato	-	-	3,8	5,2	-
NOBS	1,9	-	-	-	-
NACA OBS	-	-	2,0	-	-
TAED	0,5	2,0	2,0	5,0	1,00
BB1	0,06	-	0,34	-	0,14
BB2	-	0,14	-	0,20	-
Carbonato de Na anidro	15,0	18,0	-	15,0	15,0
Sulfato	5,0	12,0	5,0	17,0	3,0
Silicato	-	1,0	-	-	8,0
nprE (opcional)	0,03	-	0,1	0,06	-
PMN	-	0,05	-	-	0,1
Protease B (opcional)	-	0,01	-	-	-

Tabela 16-1: Composições de lavanderia granulares e/ou em tablete					
Composto	Formulações				
	I	II	III	IV	V
Protease C (opcional)	-	-	-	0,01	-
Lipase	-	0,008	-	-	-
Amilase	0,001	-	-	-	0,001
Celulase	-	0,0014	-	-	-
Pectina liase	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Aldose Oxidase	0,03	-	0,05	-	-
PAAC	-	0,01	-	-	0,05
qsp 100% umidade e/ou substâncias secundárias*					

* Perfume, corante, alvejante/SRP1/carbóxi metilcelulose de Na/fotobranqueador/MgSO₄/PVPVI/ supressor de espuma /PEG de alto peso molecular /argila.

Exemplo 17

Detergentes líquidos para lavagem de roupas

[00554] Este exemplo fornece várias formulações para detergentes líquidos para lavagem de roupas. As seguintes formulações de detergente líquido para lavagem de roupas da presente invenção são fornecidas abaixo. Em cada uma destas formulações, pelo menos uma variante de protease aqui fornecida está incluída a uma concentração de cerca de 0,0001 até cerca de 10 por cento, em peso. Em alguns aspectos alternativos, outras concentrações poderão ser usadas, conforme determinado pelo formulador, com base nas suas necessidades.

Tabela 17-1: Detergentes líquidos para lavagem de roupas						
Composto	Formulações					
	I	II	III	IV	V	VI
LAS	11,5	11,5	9,0	-	4,0	-
C ₁₂ -C ₁₅ AE _{2,85} S	-	-	3,0	18,0	-	16,0
C ₁₄ -C ₁₅ E _{2,5} S	11,5	11,5	3,0	-	16,0	-
C ₁₂ -C ₁₃ E ₉	-	-	3,0	2,0	2,0	1,0
C ₁₂ -C ₁₃ E ₇	3,2	3,2	-	-	-	-

Tabela 17-1: Detergentes líquidos para lavagem de roupas						
Composto	Formulações					
	I	II	III	IV	V	VI
CFAA	-	-	-	5,0	-	3,0
TPKFA	2,0	2,0	-	2,0	0,5	2,0
Ácido cítrico (anidro)	3,2	3,2	0,5	1,2	2,0	1,2
Formiato de Ca	0,1	0,1	0,06	0,1	-	-
Formiato de Na	0,5	0,5	0,06	0,1	0,05	0,05
ZnCl ₂	0,1	0,05	0,06	0,03	0,05	0,05
Cumeno sulfonato de Na	4,0	4,0	1,0	3,0	1,2	-
Borato	0,6	0,6	1,5	-	-	-
Hidróxido de Na	6,0	6,0	2,0	3,5	4,0	3,0
Etanol	2,0	2,0	1,0	4,0	4,0	3,0
1,2 propanodiol	3,0	3,0	2,0	8,0	8,0	5,0
Monoetanolamina	3,0	3,0	1,5	1,0	2,5	1,0
TEPAE	2,0	2,0	-	1,0	1,0	1,0
nprE (opcional)	0,03	0,05	-	0,03	-	0,02
PMN	-	-	0,01	-	0,08	-
Protease A (opcional)	-	-	0,01	-	-	-
Lipase	-	-	-	0,002	-	-
amilase	-	-	-	-	0,002	-
Celulase	-	-	-	-	-	0,0001
Pectina liase	0,005	0,005	-	-	-	-
Aldose Oxidase	0,05	-	-	0,05	-	0,02
Galactose oxidase	-	0,04	-	-	-	-
PAAC	0,03	0,03	0,02	-	-	-
DETBCHD	-	-	-	0,02	0,01	-
SRP 1	0,2	0,2	-	0,1	-	-
DTPA	-	-	-	0,3	-	-
PVNO	-	-	-	0,3	-	0,2
Alvejante 1	0,2	0,2	0,07	0,1	-	-
Antiespumante de silicone	0,04	0,04	0,02	0,1	0,1	0,1

Tabela 17-1: Detergentes líquidos para lavagem de roupas						
Composto	Formulações					
	I	II	III	IV	V	VI
qsp 100% perfume/corante e/ou água						

Exemplo 18Detergentes de alta densidade para lavagem de pratos

[00555] Este exemplo fornece várias formulações para detergentes de alta densidade para lavagem de pratos. Os seguintes detergentes de alta densidade e compactos para lavagem de pratos da presente invenção são fornecidos abaixo. Em cada uma destas formulações, pelo menos uma variante de protease aqui fornecida está incluída a uma concentração de cerca de 0,0001 até cerca de 10 por cento, em peso. Em alguns aspectos alternativos, outras concentrações poderão ser usadas, conforme determinado pelo formulador, com base nas suas necessidades.

Tabela 18-1: Detergentes de alta densidade para lavagem de pratos						
Composto	Formulações					
	I	II	III	IV	V	VI
STPP	-	45,0	45,0	-	-	40,0
Citrato de 3Na · 2H ₂ O	17,0	-	-	50,0	40,2	-
Carbonato de Na	17,5	14,0	20,0	-	8,0	33,6
Bicarbonato	-	-	-	26,0	-	-
Silicato	15,0	15,0	8,0	-	25,0	3,6
Metassilicato	2,5	4,5	4,5	-	-	-
PB1	-	-	4,5	-	-	-
PB4	-	-	-	5,0	-	-
Percarbonato	-	-	-	-	-	4,8
BB1	-	0,1	0,1	-	0,5	-
BB2	0,2	0,05	-	0,1	-	0,6

Tabela 18-1: Detergentes de alta densidade para lavagem de pratos						
Composto	Formulações					
	I	II	III	IV	V	VI
Não iônico	2,0	1,5	1,5	3,0	1,9	5,9
HEDP	1,0	-	-	-	-	-
DETPMP	0,6	-	-	-	-	-
PAAC	0,03	0,05	0,02	-	-	-
Parafina	0,5	0,4	0,4	0,6	-	-
nprE (opcional)	0,072	0,053	-	0,026	-	0,01
PMN	-	-	0,053	-	0,059	-
Protease B (opcional)	-	-	-	-	-	0,01
amilase	0,012	-	0,012	-	0,021	0,006
Lipase	-	0,001	-	0,005	-	-
Pectina liase	0,001	0,001	0,001	-	-	-
Aldose Oxidase	0,05	0,05	0,03	0,01	0,02	0,01
BTA	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3
policarboxilato	6,0	-	-	-	4,0	0,9
Perfume	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
qsp 100% umidade e/ou substâncias secundárias*						

* alvejante/corante/SRP1/carbóxi metilcelulose de Na/fotobranqueador/MgSO₄/PVPVI/ supressor de espuma /PEG de alto peso molecular /argila.

[00556] O pH das formulações (I) a (VI) na tabela 18-1 é de cerca de 9,6 a cerca de 11,3.

Exemplo 19

Composições detergentes em tabletes

[00557] Este exemplo fornece várias formulações detergentes em tabletes. As seguintes composições detergentes em tabletes da

presente invenção são preparadas pela compactação de uma composição detergente para lavar louças granular a uma pressão de 13 KN/cm² usando uma prensa giratória de 12 cabeças padrão. Em cada uma destas formulações, pelo menos uma variante de protease aqui fornecida está incluída a uma concentração de cerca de 0,0001 até cerca de 10 por cento, em peso. Em alguns aspectos alternativos, outras concentrações poderão ser usadas, conforme determinado pelo formulador, com base nas suas necessidades.

Tabela 19-1: Composições detergentes em tabletes								
Composto	Formulações							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
STPP	-	48,8	44,7	38,2	-	42,4	46,1	46,0
Citrato de 3Na ·2H ₂ O	20,0	-	-	-	35,9	-	-	-
Carbonato de Na	20,0	5,0	14,0	15,4	8,0	23,0	20,0	-
Silicato	15,0	14,8	15,0	12,6	23,4	2,9	4,3	4,2
Lipase	0,00 1	-	0,01	-	0,02	-	-	-
Protease B (opcional)	0,01	-	-	-	-	-	-	-
Protease C (opcional)	-	-	-	-	-	0,01	-	-
nprE (opcional)	0,01	0,08	-	0,04	-	0,02 3	-	0,05
PMN	-	-	0,05	-	0,05 2	-	0,02 3	-
amilase	0,01 2	0,01 2	0,01 2	-	0,01 5	-	0,01 7	0,00 2
Pectina liase	0,00 5	-	-	0,00 2	-	-	-	-
Aldose Oxidase	-	0,03	-	0,02	0,02	-	0,03	-
PB1	-	-	3,8	-	7,8	-	-	4,5
percarbonato	6,0	-	-	6,0	-	5,0	-	-
BB1	0,2	-	0,5	-	0,3	0,2	-	-
BB2	-	0,2	-	0,5	-	-	0,1	0,2
Não iônico	1,5	2,0	2,0	2,2	1,0	4,2	4,0	6,5

Tabela 19-1: Composições detergentes em tabletes								
Composto	Formulações							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
PAAC	0,01	0,01	0,02	-	-	-	-	-
DETBCHD	-	-	-	0,02	0,02	-	-	-
TAED	-	-	-	-	-	2,1	-	1,6
HEDP	1,0	-	-	0,9	-	0,4	0,2	-
DETPMP	0,7	-	-	-	-	-	-	-
parafina	0,4	0,5	0,5	0,5	-	-	0,5	-
BTA	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	-
policarboxilato	4,0	-	-	-	4,9	0,6	0,8	-
PEG 400 a 30.000	-	-	-	-	-	2,0	-	2,0
Glicerol	-	-	-	-	-	0,4	-	0,5
Perfume	-	-	-	0,05	0,2	0,2	0,2	0,2
qsp 100% umidade e/ou substâncias secundárias*								

* alvejante/SRP1/carbóxi metil celulose de Na/ fotobranqueador/ MgSO₄/PVPVI/ supressor de espuma /PEG de alto peso molecular /argila.

[00558] O pH das formulações (I) a (VII) na tabela 19-1 é de cerca de 10 a cerca de 11,5 e o pH da formulação (VIII) na tabela 19-1 é de 8 a 10. O peso do tablete das formulações (I) a (VIII) na tabela 19-1 é de cerca de 20 gramas a cerca de 30 gramas.

Exemplo 20

Detergentes líquidos para limpeza de superfícies duras

[00559] Este exemplo fornece várias formulações para detergentes líquidos para limpeza de superfícies duras. As composições detergentes líquidas para limpeza de superfícies duras da presente invenção são fornecidas abaixo. Em cada uma destas formulações, pelo menos uma variante de protease aqui fornecida está incluída a uma concentração de cerca de 0,0001 até cerca de 10 por cento, em peso. Em alguns aspectos alternativos, outras concentrações poderão ser usadas, conforme determinado pelo formulador, com base nas

suas necessidades.

Tabela 20-1: Detergentes líquidos para limpeza de superfícies duras							
Composto	Formulações						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
C ₉ -C ₁₁ E ₅	2,4	1,9	2,5	2,5	2,5	2,4	2,5
C ₁₂ -C ₁₄ E ₅	3,6	2,9	2,5	2,5	2,5	3,6	2,5
C ₇ -C ₉ E ₆	-	-	-	-	8,0	-	-
C ₁₂ -C ₁₄ E ₂₁	1,0	0,8	4,0	2,0	2,0	1,0	2,0
LAS	-	-	-	0,8	0,8	-	0,8
Cumeno sulfonato de sódio	1,5	2,6	-	1,5	1,5	1,5	1,5
Isachem® AS	0,6	0,6	-	-	-	0,6	-
Na ₂ CO ₃	0,6	0,13	0,6	0,1	0,2	0,6	0,2
Citrato de 3Na · 2H ₂ O	0,5	0,56	0,5	0,6	0,75	0,5	0,75
NaOH	0,3	0,33	0,3	0,3	0,5	0,3	0,5
Ácido graxo	0,6	0,13	0,6	0,1	0,4	0,6	0,4
2-butyl-octanol	0,3	0,3	-	0,3	0,3	0,3	0,3
PEG DME-2000®	0,4	-	0,3	0,35	0,5	-	-
PVP	0,3	0,4	0,6	0,3	0,5	-	-
MME PEG (2000)®	-	-	-	-	-	0,5	0,5
Jeffamine® ED-2001	-	0,4	-	-	0,5	-	-
PAAC	-	-	-	0,03	0,03	0,03	-
DETBCHD	0,03	0,05	0,05	-	-	-	-
nprE (opcional)	0,07	-	0,08	0,03	-	0,01	0,04
PMN	-	0,05	-	-	0,06	-	-
Protease B (opcional)	-	-	-	-	-	0,01	-
Amilase	0,12	0,01	0,01	-	0,02	-	0,01
Lipase	-	0,001	-	0,005	-	0,005	-
Pectina liase	0,001	-	0,001	-	-	-	0,002
ZnCl ₂	0,02	0,01	0,03	0,05	0,1	0,05	0,02
Formiato de cálcio	0,03	0,03	0,01	-	-	-	-
PB1	-	4,6	-	3,8	-	-	-
Aldose Oxidase	0,05	-	0,03	-	0,02	0,02	0,05
qsp 100% perfume/corante e/ou água							

[00560] O pH das formulações (I) a (VI) na tabela 20-1 é de cerca de 7,4 a cerca de 9,5.

Exemplo 21

Desempenho de limpeza das variantes do polipeptídeo BPN'-v36

[00561] Variantes do polipeptídeo BPN'-v36 compreendendo duas substituições de aminoácido foram construídas por fusão por PCR padrão usando a variante BPN'-v36 como uma cadeia principal ou sequência original. Para isto, dois ou três fragmentos parcialmente coincidentes foram amplificados por iniciadores mutagênicos preparados para que o iniciador codificasse uma substituição desejada. As reações de amplificação por PCR foram executadas conforme descrito no exemplo 7 da parte I *acima*. As seguintes variantes mutantes duplas de BPN'-v36 (isto é, BPN'-v36 com as duas substituições de aminoácido a seguir) foram construídas: Q019R-N025D, A001Y-Q275R, V004A-S249N, V004E-S260P, V004A-T55A, Y006F-S249C, Y006D-T55A, V008L-Q275R, Q010R-Q275K, L016Q-Q217H, H017R-T158A, S183D-Q206R, P210S-N212D, S018Y-V203A, S018K-V203I, Y021H-D259G, Y021H-D259R, K027R-N269D, K027R-N269T, S037P-S260F, S037T-S260P, D041E-N077D, D041G-N077E, G166V-S183T, N252S-L257H, V044A-Q206H, V044A-Q206K, V044A-Q206R, N076T-N212D, N076P-N212S, N077D-N252D, N077D-N252T, K141I-S248N, T158I-D259N, T158A-D259P, S161E-Q185H, K237M-H238R, G160A-D259G, G160R-D259V, G215R-D259R, G215D-D259V, N061D-Q206R, N061L-Q206H, S009L-N218S, S161E-S260T, Q019A-N109S, T022S-G166V, Y021H-N252H, P129S-K136R, T022S-T242S, N025K-H238R, N025D-Q185R, S037G-Q275H, K043R-N076S, K043N-Q217R, K043N-S163T, T055A-V147A, N061K-N252K, N062Y-G097D, Y021H-V084E, Y021H-S037E, N062Y-T244A, K027E-Y091F, A074S-P129Q, S249R-Q275R, I079V-Q217H, A098T-T158A, K027R-D120H, Q019R-Q185R, G131S-K265N, A133V-D259N, A144H-T244A,

I035V-K043N, G160R-T244A, S161P-T253A, S163T-Q245L, K170R-D259G, S183T-S249R, N184Y-Y262N, V198L-D259G, A200T-H226L, Q206R-S260P, G211V-T244A, Q217R-T244A, L75I-N76D, S260P-Q275L, S260P-Q275R, Y262N-Q275R, V004A-Y006F, H017L-Q019A, N025D-V026A, N118G-V121A, V072F-L075I, S183T-R186K, V203A-Q217R, e S249R-Y262H. O desempenho de limpeza de cada uma destas variantes foi testado em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C e no teste de limpeza em pequena amostra de tecido com ovo na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C, conforme descrito no exemplo 1 da parte I. Os resultados são fornecidos abaixo.

[00562] Determinou-se que as seguintes variantes de protease BPN' possuem um valor de PI igual a ou maior que 0,9 e igual a ou menor que 1,0 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID n° 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em S183T-S249R, N61D-Q206R, Y262N-Q275R, K43R-N76S, K170R-D259G, Y6F-S249C, Q19A-N109S, H17L-Q19A, Q19R-Q185R, S18Y-V203A, S161E-S260T, S18K-V203I, V4A-T55A, N252S-L257H, S249R-Y262H, N61L-Q206H, N184Y-Y262N, Q19R-N25D, A74S-P129Q, K27R-D120H, Y21H-N252H, K27R-N269D, A98T-T158A, I79V-Q217H, S9L-N218S, V4A-Y6F, S161P-T253A, V203A-Q217R, T22S-T242S, N76P-N212S, S37T-S260P, T55A-V147A, G160R-T244A, N25D-Q185R, G211V-T244A, A144H-T244A, Y21H-N252H, A1Y-Q275R, V198L-D259G, K141I-S248N, S183T-R186K, S161E-Q185H, P129S-K136R, K43N-S163T, S37G-Q275H, N62Y-T244A, e S260P-Q275R, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da

SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2), um valor de PI igual a ou maior que 0,9 e igual a ou menor que 1,0 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos de limpeza utilizando pelo menos uma tal variante de protease conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00563] Também é fornecida uma variante de protease subtilisina que tem atividade proteolítica intensificada e um valor de PI maior que 1,0 até cerca de 5 em comparação a BPN' em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com SEQ ID nº 2 ou SEQ ID nº 6, sendo que a variante compreende pelo menos uma substituição selecionada a partir do grupo de X1Y, X4A, X6F, X9L, X17L, X18K/Y, X19A/R, X21H, X22S, X25D, X27R, X37G/T, X43N/R, X55A, X61D/L, X62Y, X74S, X76P/S, X79V, X98T, X109S, X120H, X129Q/S, X136R, X141I, X144H, X147A, X158A, X160R, X161E/P, X163T, X170R, X183T,

X184Y, X185H/R, X186K, X198L, X203A/I, X206H/R, X211V, X212S, X217H/R, X218S, X242S, X244A, X248N, X249C/R, X252H/S, X253A, X257H, X259G, X260P/T, X262H/N, X269D, e X275H/R, e, opcionalmente, pelo menos uma substituição selecionada a partir do grupo de A1Y, V4A, Y6F, S9L, H17L, S18K/Y, Q19A/R, Y21H, T22S, N25D, K27R, S37G/T, K43N/R, T55A, N61D/L, N62Y, A74S, N76P/S, I79V, A98T, N109S, D120H, P129Q/S, K136R, K141I, A144H, V147A, T158A, G160R, S161E/P, S163T, K170R, S183T, N184Y, Q185H/R, R186K, V198L, V203A/I, Q206H/R, G211V, N212S, Q217H/R, N218S, T242S, T244A, S248N, S249C/R, N252H/S, T253A, L257H, D259G, S260P/T, Y262H/N, N269D, e Q275H/R, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência de SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos de limpeza utilizando pelo menos uma tal variante de protease conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00564] Determinou-se que as seguintes variantes de protease subtilisina BPN' possuem valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que 0,9 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em Y21H-D259G, A133V-D259N, I79V-Q217H, S18K-V203I, T158A-D259P, N61K-N252K, K43N-Q217R, T158A-D259P, Q206R-S260P, A133V-D259N, V198L-D259G, N61K-N252K, S161E-S260T,

G160A-D259G, K43N-Q217R, A1Y-Q275R, A200T-H226L, Q217R-T244A, S260P-Q275R, Q206R-S260P, T158I-D259N, Q217R-T244A, L75I-N76D, S161E-Q185H, Y21H-S37E, S249R-Q275R, T158I-D259N, Y21H-S37E, N76T-N212D, S260P-Q275L, G131S-K265N, V4A-S249N, N25D-Q185R, K43R-N76S, S183D-Q206R, Q10R-Q275K, K43N-S163T, Q10R-Q275K, N25D-V26A, G131S-K265N, S260P-Q275L, K141I-S248N, L16Q-Q217H, S249R-Q275R, K27R-N269T, P210S-N212D, L75I-N76D, S183D-Q206R, N118G-V121A, G215D-D259V, N76T-N212D, K27R-N269T, N62Y-G97D, V4E-S260P, G215D-D259V, K27E-Y91F, Y6D-T55A, N77D-N252T, V4E-S260P, Y6D-T55A, N25K-H238R, V44A-Q206H, L16Q-Q217H, V44A-Q206R, V44A-Q206H, e S37P-S260F, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica, que tem atividade proteolítica intensificada maior que a de BPN', e/ou um valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que 0,9 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos de limpeza utilizando pelo menos uma tal variante de protease conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00565] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI maior que 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de mais que 1,0 a cerca de 10, de mais que 1,0 a cerca de 8, ou de mais que 1,0 a cerca de 5 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza em pequena amostra de tecido com ovo na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID n° 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em Y21H-D259G, S183T-S249R, N61D-Q206R, Y262N-Q275R, K043R-N076S, A133V-D259N, e I079V-Q217H, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID n° 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36, e um valor de PI maior do que o de BPN', BPN'-v3 e BPN'-v36 neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID n° 2), atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36, um valor de PI maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v3, e/ou um valor de PI maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a sequência da SEQ ID n° 2 ou da SEQ ID n° 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID n° 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se

limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos de limpeza utilizando pelo menos uma tal variante de protease conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00566] Também é fornecida uma variante de protease subtilisina que tem atividade proteolítica intensificada e/ou um valor de PI maior que 1,0 a cerca de 5 em comparação a BPN' em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a SEQ ID nº 2 ou SEQ ID nº 6, sendo que a variante compreende pelo menos uma substituição selecionada a partir do grupo de X021H, X043R, X061D, X076S, X079V, X133V, X183T, X206R, X217H, X249R, X259G/N, X262N, e X275R, e, opcionalmente, pelo menos uma substituição selecionada a partir do grupo de Y021H, K043R, N061D, N076S, I079V, A133V, S183T, Q206R, Q217H, S249R, D259G/N, Y262N, e Q275R, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência de SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) e um valor de PI maior que o de BPN' neste teste. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos de limpeza utilizando pelo menos uma tal variante de protease conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00567] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que ou igual a 1,0 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com ovo na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C:

sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em K170R-D259G, S18K-V203I, Y6F-S249C, Q19A-N109S, H17L-Q19A, Q19R-Q185R, S18Y-V203A, N61D-Q206R, S161E-S260T, S18K-V203I, V4A-T55A, N252S-L257H, S249R-Y262H, N61L-Q206H, N184Y-Y262N, Q19R-N25D, S249R-Y262H, A74S-P129Q, T158A-D259P, H17L-Q19A, K27R-D120H, V4A-T55A, N61K-N252K, Y21H-N252H, K27R-N269D, K43N-Q217R, T158A-D259P, Q206R-S260P, K27R-N269D, A98T-T158A, I79V-Q217H, S9L-N218S, V4A-Y6F, S161P-T253A, V203A-Q217R, T22S-T242S, N76P-N212S, A133V-D259N, S37T-S260P, T55A-V147A, V198L-D259G, Q19R-Q185R, V4A-Y6F, Q19A-N109S, Y262N-Q275R, G160R-T244A, Q19R-N25D, N25D-Q185R, N61K-N252K, S161E-S260T, A98T-T158A, N61L-Q206H, G211V-T244A, S9L-N218S, A144H-T244A, A144H-T244A, S18Y-V203A, Y21H-N252H, A74S-P129Q, G160A-D259G, K43N-Q217R, A1Y-Q275R, A1Y-Q275R, A200T-H226L, Q217R-T244A, S260P-Q275R, Q206R-S260P, K141I-S248N, S183T-R186K, T158I-D259N, S37T-S260P, K27R-D120H, T22S-T242S, Q217R-T244A, S161E-Q185H, P129S-K136R, G211V-T244A, N76P-N212S, L75I-N76D, S161E-Q185H, Y21H-S37E, S249R-Q275R, G160A-D259G, K43N-S163T, T158I-D259N, Y21H-S37E, S37G-Q275H, S161P-T253A, N76T-N212D, S260P-Q275L, Y6F-S249C, N184Y-Y262N, G131S-K265N, V4A-S249N, N25D-Q185R, N252S-L257H, K43R-N76S, S183D-Q206R, G160R-T244A, Q10R-Q275K, S37G-Q275H, K43N-S163T, Q10R-Q275K, N25D-V26A, P129S-K136R, G131S-K265N, S260P-Q275L, K141I-S248N, T22S-G166V, N62Y-T244A, L16Q-Q217H, S249R-Q275R, S260P-Q275R, K27R-N269T, P210S-N212D, L75I-N76D, S183D-Q206R, N118G-V121A, G215D-D259V, N76T-N212D, V4A-S249N, K27R-N269T, G166V-

S183T, N62Y-G97D, V4E-S260P, G215D-D259V, K27E-Y91F, Y21H-D259R, Y6D-T55A, N77D-N252T, V4E-S260P, Y6D-T55A, N77D-N252T, Y21H-D259R, N25K-H238R, N77D-N252D, V44A-Q206H, L16Q-Q217H, V72F-L75I, S37P-S260F, V72F-L75I, N77D-N252D, V44A-Q206R, S163T-Q245L, V44A-Q206H, V44A-Q206R, S37P-S260F, G215R-D259R, V44A-Q206K, e V44A-Q206K, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica e/ou um valor de PI igual a ou maior que 0,5 e igual a ou menor que 1,0 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos de limpeza utilizando pelo menos uma tal variante de protease conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

Exemplo 22

Desempenho de limpeza de variantes do polipeptídeo BPN'-v36 adicionais

[00568] As seguintes variantes de BPN'-v36 foram sintetizadas na empresa DNA2.0 (Menlo Park, CA, EUA) usando o plasmídio pHPLT-BPN'-v36 contendo o cassete de expressão de BPN' que serviu como DNA molde (plasmídio original) para a clonagem: N109G-A128S-

S224A, N109G-A128S-S224A-N243V, A88T-N109G-A116T-A128S-S224A-N243V, N61G-N109G-A128S-S224A, N61G-N109G-A128S-S224A-N243V, N61G-A88T-N109G-A116T-A128S-S224A-N243V, N109Q-A128S-S224A, N109Q-A128S-S224A-N243V, A88T-N109Q-A116T-A128S-S224A-N243V, N109S-A128S-S224A, N109S-A128S-S224A-N243V, A88T-N109S-A116T-A128S-S224A-N243V, N109M-A128S-S224A, N109M-A128S-S224A-N243V, A88T-N109M-A116T-A128S-S224A-N243V, N109G-A114S-A128S, N109G-A114S-A128S-N243V, A88T-N109G-A114S-A116T-A128S-N243V, N109G-A114S-A128S-S224A, N109G-A114S-A128S-S224A-N243V, N109G-A128S-S183V, N109G-A128S-S183L, N109G-A128S-S183L-S224A, N109G-A114S-A128S-S183L-S224A, A88T-N109G-A114S-A116T-A128S-S183L-S224A-N243V, N76D-N109G-A128S-S224A, N101Q-N109Q-A128S-S224A-N243V, N101Q-N109Q-A128S-P129S-S130T-S224A-N243V, N109G-A128S-P129S-S130T-S224A-N243V, S33T-A128S-N218S, S33T-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-N61G-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-N109G-A128S-G169A-N218S-N243V, S33T-S63G-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-N76D-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-S63G-N109G-A128S-G169A-N218S-N243V, I31L-S33T-S63G-N109G-A128S-G169A-N218S-N243V, S33T-N61G-S63G-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-N61G-S63G-N109G-A128S-G131H-G169A-N218S-N243V, S33T-N61P-S63G-N109G-A128S-G131H-G169A-N218S-N243V, S33T-N109G-A128S-N218S-S224A-N243V, S63G-N109Q-A128S-S224A-N243V, S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, N61P-S63G-N109Q-A128S-S224A-N243V, N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, A1G-N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, I31L-N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V-S249Q, S33T-T55P-N61P-S63G-N109Q-A128S-

G131H-S224A-N243V, S33T-T55P-N61P-S63G-A88T-N109G-A116T-A128S-G131H-S224A-N243V, S33T-T55P-N61P-S63G-A88T-N109G-A116T-A128S-G131H-S224A-N243V-S249Q, A1G-I31L-S33T-T55P-N61P-S63G-A88T-N109G-A116T-A128S-G131H-S224A-N243V-S249Q, N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-G169A-S224A-N243V-S249Q, e A1G-I31L-S33T-T55P-N61P-S63G-A88T-N109G-A116T-A128S-G131H-G169A-S224A-N243V-S249Q.

[00569] As variantes foram crescidas para expressão de proteína, conforme descrito no exemplo 11 da parte I. Estas variantes foram testadas quanto ao desempenho no teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 a pH 8 e 16°C, no teste de limpeza em pequena amostra de tecido com ovo na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C, e no teste AAPF, conforme descrito no exemplo 1 da parte I. Os resultados são fornecidos abaixo.

[00570] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI maior que 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, maior que 1,0 até cerca de 10, maior que 1,0 até cerca de 8, ou maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 a pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em N61P-S63G-N109Q-A128S-S224A-N243V, A88T-N109G-A114S-A116T-A128S-N243V, A88T-N109G-A114S-A116T-A128S-S183L-S224A-N243V, N109G-A128S-S183V, N109G-A128S-N243V-K256R, N109M-A128S-S224A, A88T-N109S-A116T-A128S-S224A-N243V, N109Q-A128S-S224A-N243V, A88T-N109M-A116T-A128S-S224A-N243V, N109S-A128S-S224A-N243V, A88T-N109G-A116T-

N243V, N101Q-N109Q-A128S-S224A-N243V, N109G-A116T-N243V-K256R, N109G-A128S-P129S-S130T-S224A-N243V, e A88T-N109Q-A116T-A128S-S224A-N243V, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência de SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36, e um valor de PI maior do que o de BPN', BPN'-v3 e BPN'-v36 neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2), atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36, um valor de PI maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v3, e/ou um valor de PI maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos de limpeza utilizando pelo menos uma tal variante de protease conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00571] Também é fornecida uma variante de protease subtilisina que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN'-v36 e/ou um valor de PI igual a ou maior que 1,0 a cerca de 5 em comparação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C, a

variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com SEQ ID n° 2 ou SEQ ID n° 6, sendo que a variante compreende pelo menos uma substituição selecionada a partir do grupo de X61G/P/S, X63G, X88T, X101Q, X109G/M/Q/S, X114S, X116T, X128S, X129S, X130T, X158S, X183L/V, X224A, X243V, X248A, e X256R, e, opcionalmente, pelo menos uma substituição selecionada a partir do grupo de N61G/P/S, S63G, A88T, N101Q, N109G/M/Q/S, A114S, A116T, A128S, P129S, S130T, T158S, S183L/V, S224A, N243V, S248A, e K256R, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência de SEQ ID n° 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID n° 2) BPN'-v3, e BPN'-v36 e um valor de PI maior que o de BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36 neste teste. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos de limpeza utilizando pelo menos uma tal variante de protease conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00572] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem valor de PI igual a ou maior que 0,9 e igual a ou menor que 1,0 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID n° 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em G24S-G53S-N78S-G97A-N101S-A128S, G24S-G53S-N78S-G97A-N101S, S33T-T55P-N61P-S63G-A88T-N109G-A116T-A128S-G131H-S224A-N243V, S33T-N61G-S63G-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-S63G-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-

T55P-N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-G169A-S224A-N243V-S249Q, S33T-N61G-A88T-N109G-A116T-A128S-N218S-N243V, S33T-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-N76D-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-N76D-N109G-A128S-N218S-N243V-S248N-K256R, S33T-N61G-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-A128S-N218S, A1G-N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V-S249Q, N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, N109G-A114S-A128S, N109G-A114S-A128S-S183L-S224A, N109G-A114S-A128S-S224A, N109G-A114S-A128S-S224A-N243V, A88T-N109G-A116T-A128S-S224A-N243V, N61G-A88T-N109G-A116T-A128S-S224A-N243V, N109G-A114S-A128S-N243V, N109G-A128S-S224A-N243V, N109G-A128S-S224A, N109G-A128S-S183L-S224A, N61G-N109G-A128S-S224A, N109G-A128S-S183L, S33T-N76D, N109S-A128S-S224A, N101Q-N109Q-A128S-P129S-S130T-S224A-N243V, S63G-N109Q-A128S-S224A-N243V, N109M-A128S-S224A-N243V, S63G-N109G, N109G-K256R, S63G-N76D, S33T-N109G-A128S-G169A-N218S-N243V, e S33T-N109G-A128S-N218S-S224A-N243V, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica, atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN', e/ou um valor de PI igual a ou maior que 0,9 e menor que ou igual a 1,0 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima,

sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID n° 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos de limpeza utilizando pelo menos uma tal variante de protease conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00573] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que 0,9 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID n° 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em I31L-S33T-S63G-N109G-A128S-G169A-N218S-N243V, A1G-I31L-S33T-T55P-N61P-S63G-A88T-N109G-A116T-A128S-G131H-G169A-S224A-N243V-S249Q, S33T-N61G-S63G-N109G-A128S-G131H-G169A-N218S-N243V, S33T-S63G-N109G-A128S-G169A-N218S-N243V, S33T-T55P-N61P-S63G-A88T-N109G-A116T-A128S-G131H-S224A-N243V-S249Q, S33T-N76D-A128S-N218S, N76D-N109G-A128S-S224A, e S33T-N61P-S63G-N109G-A128S-G131H-G169A-N218S-N243V, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID n° 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica e/ou um valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que 0,9 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID n° 2 ou da SEQ ID n° 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de

substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID n° 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos de limpeza utilizando pelo menos uma tal variante de protease conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00574] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI maior que 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de mais que 1,0 a cerca de 10, de mais que 1,0 a cerca de 8, ou de mais que 1,0 a cerca de 5 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza em pequena amostra de tecido com ovo na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID n° 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em S33T-T55P-N61P-S63G-A88T-N109G-A116T-A128S-G131H-S224A-N243V, S33T-N61G-S63G-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-S63G-N109G-A128S-N218S-N243V, N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-G169A-S224A-N243V-S249Q, S33T-N61G-A88T-N109G-A116T-A128S-N218S-N243V, S33T-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-A128S-N218S, A1G-N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V-S249Q, S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, N61P-S63G-N109Q-A128S-S224A-N243V, A88T-N109G-A114S-A116T-A128S-N243V, A88T-N109G-A114S-A116T-A128S-S183L-S224A-N243V, N109G-A114S-A128S, N109G-A114S-A128S-S183L-S224A, N109G-A114S-A128S-S224A, N109G-A114S-A128S-S224A-

N243V, A88T-N109G-A116T-A128S-S224A-N243V, N61G-A88T-N109G-A116T-A128S-S224A-N243V, N109G-A128S-S183V, N109G-A114S-A128S-N243V, N109G-A128S-N243V-S248A, N109G-A128S-S224A-N243V, N109G-A128S-N243V-K256R, N109G-A128S-S224A, N109G-A128S-S183L-S224A, N61G-N109G-A128S-S224A, N109M-A128S-S224A, A88T-N109S-A116T-A128S-S224A-N243V, N109M-A128S-S224A-N243V, S63G-A128S, A88T-N109G-A116T-N243V, N101Q-N109Q-A128S-S224A-N243V, N109G-A116T-N243V-K256R, N109G-A116T, S63G-N109G, A88T-N109G, N109G-K256R, N61G-N109G-N243V, S33T-N109G-A128S-G169A-N218S-N243V, S33T-N109G-A128S-N218S-S224A-N243V, N109G-A128S-P129S-S130T-S224A-N243V, e A88T-N109Q-A116T-A128S-S224A-N243V, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36, e um valor de PI maior do que o de BPN', BPN'-v3 e BPN'-v36 neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2), atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36, um valor de PI maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v3, e/ou um valor de PI maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se

limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos de limpeza utilizando pelo menos uma tal variante de protease conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00575] Também é fornecida uma variante de protease subtilisina que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN'-v36 e/ou um valor de PI maior que 1,0 a cerca de 5 em comparação a BPN'-v36 em um teste de limpeza em pequena amostra de tecido com ovo na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a SEQ ID nº 2 ou SEQ ID nº 6, sendo que a variante compreende pelo menos uma substituição selecionada a partir do grupo de X1G, X33T, X55P, X61G/P/S, X63G, X76D, X88T, X101Q, X109G/M/Q/S, X114S, X116T, X128S, X129S, X130T, X131H, X158S, X169A, X183L/V, X218S, X224A, X243V, X248A/N, X249Q, X256R, e, opcionalmente, pelo menos uma substituição selecionada a partir do grupo de A1G, S33T, T55P, N61G/P/S, S63G, N76D, A88T, N101Q, N109G/M/Q/S, A114S, A116T, A128S, P129S, S130T, G131H, T158S, G169A, S183L/V, N218S, S224A, N243V, S248A/N, S249Q, K256R, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência de SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação à BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36 e um valor de PI maior que o de BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36 neste teste. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos de limpeza utilizando pelo menos uma tal variante de protease conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00576] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem valor de PI igual a ou maior que 0,5 e igual a ou menor que 1,0 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6) compreendendo as substituições de aminoácido selecionadas do grupo que consiste nas substituições S33T-N76D-A128S-N218S, N76D-N109G-A128S-S224A e S063G-N76D, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica e/ou um valor de PI igual a ou maior que 0,5 e igual a ou menor que 1,0 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou SEQ ID nº 6 e compreendendo substituições de aminoácido selecionadas do grupo que consiste em S33T-N76D-A128S-N218S, N76D-N109G-A128S-S224A, e S063G-N076D, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos de limpeza utilizando pelo menos uma tal variante de protease conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00577] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI maior que 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, maior

que 1,0 até cerca de 10, maior que 1,0 até cerca de 8, ou maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v36 em um teste proteolítico AAPF: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em G24S-G53S-N78S-G97A-N101S-A128S, I31L-S33T-S63G-N109G-A128S-G169A-N218S-N243V, A1G-I31L-S33T-T55P-N61P-S63G-A88T-N109G-A116T-A128S-G131H-G169A-S224A-N243V-S249Q, S33T-N61G-S63G-N109G-A128S-G131H-G169A-N218S-N243V, S33T-S63G-N109G-A128S-G169A-N218S-N243V, S33T-T55P-N61P-S63G-A88T-N109G-A116T-A128S-G131H-S224A-N243V, S33T-T55P-N61P-S63G-A88T-N109G-A116T-A128S-G131H-S224A-N243V-S249Q, S33T-N61G-S63G-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-S63G-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-T55P-N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-G169A-S224A-N243V-S249Q, S33T-N61G-A88T-N109G-A116T-A128S-N218S-N243V, S33T-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-N76D-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-N76D-N109G-A128S-N218S-N243V-S248N-K256R, S33T-N61G-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-N76D-A128S-N218S, S33T-A128S-N218S, A1G-N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V-S249Q, N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, N61P-S63G-N109Q-A128S-S224A-N243V, A88T-N109G-A114S-A116T-A128S-N243V, A88T-N109G-A114S-A116T-A128S-S183L-S224A-N243V, N109G-A114S-A128S, N109G-A114S-A128S-S183L-S224A, N109G-A114S-A128S-S224A, N109G-A114S-A128S-S224A-N243V, A88T-N109G-A116T-A128S-S224A-N243V, N61G-A88T-N109G-A116T-A128S-S224A-N243V, N109G-A128S-S183V, N109G-A114S-A128S-N243V, N109G-A128S-N243V-

S248A, N109G-A128S-S224A-N243V, N109G-A128S-N243V-K256R, N109G-A128S-S224A, N109G-A128S-S183L-S224A, N61G-N109G-A128S-S224A, N76D-N109G-A128S-S224A, N109M-A128S-S224A, N109G-A128S-S183L, S33T-N76D, A88T-N109S-A116T-A128S-S224A-N243V, N109Q-A128S-S224A-N243V, N109S-A128S-S224A, A88T-N109M-A116T-A128S-S224A-N243V, N101Q-N109Q-A128S-P129S-S130T-S224A-N243V, S63G-N109Q-A128S-S224A-N243V, N109M-A128S-S224A-N243V, S63G-A128S, N109S-A128S-S224A-N243V, A88T-N109G-A116T-N243V, N61S-N109G-N243V, N101Q-N109Q-A128S-S224A-N243V, N109G-A116T-N243V-K256R, A88T-N109G-A116T-T158S-N243V-K256R, N109G-A116T, S63G-N109G, A88T-N109G, N109G-K256R, N61G-N109G-N243V, S33T-N61P-S63G-N109G-A128S-G131H-G169A-N218S-N243V, S33T-N109G-A128S-G169A-N218S-N243V, S33T-N109G-A128S-N218S-S224A-N243V, N109G-A128S-P129S-S130T-S224A-N243V, e A88T-N109Q-A116T-A128S-S224A-N243V, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36, e um valor de PI maior do que o de BPN', BPN'-v3 e BPN'-v36 neste teste. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2), atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36, um valor de PI maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v3, e/ou um valor de PI maior que 1,0 até cerca de 5 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a

partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos de limpeza utilizando pelo menos uma tal variante de protease conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00578] Também é fornecida uma variante de protease subtilisina que tem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN'-v36 e/ou um valor de PI maior que 1,0 a cerca de 5 em comparação a BPN'-v36 em um teste proteolítico AAPF, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a SEQ ID nº 2 ou SEQ ID nº 6, sendo que a variante compreende pelo menos uma substituição selecionada a partir do grupo de X1G, X31L, X33T, X55P, X61G/P/S, X63G, X76D, X88T, X101Q, X109G/M/Q/S, X114S, X116T, X128S, X129S, X130T, X131H, X158S, X169A, X183L/V, X218S, X224A, X243V, X248A/N, X249Q, e X256R, e, opcionalmente, pelo menos uma substituição selecionada a partir do grupo de A1G, I31L, S33T, T55P, N61G/P/S, S63G, N76D, A88T, N101Q, N109G/M/Q/S, A114S, A116T, A128S, P129S, S130T, G131H, T158S, G169A, S183L/V, N218S, S224A, N243V, S248A/N, S249Q, e K256R, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições da sequência de SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica intensificada em comparação a BPN' (SEQ ID nº 2) BPN'-v3, e BPN'-v36 e um valor de PI maior que o de BPN', BPN'-v3, e BPN'-v36 neste teste. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo

pelo menos uma tal variante e métodos de limpeza utilizando pelo menos uma tal variante de protease conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

[00579] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem um valor de PI igual a ou maior que 0,5 e igual a ou menor que 1,0 em relação a BPN'-v36 em um teste proteolítico AAPF: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6) compreendendo as substituições de aminoácido G24S-G53S-N78S-G97A-N101S ou S063G-N76D, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica e/ou um valor de PI igual a ou maior que 0,5 e igual a ou menor que 1,0 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou SEQ ID nº 6 e compreendendo as substituições G24S-G53S-N78S-G97A-N101S ou S063G-N76D, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos de limpeza utilizando pelo menos uma tal variante de protease conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

Exemplo 23

Desempenho de limpeza de polipeptídeos de variantes do polipeptídeo BPN'-v36 das bibliotecas combinatórias feitas com base no polipeptídeo BPN'-v36

[00580] Duas bibliotecas combinatórias separadas (AJ1 e AJ2) foram sintetizadas pela DNA2.0 (Menlo Park, CA, EUA), e foram entregues como reações de ligação individuais. O plasmídio pHPLT-BPN'-v36 (figura 4) contendo o cassete de expressão de BPN' serviu como DNA molde (plasmídio original) para a construção da biblioteca. Uma lista das possíveis posições de aminoácido e substituições para cada biblioteca é mostrada na tabela 23-1. As reações de ligação para cada biblioteca foram usadas para transformar *B. subtilis*, e as variantes da biblioteca foram cultivadas para expressão de proteína, conforme descrito no exemplo 11. As variantes foram testadas quanto ao desempenho no teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C, conforme descrito no exemplo 1 da parte I.

Tabela 23-1: Possíveis substituições para as bibliotecas combinatórias AJ1 e AJ2			
AJ1		AJ2	
Posição	Possíveis substituições	Posição	Possíveis substituições
S33	G, S	E54	E,Q
D60	D,G	D99	D,N
N62	N,L,S	D120	D,N
S63	S,R,L,N,G	D140	D,N
S125	S,A	E156	E,Q
Q217	Q,R,E,L,G	D197	D,N
M222	M,L,S	K12	K,T
		K27	K,S
		K43	K,T
		K141	K,Y
		K213	K,Q
		K237	K,A
		K256	K,Q

[00581] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que ou igual a 1,0 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de

tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em G024S-G053S-N078S-G097A-N101S (isto é, BPN'-v3), G024S-G053S-N078S-G097A-N101S-A128S (isto é, BPN'-v12), N062L, N062L-S063G, N062S, N062S-S063G-Q217L, N062S-S063L-Q217L, N062S-S063N, N062S-S063R, Q217E, S063G, S063G-Q217L, S063G-Q217L-M222S, S063L-Q217L, S063N, S063N-Q217L, D099N-K141Y-K213Q, D099N-K141Y-K256Q, K043T, K043T-K141Y-E156Q, N062L-Q217E, N062L-Q217L, N062L-S063G-Q217E, N062L-S063L, N062L-S063N-Q217L, N062S-Q217L, N062S-S063G, N062S-S063L, N062S-S063N-Q217L, N062S-S063R-Q217E, Q217L, S063G-Q217E, S063N-Q217E, S063R, S063R-Q217E, S063R-Q217L, D099N-K141Y-K213Q, D099N-K141Y-K256Q, K043T, K043T-K141Y-E156Q, N062L-Q217E, N062L-Q217L, N062L-S063G-Q217E, N062L-S063L, N062S-Q217L, N062S-S063G, N062S-S063L, N062S-S063N-Q217L, Q217L, S063G-Q217E, S063N-Q217E, S063R, S063R-Q217E, e S063R-Q217L, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica e/ou um valor de PI igual a ou maior que 0,5 e igual a ou menor que 1,0 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de

aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos de limpeza utilizando pelo menos uma tal variante de protease conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento. Observe que uma variante de protease que tem a sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6) compreendendo as substituições de aminoácido G024S-G053S-N078S-G097A-N101S é BPN'-v3 (SEQ ID nº 4), porque o G na posição 24, G na posição 53, N na posição 78, e N na posição 101 da SEQ ID nº 6 foram substituídos por S em cada uma das posições 24, 53, 78, e 101 da SEQ ID nº 6. Além disso, o G na posição 97 da SEQ ID nº 6 foi substituído por A. Desta forma, a sequência resultante é a SEQ ID nº 4.

[00582] Determinou-se que as seguintes variantes de BPN'-v36 possuem valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que 0,9 em relação a BPN'-v36 em um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT na composição detergente 4 em pH 8 e 16°C: Sequência de aminoácidos de BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID nº 6) compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado do grupo que consiste em D099N, K141Y-E156Q, N062L-S063L-Q217L, N062L-S063N, N062L-S063N-Q217E, N062L-S063R, N062L-S063R-Q217L, N062S-Q217E, N062S-S063G-Q217E, N062S-S063G-Q217R, N062S-S063N-Q217R, S063G-S125A, D060G-Q217L, D120N-K141Y-K213Q, K043T-D099N-D120N-K141Y, K043T-D099N-K141Y-K256Q, K043T-K237A, N062L-S063G-Q217R, N062L-S063G-S125A, N062L-S063L-Q217E, N062L-S063N-S125A-Q217L, N062S-Q217R, N062S-S063L-Q217E, N062S-S063R-Q217L, S063G-M222S, S063G-Q217R, D120N-E156Q-K256Q, K141Y-D197N, N062L-Q217R, N062L-S063G-Q217L-M222S, N062L-

S063L-Q217R, N062L-S063N-Q217R, N062S-Q217G, N062S-S063G-Q217G, N062S-S063G-Q217L-M222L, N062S-S063G-S125A-Q217L, N062S-S063N-Q217E, Q217G, S033G-N062S-S063G, S063G-Q217G, S063G-Q217L-M222L, S063G-S125A-Q217R, S063L-Q217R, S063N-M222S, S063N-Q217R, S063N-S125A-Q217L, S063R-Q217R, S063R-S125A-Q217L, D099N-E156Q-K256Q, E156Q, K012T-D099N-K213Q, K012T-K256Q, K043T-D099N-K141Y-K213Q, K043T-E156Q, K141Y-K213Q, N062L-Q217G, N062L-Q217L-M222L, N062L-Q217L-M222S, N062L-S063G-M222S, N062L-S063G-Q217L-M222L, N062L-S063G-Q217R-M222S, N062L-S063N-Q217L-M222S, N062L-S063N-S125A, N062L-S063R-S125A, N062L-S125A, N062S-S063G-M222S, N062S-S063G-Q217G-M222S, N062S-S063G-S125A, N062S-S063N-Q217L-M222L, N062S-S063N-S125A-Q217L, N062S-S063R-Q217G, N062S-S063R-Q217L-M222S, Q217G-M222S, Q217L-M222S, Q217R, S033G-S063G-Q217R, S063G-Q217E-M222S, S063G-S125A-Q217G, S063L-Q217E, S063N-Q217G, S063N-Q217G-M222S, S063N-Q217L-M222S, S063R-Q217L-M222S, e S063R-S125A, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com a sequência da SEQ ID nº 2. Tais variantes possuem atividade proteolítica. A invenção inclui uma variante de protease que tem atividade proteolítica e/ou um valor de PI igual a ou maior que 0,5 e menor que 0,9 em relação a BPN'-v36 neste teste, a variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a sequência da SEQ ID nº 2 ou da SEQ ID nº 6 e compreendendo pelo menos um conjunto de substituições de aminoácido selecionado a partir do dito grupo acima, sendo que as posições de aminoácido da variante são numeradas por correspondência com as posições de aminoácido da sequência SEQ ID nº 2. Também estão incluídas composições, incluindo, mas não se

limitando, por exemplo, a composições de limpeza, compreendendo pelo menos uma tal variante e métodos de limpeza utilizando pelo menos uma tal variante de protease conforme descrito em mais detalhes em outro local no presente documento.

Parte II

Variantes de protease para água fria GG36 da série I

[00583] A sequência de aminoácidos da protease GG36 madura selvagem de *Bacillus lentus* é:

AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDTGISTHPDLNIRGGA
SFVPGEPSTQDGNGHGHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVL
GASGSGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSPSPSATLEQAVNSA
TSRGVLVVAASGNSGAGSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFSQY
GAGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKN
PSWSNVQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR (SEQ ID n°
755)

[00584] Conforme indicado na presente invenção, a variantes da protease para água fria GG36 da série I adequadas incluem enzimas variantes derivadas de uma protease original, a dita sequência da protease original sendo pelo menos 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, ou 100% idêntica à sequência de aminoácidos da SEQ ID n° 755, a dita variante de protease tendo uma ou mais das seguintes características:

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

b) um índice de desempenho no método de teste 3 de pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo

menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de 1,1 até cerca de 10, de 1,1 até cerca de 8, ou mesmo de 1,1 até cerca de 5;

c) um índice de desempenho no método de teste 4 de pelo menos 1,0, pelo menos 1,1, pelo menos 1,2, pelo menos 1,3, pelo menos 1,4, pelo menos 1,5, pelo menos 1,6, pelo menos 1,7, pelo menos 1,8, pelo menos 1,9, pelo menos 2, de 1,0 até cerca de 10, de 1,0 até cerca de 8, ou mesmo de 1,0 até cerca de 5.

[00585] Os métodos de teste 2, 3 e 4 estão explicitamente descritos na seção "Métodos de teste" do exemplo 1 da parte II. Todas as mutações aqui mencionadas utilizam o esquema de numeração de BPN', conforme mostrado na figura 5. Em alguns aspectos, as variantes aqui mencionadas referem-se a variantes que possuem sequências de aminoácido em comparação à sequência de aminoácidos da SEQ ID n° 755, usando o esquema de numeração de BPN'.

[00586] As proteases para água fria GG36 da série I adequadas podem ser variantes de subtilisinas ou derivadas de subtilisinas, particularmente as derivadas da subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* da SEQ ID n° 755 e, em alguns aspectos, compreendem uma ou mais das seguintes mutações: A1R, Q2S, V4R, V4S, S9A, R10S, P14K, A16S, H17R, N18R, G20R, T22A, T22R, S24R, S24W, G25R, G25V, V26F, L42I, N43R, N43A, G46R, P52F, P52E, P52N, T57R, Q59A, N62E, N62Q, V68A, V68C, T71G, I72C, A74C, L75A, L75F, L75R, N76D, S78R, L82R, P86W, E89P, E89T, E89G, E89H, E89I, E89V, E89W, Y91N, K94N, G100S, S101A, S101N, S101G, S101D, S103G, S103N, V104L, V104I, S106V, S106G, A108I, L111V, E112V, G115K, G115R, N117F, G118I, V121F, S128D, S128F, S128L, S128N, P129E, S144R, L148I, A158E, G159E, S160D, S166D, N185E, N185I, R186H, S188E, S188D, D197F, V203E, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T,

Y209E, Y209H, Y209G, P210R, S212I, S212F, Y214F, A215N, A215D, A215E, L217E, L217N, T224A, A230E, A231I, Q236F, N238R, N238K, P239K, P239G, P239R, P239S, W241R, S242R, S242L, N243R, V244R, N248I, N248V, H249R, L250I, N252R, T253R, L262D, Y263F, S265F, L267V, L267N, N269I, N269R, E271F, E271I, E271H, E271P, E271T, E271V, E271L e/ou A272F, sendo que a variante tem atividade proteolítica e cada posição de aminoácido da variante é numerada por correspondência a uma posição de aminoácido na sequência de aminoácidos da SEQ ID n° 2 (BPN') conforme determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante com SEQ ID n° 2.

[00587] Em um aspecto, as variantes da protease para água fria GG36 da série I adequadas incluem subtilisinas, particularmente as derivadas de GG36 de *Bacillus lentus* da SEQ ID n° 755, compreendendo um ou mais dos seguintes conjuntos de substituições: T022R-S024R, S009A-E271L, N018R-W241R, N018R-G115R, N043R-H249R, G020R-H249R, V004R-H249R, G020R-S024R, N018R-H249R, S009A-G020R, G020R-W241R, S009A-S078R, G020R-G115R, N018R-S024R, S024R-S242R, T022R-G115R, N018R-N043R, G020R-N043R, N018R-S242R, S242R-N269R, N018R-V244R, S024R-N269R, G020R-E271L, S024R-E271L, V004R-S009A, G020R-N269R, A001R-S024R, V244R-E271L, S009A-N018R, W241R-E271L, V004R-S024R, S009A-H249R, S009A-T022R, N062E-P129E, N062E-G159E, A016S-L148I, A158E-H249R, A016S-N062E, L111V-S188D, T022A-N062E, N062E-L148I, T022A-P129E, N062E-E271F, N062E-A158E, A016S-G159E, N062E-R186H, S128N-G159E, N062E-S188D, N062E-S128N, L148I-G159E, S103G-A158E, L111V-G159E, A158E-E271F, A016S-S188D, T022A-L111V, S128N-A158E, A016S-A158E, V104L-A158E, S128N-R186H, G159E-Y209E, N062E-S101A, L111V-Y209E, L148I-S188D, S101A-Y209E, T022A-S188D,

A016S-T022A, S128N-P129E, A016S-Y209E, A016S-S128N, T022A-E089P, S128N-Y209E, E089P-A158E, N062E-S103G, R186H-E271F, A016S-P129E, E089P-G159E, L111V-H249R, S101A-P129E, L148I-Y209E, T022A-G159E, P129E-H249R, P129E-Y209E, V104L-P129E, S128N-S188D, L111V-A158E, T022A-A158E, N062E-Y209E, N062E-H249R, S101A-R186H, E089P-P129E, P129E-E271, T22A-L111V-G159E, S101A-S103G-V104L-Y209E, S101A-S103G-V104L-G159E, S101A-S103G-V104L-S188D, S101G-S103A-V104I-G159D, T22A-S103G-G159E, T22A-S128N-E271F-Y209E, T22A-Y209E-E271F, T22A-S101A-Y209E, S101A-Y209E-E271F, T22A-L111V-S128N, T22A-S101A-G159E, S101A-S103G-V104L, T22A-S101A-S103G-V104L, S101A-S103G-V104L, S101G-S103A-V104I, S101A-S103G-V104L-S128N, S103A-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D, N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-S24R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-T253R, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N238R, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-G159D-

A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N76D, e/ou S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-E271F, sendo que a variante tem atividade proteolítica e cada posição de aminoácido da variante é numerada por correspondência a uma posição de aminoácido na sequência de aminoácidos da SEQ ID nº 2 (BPN'), conforme determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante com SEQ ID nº 2.

[00588] Em outro aspecto, as variantes da protease para água fria GG36 da série I adequadas incluem variantes de subtilisinas, particularmente as derivadas da GG36 de *Bacillus lentus* da SEQ ID nº 755, sendo que as variantes compreendem três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou mesmo 25 mutações dentro do grupo de posições que compreende as posições 1, 2, 4, 9, 10, 14, 16, 17, 18, 20, 22, 24, 25, 26, 42, 43, 46, 52, 57, 59, 62, 68, 71, 72, 74, 75, 76, 78, 82, 86, 89, 91, 94, 100, 101, 103, 104, 106, 108, 111, 112, 115, 117, 118, 121, 128, 129, 144, 148, 158, 159, 160, 166, 185, 186, 188, 197, 203, 209, 210, 212, 214, 215, 217, 224, 230, 231, 236, 238, 239, 241, 242, 243, 244, 248, 249, 250, 252, 253, 262, 263, 265, 267, 269, 271 e 272.

[00589] Em outro aspecto, as variantes da protease para água fria GG36 da série I adequadas incluem variantes de subtilisinas, particularmente as derivadas da GG36 de *Bacillus lentus* da SEQ ID nº 755, sendo que as variantes compreendem um total de três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou mesmo 25 mutações selecionadas a partir de: A1R, Q2S, V4R, V4S, S9A, R10S, P14K, A16S, H17R, N18R, G20R, T22A, T22R, S24R, S24W, G25R, G25V, V26F, L42I, N43R, N43A, G46R, P52F, P52E, P52N, T57R, Q59A, N62E, N62Q, V68A, V68C, T71G, I72C, A74C, L75A, L75F, L75R, N76D, S78R, L82R, P86W, E89P,

E89T, E89G, E89H, E89I, E89V, E89W, Y91N, K94N, G100S, S101A, S101N, S101G, S101D, S103G, S103N, V104L, V104I, S106V, S106G, A108I, L111V, E112V, G115K, G115R, N117F, G118I, V121F, S128D, S128F, S128L, S128N, P129E, S144R, L148I, A158E, G159E, S160D, S166D, N185E, N185I, R186H, S188E, S188D, D197F, V203E, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, P210R, S212I, S212F, Y214F, A215N, A215D, A215E, L217E, L217N, T224A, A230E, A231I, Q236F, N238R, N238K, P239K, P239G, P239R, P239S, W241R, S242R, S242L, N243R, V244R, N248I, N248V, H249R, L250I, N252R, T253R, L262D, Y263F, S265F, L267V, L267N, N269I, N269R, E271F, E271I, E271H, E271P, E271T, E271V, E271L e A272F; e opcionalmente uma ou mais das seguintes mutações: S103A, G159D, Q236H, Q245R, N248D e N252K, sendo que a variante tem atividade proteolítica e cada posição de aminoácido da variante é numerada por correspondência a uma posição de aminoácido na sequência de aminoácidos da SEQ ID n° 2 (BPN') conforme determinado pelo alinhamento da sequência de aminoácidos da variante com SEQ ID n° 2.

[00590] Em alguns aspectos, a variante da protease para água fria GG36 da série I compreende uma ou mais mutações, e tem uma carga líquida total de -5, -4, -3, -2, -1 ou 0 em relação à subtilisina GG36 de *B. lentus* selvagem (SEQ ID n° 755).

[00591] Em outro aspecto, as variantes da protease para água fria GG36 da série I são variantes da protease para água fria GG36 da série I com baixa força iônica. Tais variantes da protease para água fria GG36 da série I com baixa força iônica compreendem uma ou mais mutações e possuem uma carga líquida total de -5, -4, -3, -2, -1 ou 0 em relação à protease subtilisina GG36 de *B. lentus* selvagem (SEQ ID n° 755). Estas mutações podem ser selecionadas a partir de: (a) duas ou mais das seguintes mutações: A1R, Q2S, V4R, V4S, S9A,

R10S, P14K, A16S, T22A, T22R, S24R, G25V, V26F, L42I, P52F, P52E, P52N, N62E, N62Q, V68A, V68C, T71G, I72C, A74C. L75A, L75F, S78R, E89P, E89T, E89G, E89H, E89W, Y91N, K94N, G100S, S101A, S101N, S101G, S101D, S103G, S103N, V104L, V104I, A108I, L111V, E112V, G115K, N117F, V121F, S128D, S128F, S128L, S128N, P129E, L148I, A158E. G159E, S160D, S166D, N185E, R186H, S188E, S188D, V203E, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, P210R, S212I, S212F, Y214F, A215N, A215D, A215E, L217E, L217N, T224A, A230E, A231I, Q236F, N238R, N238K, P239K, P239G, P239R, N248V, H249R, L250I, L262D, Y263F, S265F, L267V, L267N. N269I, N269R, E271F, E271I, E271H e A272F; e/ou (b) um ou mais dos seguintes conjuntos de mutações: N062E-P129E, N062E-G159E, A016S-L148I, A158E-H249R, A016S-N062E, L111V-S188D, T022A-N062E, N062E-L148I, T022A-P129E, N062E-E271F, N062E-A158E, A016S-G159E, N062E-R186H, S128N-G159E, N062E-S188D, N062E-S128N, L148I-G159E, S103G-A158E, L111V-G159E, A158E-E271F, A016S-S188D, T022A-L111V, S128N-A158E, A016S-A158E, V104L-A158E, S128N-R186H, G159E-Y209E, N062E-S101A, L111V-Y209E, L148I-S188D, S101A-Y209E, T022A-S188D, A016S-T022A, S128N-P129E, A016S-Y209E, A016S-S128N, T022A-E089P, S128N-Y209E, E089P-A158E, N062E-S103G, R186H-E271F, A016S-P129E, E089P-G159E, L111V-H249R, S101A-P129E, L148I-Y209E, T022A-G159E, P129E-H249R, P129E-Y209E, V104L-P129E, S128N-S188D, L111V-A158E, T022A-A158E, N062E-Y209E, N062E-H249R, S101A-R186H, E089P-P129E, P129E-E271F, T22A-L111V-G159E, S101A-S103G-V104L-Y209E, S101A-S103G-V104L-G159E, S101A-S103G-V104L-S188D, S101G-S103A-V104I-G159D, T22A-S103G-G159E, T22A-S128N-E271F-Y209E, T22A-Y209E-E271F, T22A-S101A-Y209E, S101A-Y209E-E271F, T22A-L111V-S128N, T22A-S101A-G159E, S101A-S103G-V104L, T22A-S101A-S103G-V104L,

S101A-S103G-V104L, S101G-S103A-V104I, S101A-S103G-V104L-S128N, S103A-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-Q236H-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q245R-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-N248D-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N252K, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D, N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R, T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-S24R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-T253R, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N238R, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N76D e S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-E271F, sendo que a variante tem atividade proteolítica e cada posição de aminoácido da variante é numerada por correspondência a uma posição de aminoácido na sequência de aminoácidos da SEQ ID nº 2 (BPN').

[00592] Em outro aspecto, as variantes da protease para água fria GG36 da série I com baixa força iônica acima fazem parte de uma composição detergente que é diluída em água, tipicamente, dentro de uma máquina de lavar, para formar um líquido de lavagem de detergente para lavagem de roupas cuja condutividade é de cerca de

0,1 mS/cm a cerca de 3 mS/cm, de cerca de 0,3 mS/cm a cerca de 2,5 mS/cm, ou mesmo de cerca de 0,5 mS/cm a cerca de 2 mS/cm.

[00593] Em outro aspecto, as variantes da protease para água fria GG36 da série I são variantes da protease para água fria GG36 da série I com alta força iônica. Tais variantes da protease para água fria GG36 da série I com alta força iônica compreendem duas ou mais mutações e possuem uma carga líquida total de +5, +4, +3, +2, +1 ou 0 em relação à protease subtilisina GG36 de *B. lentus* selvagem (SEQ ID n° 755). Estas mutações podem ser selecionadas a partir de: (a) duas ou mais das seguintes mutações V4R, H17R, N18R, G20R, T22R, S24R, S24W, G25R, N43R, N43A, G46R, P52F, P52N, T57R, Q59A, N62Q, T71G, L75R, N76D, S78R, L82R, P86W, E89P, E89W, E89T, E89I, E89H, E89V, V104L, S106V, S106G, G115R, G118I, V121F, S144R, N185I, D197F, Y209N, Y209S, L217E, A231I, P239R, P239S, W241R, S242R, S242L, N243R, V244R, N248I, H249R, N252R, T253R, E271T, E271V, E271L, E271H, E271F, E271P, A1R, S9A, S212F e N269R; e/ou (b) uma ou mais dos seguintes conjuntos de mutações T022R-S024R, S009A-E271L, N018R-W241R, N018R-G115R, N043R-H249R, G020R-H249R, V004R-H249R, G020R-S024R, N018R-H249R, S009A-G020R, G020R-W241R, S009A-S078R, G020R-G115R, N018R-S024R, S024R-S242R, T022R-G115R, N018R-N043R, G020R-N043R, N018R-S242R, S242R-N269R, N018R-V244R, S024R-N269R, G020R-E271L, S024R-E271L, V004R-S009A, G020R-N269R, A001R-S024R, V244R-E271L, S009A-N018R, W241R-E271L, V004R-S024R, S009A-H249R, S009A-T022R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-E271F, S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-S24R, S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N252K, S101G-S103A-V104L-A232V-Q236H-

Q245R-N248D-N252K, sendo que a variante tem atividade proteolítica e cada posição de aminoácido da variante é numerada por correspondência a uma posição de aminoácido na sequência de aminoácidos da SEQ ID n° 2 (BPN').

[00594] Em outro aspecto, as variantes da protease para água fria GG36 da série I com alta força iônica acima fazem parte de uma composição detergente que é diluída em água, tipicamente, dentro de uma máquina de lavar, para formar um líquido de lavagem de detergente para lavagem de roupas cuja condutividade é de cerca de 3 mS/cm a cerca de 30 mS/cm, de cerca de 3,5 mS/cm a cerca de 20 mS/cm, ou mesmo de cerca de 4 mS/cm a cerca de 10 mS/cm.

[00595] A carga das variantes da protease para água fria GG36 da série I é expressa em relação à protease subtilisina GG36 de *B. lentus* selvagem que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID n° 755. As aminoácidos que conferem uma única carga negativa são D e E e as que conferem uma única carga positiva são R, H e K. Qualquer alteração de aminoácido em relação à SEQ ID n° 755 que altera uma carga é usada para calcular a carga da variante da protease para água fria GG36 da série I. Por exemplo, a introdução de uma mutação de carga negativa a partir de uma posição neutra selvagem adicionará uma carga líquida de -1 à variante da protease para água fria GG36 da série I, enquanto que a introdução de uma mutação de carga negativa (D ou E) a partir de um resíduo de aminoácido positivo selvagem (R, H ou K) adicionará uma carga líquida de -2. A soma das alterações de carga de todos os resíduos de aminoácido que são diferentes para a variante da protease para água fria GG36 da série I em relação à protease subtilisina GG36 de *B. lentus* selvagem que possui a sequência de aminoácidos da SEQ ID n° 755 dá a alteração de carga da variante da protease para água fria GG36 da série I. Sem se ater à teoria, acredita-se que: (a) uma faixa de carga preferencial para as

variantes da protease para água fria GG36 da série I a ser usada nas soluções de detergente para lavagem de roupas de baixa condutividade é -5, -4, -3, -2, -1, 0, particularmente, -2, -1; e (b) a faixa de carga preferencial para as variantes da protease para água fria GG36 da série I a ser usada nas soluções de detergente para lavagem de roupas de alta condutividade é +5, +4, +3, +2, +1, 0, particularmente, +2, +1. A seleção correta da carga, pode levar a níveis inesperadamente aprimorados de desempenho de limpeza em água fria. "Soluções de detergente para lavagem de roupas de baixa condutividade" são definidas como tendo uma condutividade de cerca de 0,1 mS/cm a cerca de 3 mS/cm, de cerca de 0,3 mS/cm a cerca de 2,5 mS/cm, ou mesmo de cerca de 0,5 mS/cm a cerca de 2 mS/cm. "Soluções de detergente para lavagem de roupas de alta condutividade" são definidas como tendo uma condutividade de cerca de 3 mS/cm a cerca de 30 mS/cm, de cerca de 3,5 mS/cm a cerca de 20 mS/cm, ou mesmo de cerca de 4 mS/cm a cerca de 10 mS/cm. Os exemplos acima não se destinam a limitar o escopo. Uma vez que mutações são combinadas para otimizar o desempenho em água fria, a carga da enzima também pode ser equilibrada por mutações em posições adicionais.

Métodos para fazer as variantes da protease para água fria GG36

[00596] Vários métodos adequados para gerar os polinucleotídeos modificados da invenção, que codificam as variantes da protease para água fria GG36 são conhecidos na técnica, incluindo, mas não se limitando a, por exemplo, mutagênese por saturação de sítio, mutagênese por varredura, mutagênese por inserção, mutagênese por deleção, mutagênese aleatória, mutagênese sítio-dirigida, e evolução dirigida, assim como várias outras abordagens recombinatórias. Métodos exemplificadores não limitadores para fazer as variantes da protease para água fria GG36 da série I são fornecidos na seção

acima intitulada "Vetores, células, e métodos para fazer os polipeptídeos da variante de protease da invenção."

[00597] Para testar a atividade enzimática em detergentes inativados por calor, soluções de trabalho dos detergentes são feitas a partir dos estoques inativados por calor. As quantidades adequadas de dureza da água (por exemplo, 6 gpg ou 12 gpg) e tampão são adicionados às soluções detergentes para se adequar às condições desejadas. As soluções são misturadas através de vortexação ou inversão dos frascos. A tabela a seguir fornece informações referentes a alguns dos detergentes comercialmente disponíveis e as condições de teste usadas aqui. Em alguns experimentos, detergentes adicionais e/ou outros detergentes comercialmente disponíveis podem ser usados nos exemplos a seguir.

Tabela A. Condições de lavagem de roupas e louças							
Região	Forma	Dose	Detergente*	Tampão	Gpg	pH	T (°C)
Lavanderia (líquido e granular para tarefas pesadas)							
NA	HDL	0,78 g/l	P&G TIDE® 2X	HEPES a 5 mM	6	8,0	20
WE	HDL	5,0 g/L	Henkel PERSIL™	HEPES a 5 mM	12	8,2	40
WE	HDG	8,0 g/L	P&G ARIEL®	Na ₂ CO ₃ a 2 mM	12	10,5	40
JPN	HDG	0,7 g/L	P&G TIDE®	Na ₂ CO ₃ a 2 mM	6	10,0	20
NA	HDG	1,0 g/L	P&G TIDE®	Na ₂ CO ₃ a 2 mM	6	10,0	20
Lavagem de louças automática							
WE	ADW	3,0 g/L	RB CALGONIT™	Na ₂ CO ₃ a 2 mM	21	10,0	40
NA	ADW	3,0 g/L	P&G CASCADE®	Na ₂ CO ₃ a 2 mM	9	10,0	40

[00598] Em alguns exemplos adicionais, as seguintes soluções podem ser usadas:

Tabela B Soluções detergentes de trabalho						
Detergente	Temp (C)	Detergente g/L	pH	Tampão	Gpg	
TIDE® 2X Frio	16	0,98	8	5 mM de HEPES	6	
TIDE® 2X Frio	32	0,98	8	5 mM de HEPES	6	
TIDE® 2X Frio	16	0,98	7	5 mM de MOPS	6	

[00599] A tabela C fornece composições detergentes granulares para lavagem de roupas produzidas de acordo com a invenção adequadas para a lavagem de tecidos.

Tabela C. Composições detergentes granulares para lavagem de roupas e seus componentes						
Componente	Composições detergentes					
	1	2	3	4	5	6
Alquilbenzenossulfonato linear com comprimento de cadeia de carbono alifático C ₁₁ -C ₁₂	15	12	20	10	12	13
Outros tensoativos	1,6	1,2	1,9	3,2	0,5	1,2
Builder(s) à base de fosfato	2	3	4			
Zeólito		1		1	4	1
Silicato	4	5	2	3	3	5
Carbonato de sódio	2	5	5	4	0	3
Poliacrilato (peso molecular 4500)	1	0,6	1	1	1,5	1
Carbóxi metilcelulose (Finnfix BDA disponível junto a CPKelco)	1	-	0,3	-	1,1	-
Celluclean® (15,6 mg/g)	0,23	0,17	0,5	0,2	0,2	0,6
Variante de protease para água fria*	0,23	0,17	0,05	0,2	0,03	0,1
Stainzyme Plus® (14 mg/g)	0,23	0,17	0,5	0,2	0,2	0,6
Mannaway 4,0T (4 mg/g)	0,1			0,1		0,1
Lipex 100T (18,6 mg/g)	0,2		0,1		0,3	
Alvejante(s) fluorescente(s)	0,16	0,06	0,16	0,18	0,16	0,16

⁵O corante tonalizante de tiofeno etoxilado é conforme descrito no documento US 7.208.459 B2.

[00600] Na tabela C, todos os níveis enzimáticos são expressos como% de matéria prima de enzima, com exceção da variante de protease para água fria (desta invenção) que é expressa como% da proteína ativa adicionada ao produto. A tabela D fornece composições detergentes granulares para lavagem de roupas adequadas para máquinas de lavar automáticas de carregamento superior (composições detergentes 7 a 9) e máquinas de lavar de carregamento frontal (composições detergentes 10 a 11). A variante de protease GG36 testada e/ou a variante de protease para água fria da presente invenção é adicionada separadamente a estas formulações.

Tabela D. Composições detergentes granulares para lavagem de roupas e seus componentes

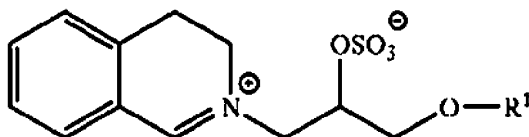
Componente	Composição detergente				
	7	8	9	10	11
Tensoativos					
sulfato de C ₁₆₋₁₇ alquila ramificado	3,55	15,8			
Sulfato de C ₁₂₋₁₄ alquila			1,5		
Alquilbenzeno sulfonato de sódio linear com comprimento de cadeia alifática C ₁₁ -C ₁₂	9,6		10,6	7,5	9
C _{14/15} álcool etóxi-3-sulfato de sódio	1,15			2,88	
C _{14/15} alquil sulfato de sódio	2,37				
C _{14/15} álcool etoxilato com média de 7 mols de etoxilação				1,17	1
cloreto de mono-C ₈₋₁₀ alquil mono-hidróxi etil dimetil amônio quaternário					0,45
Cloreto de dimetil hidroxietil lauril amônio			0,18		
Zeólito A	13,9	4,7	0,01	2,9	1,8
Silicato de sódio razão 1,6	4	0,2		4	4
Silicato de sódio razão 2,35			8		
Ácido cítrico				2,5	1,4
Tripolifosfato de sódio			5		
Carbonato de sódio	24,1	30	16,9	24,4	21

Tabela D. Composições detergentes granulares para lavagem de roupas e seus componentes

Componente	Composição detergente				
	7	8	9	10	11
Nonanoilóxi benzenossulfonato	5,78	2,81	0,96		
Reforço alvejante à base de oxaziridínio				0,03	0,017
S,S-etilenodiamina dissuccinato tetrassódico				0,2	
dietilenodiamina penta(ácido metileno fosfônico), sal heptassódico	0,61				0,33
ácido hidroxietano dimetileno fosfônico				0,29	0,45
Tetra-acetato de etilenodiamina			0,27		
MgSO ₄			0,47	0,5994	0,782
Percarbonato sódio	7	4,4		15,9	19,1
Tetra-acetil etilenodiamina				3,3	4,6
Perborato de sódio mono-hidratado			1,2		
Carbóxi metil celulose (por exemplo, Finnfix BDA disponível junto a CPKelco)	0,1		0,17	1,69	0,23
copolímero de ácido acrílico de sódio/ácido maleico (70/30)	0,0236	3,8		2	2,5
Poliacrilato de sódio (Sokalan PA30 CL)	4		0,84		
Polímero de tereftalato				0,23	
copolímero enxertado aleatório de polietileno glicol/acetato de vinila			0,89	0,89	0,91
fotobranqueador-ftalocianina tetrassulfonato de zinco			0,005	0,001	0,002
C.I. Alvejante fluorescente 260	0,11	0,15	0,04	0,23	0,15
C.I. Alvejante fluorescente 351 (Tinopal® CBS)			0,1		
supressor de espuma granular		0,25		0,07	0,04
carbóxi metil celulose hidrofobicamente modificada (Finnifix® SH-1)			0,019	0,028	
Bentonita			8,35		
Outros (corantes, perfumes, auxiliares de processamento, umidade e sulfato de sódio)	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.

[00601] Na tabela D, os ingredientes tensoativos podem ser obtidos

junto à qualquer fornecedor adequado, incluindo, mas não se limitando a BASF (por exemplo, LUTENSOL®), Shell Chemicals, Stepan, Huntsman, e Clariant (por exemplo, PRAEPAGEN®). O zeólito pode ser obtido junto a fontes como, por exemplo, Industrial Zeolite. O ácido cítrico e o citrato de sódio podem ser obtidos junto a fontes como, por exemplo, Jungbunzlauer. O percarbonato sódio, carbonato de sódio, bicarbonato de sódio e sesquicarbonato de sódio podem ser obtidos junto a fontes como, por exemplo, Solvay. Os copolímeros de acrilato/maleato podem ser obtidos junto a fontes como, por exemplo, BASF. A carbóxi metil celulose e carbóxi metil celulose hidrofobicamente modificada podem ser obtidas junto a fontes como, por exemplo, CPKelco. C.I. alvejante fluorescente 260 pode ser obtido junto à 3V Sigma (por exemplo, OPTIBLANC®, OPTIBLANC® 2M/G, OPTIBLANC® 2MG/LT Extra, ou OPTIBLANC® Ecobright. S,S-etilenodiamina dissuccinato tetrassódico pode ser obtido junto a fontes como, por exemplo, Innospec. O copolímero de tereftalato pode ser obtido junto à Clariant (por exemplo, REPELOTEX SF 2). Além disso, o ácido 1-hidroxietano-1,1-difosfônico pode ser obtido junto à Thermphos. O reforço alvejante à base de oxaziridínio tem a seguinte estrutura, na qual R1 = 2-butiloctila, e foi produzido de acordo com o documento US 2006/0089284A1.



[00602] As enzimas NATALASE®, TERMAMYL®, STAINZYME PLUS®, CELLUCLEAN® e MANNAWAY® podem ser obtidas junto à Novozymes. A ftalocianina tetrassulfonato de zinco pode ser obtida junto à Ciba Specialty Chemicals (por exemplo, TINOLUX® BMC). O supressor de espuma granular pode ser obtido junto à Dow Corning. Nestas composições detergentes, o copolímero enxertado aleatório é um copolímero de óxido de polietileno enxertado e acetato de polivinila

que tem uma cadeia principal de óxido de polietileno e múltiplas cadeias laterais de acetato de polivinila. O peso molecular da cadeia principal de óxido de polietileno é cerca de 6000 e a razão entre o peso do óxido de polietileno e o peso do acetato de polivinila é cerca de 40 a 60 e não mais que 1 ponto de enxertia por 50 unidades de óxido de etileno.

Exemplos da parte II

Exemplo 1

Ensaaios e métodos de teste

[00603] Este exemplo descreve os vários métodos de teste e ensaios usados no desenvolvimento das variantes descritas nestes exemplos. Quaisquer desvios dos protocolos fornecidos são indicados nos exemplos pertinentes. Os ensaios foram feitos usando um robô Biomek FX (Beckman Coulter) ou um pipetador multicanal (por exemplo, Rainin PipetLite, Mettler-Toledo) e um leitor de MTP SpectraMAX (tipo 340; Molecular Devices).

A. Métodos de Teste

Método de teste 1

[00604] Um protocolo para definir se um corante ou material de pigmento é um agente de tonalização de tecido com o propósito da invenção é fornecido abaixo:

1) Encha dois recipientes de tergotômetro com 800 ml de água Newcastle upon Tyne, UK, City Water (~12 grãos por galão americano de dureza total, fornecida pela Northumbrian Water, Pity Me, Durham, Co. Durham, Reino Unido).

2) Insira os recipientes no tergotômetro, com a temperatura da água controlada a 30°C e agitação ajustada a 40 rpm pela duração do experimento.

3) Adicione 4,8 g de detergente IEC-B (detergente-base de referência tipo B para máquina de lavar IEC 60456), fornecido pela

wfk, Brügggen-Bracht, Alemanha, a cada recipiente.

4) Após dois minutos, adicione 2,0 mg de corante ativo ao primeiro recipiente.

5) Após um minuto, adicione 50 g de uma roupa de algodão puro (fornecida pela Warwick Equest, Consett, County Durham, Reino Unido), cortada em amostras de 5 cm x 5 cm, a cada recipiente.

6) Após 10 minutos, drene os recipientes e encha novamente com água fria (16°C) com uma dureza da água de 14,4 graus Clark de dureza inglesa com uma razão molar entre cálcio e magnésio de 3:1.

7) Após enxágue de 2 minutos, remova os tecidos.

8) Repita as etapas 3 a 7 por mais três ciclos usando os mesmos tratamentos.

9) Colete e seque os tecidos pendurados em ambiente interno durante 12 horas.

10) Analise as amostras usando um espectrômetro Hunter Miniscan equipado com um iluminador D65 e filtro de corte de UVA, para obter valores de Hunter a (eixo vermelho-verde) e Hunter b (eixo amarelo-azul).

11) Faça a média dos valores Hunter a e Hunter b para cada conjunto de tecidos. Se os tecidos tratados com o corante em avaliação mostrarem uma diferença média no tom maior que 0,2 unidades no eixo a ou no eixo b, ele é considerado um agente de tonalização de tecido para os propósitos da invenção.

Método de teste 2

[00605] Para o método de teste 2, o teste em amostras de tecido com SLT fornecido abaixo é executado usando a composição detergente granular 10 (vide Tabela D acima). O detergente para lavagem de roupas é dissolvido em água com uma dureza de 12 gpg e é ajustado para uma temperatura de 16°C, e a enzima variante de

protease de interesse é adicionada. O desempenho das enzimas variantes de protease é então determinado de acordo com o teste em amostras de tecido com SLT descrito. O índice de desempenho é determinado pela comparação do desempenho da enzima variante de protease com o da enzima subtilisina GG36 de *B. lentus* que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID nº 755, em todos os casos, com a dosagem da enzima sendo de 1,6 ppm. As enzimas variantes de protease que possuem um índice de desempenho de 1,1 ou mais são vistas como variantes de protease para água fria.

Método de teste 3

[00606] Para o método de teste 3, o teste em amostras de tecido com SLT fornecido abaixo é executado usando a composição detergente granular para lavagem de roupas 7 (vide Tabela D acima). O detergente para lavagem de roupas é dissolvido em água com uma dureza de 6 gpg e é ajustado para uma temperatura de 16°C, e a enzima variante de protease GG36 é adicionada. O desempenho das enzimas variantes de protease GG36 é então determinado de acordo com o teste em amostras de tecido com SLT descrito. O índice de desempenho é determinado pela comparação do desempenho da enzima variante de protease GG36 com o da enzima subtilisina GG36 de *B. lentus* que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID nº 755, em todos os casos, com a dosagem da enzima sendo de 4 ppm. As enzimas variantes de protease GG36 que possuem um índice de desempenho de 1,1 ou mais são vistas como variantes de protease para água fria.

Método de teste 4

[00607] Para o método de teste 4, o teste em amostras de tecido com SLT fornecido abaixo é executado usando a composição detergente granular para lavagem de roupas 7 (vide Tabela D acima). O detergente para lavagem de roupas é dissolvido em água com uma

dureza de 6 gpg e é ajustado para uma temperatura de 16°C, e a enzima variante de protease GG36 é adicionada. O desempenho das enzimas variantes de protease GG36 é então determinado de acordo com o teste em amostras de tecido com SLT descrito. O índice de desempenho é determinado pela comparação do desempenho da enzima variante de protease GG36 com o da enzima GG36-A158E, de referência, a dita enzima GG36-A158E de referência consistindo na sequência de aminoácidos da protease GG36 subtilisina de *B. lentus* da SEQ ID nº 755 com uma única substituição de alanina por ácido glutâmico na posição 158 (isto é, a mutação A158E), em todos os casos, com a dosagem da enzima sendo de 4 ppm. As enzimas variantes de protease GG36 que possuem um índice de desempenho de 1,0 ou mais são vistas como variantes de protease para água fria.

Método de teste 5

[00608] A condutividade elétrica de uma solução aquosa é testada de acordo com o método padrão ASTM D1125 e relatada em unidades de milliSiemens/cm, abreviada aqui como mS/cm.

B. Testes

Teste de TCA para a determinação do teor de proteína em placas de microtitulação de 96 poços

[00609] Para as variantes de GG36 e GG36, este teste foi iniciado usando sobrenadantes da cultura de *B. subtilis* filtrados a partir de placas de microtitulação cultivadas 2 a 3 dias a 37 °C com agitação a 250 rpm e aeração úmida. Uma nova placa de microtitulação (MTP) de 96 poços de fundo plano (MTP; placa de poliestireno transparente de ligação ao meio Costar 9017) foi usada para o teste. Primeiro, 100 µL/poço de HCl 0,25 N foi colocado em cada poço. A seguir, 20 a 25 µL do sobrenadante da cultura filtrado foram adicionados e a solução foi misturada sobre um misturador de bancada (por exemplo, Lab line Instruments, agitador de placa de titulação, modelo 4825) durante 5 a

10 segundos. A dispersão de luz/absorbância a 405 nm foi, então, determinada de modo a fornecer a leitura "em branco". Para a leitura do "teste", 100 µL/poço de ácido tricloroacético (TCA) 30% (p/v) foi adicionado a cada poço contendo a mistura de HCl e sobrenadante da cultura, e a placa foi incubada durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após misturar brevemente a solução sobre um misturador de bancada por não mais que 2 a 3 seg, a dispersão de luz/absorbância a 405 nm foi determinada. O aumento de turvação/dispersão de luz nas amostras está correlacionado com a quantidade total de proteína precipitável no sobrenadante da cultura. Os cálculos foram feitos por subtrair a leitura em "branco" (obtida após a adição apenas de HCl, sem TCA) da leitura de "teste" (obtida após a adição de TCA, conforme descrito acima) para fornecer uma medida relativa do teor de proteína nas amostras. Se desejado, uma curva padrão pode ser criada por calibrar as leituras de TCA com testes de AAPF dos clones com fatores de conversão conhecidos. Entretanto, os resultados de TCA são lineares com relação à concentração de proteína de 50 a 500 partes por milhão (ppm) de proteína (onde 1 ppm corresponde à 1 mg/mL) e podem então ser plotados diretamente contra o desempenho da enzima com o propósito de escolher variantes com o desempenho desejado.

Teste AAPF para protease em placas de microtitulação de 96 poços

[00610] De modo a determinar a atividade de protease das variantes de serina protease, mediu-se a hidrólise de N-succinil-L-alanil-L-alanil-L-prolil-L-fenil-p-nitroanilida (suc-AAPF-pNA). As soluções reagentes usadas foram: 100 mM de Tris/HCl, pH 8,6, contendo 0,005% de TWEEN®-80 (tampão de diluição Tris); 100 mM de tampão Tris, pH 8,6, contendo 1 mM de CaCl₂ e 0,005% de TWEEN®-80 (tampão de Tris/Ca); e 160 mM de suc-AAPF-pNA em DMSO (solução de estoque de suc-AAPF-pNA) (Sigma: S-7388). Para

preparar uma solução de trabalho de suc-AAPF-pNA, 1 ml de solução de estoque de suc-AAPF-pNA foi adicionada a 100 ml de tampão de Tris/Ca e misturada bem por pelo menos 10 segundos. O teste foi feito pela adição de 10 ml de solução de protease diluída a cada poço de uma MTP de 96 poços, imediatamente seguida da adição de 190 µl de solução de trabalho de suc-AAPF-pNA a 1 mg/ml. As soluções foram misturadas durante 5 seg., e a alteração de absorbância no modo cinético (25 leituras em 5 minutos) foi lida a 405 nm em um leitor MTP, a 25°C. A atividade da protease foi expressa como AU (atividade = $\Delta\text{OD} \cdot \text{min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$).

Teste de inibição de eglina C

[00611] Conforme descrito na presente invenção, a concentração e a atividade específica da serina protease foram determinadas por titulação com um inibidor chamado eglina c. A eglina c do parasita *Hirudo medicinalis* é um inibidor de proteína com forte ligação a subtilisinas e protease ASP (Heinz et al., Biochemistry, 31: 8755-66 [1992]), e pode, portanto, ser usada para medir a concentração da enzima protease, que, por sua vez, permite o cálculo da atividade específica. O gene para eglina c foi sintetizado e expresso em *E. coli* por métodos-padrão. Suas propriedades e potência inibitória foram iguais as da eglina c comprada da Sigma.

(i) Determinação da concentração de uma solução de estoque de Eglina C

[00612] Uma amostra de subtilisina de *Bacillus lentus* de atividade específica conhecida foi diluída em tampão Tris 100 mM, pH 8,6, contendo CaCl_2 1 mM e 0,005% de TWEEN®-80 (tampão de Tris/Ca), até uma concentração adequada para o teste AAPF de protease descrito acima. Várias diluições da solução de estoque de eglina c também foram feitas no tampão de Tris/Ca. Uma alíquota de cada solução de eglina c diluída foi misturada com um volume igual da

solução de subtilisina de *Bacillus lentus* diluída. Uma alíquota do tampão de Tris/Ca sozinho, sem eglina c, também foi misturada com um volume igual da solução de subtilisina de *Bacillus lentus* diluída, de modo a medir a atividade de subtilisina não inibida na ausência de eglina c. As soluções misturadas foram incubadas à temperatura ambiente durante 15 a 30 minutos e a atividade da protease de cada amostra foi, então, medida pelo teste AAPF descrito acima. Usando a atividade específica conhecida da subtilisina de *Bacillus lentus*, determinou-se a concentração da protease ativa em cada amostra. A concentração de eglina c em cada amostra foi, então, calculada com base na redução da atividade da protease observada em comparação à amostra de subtilisina não inibida que foi misturada apenas com tampão de Tris/Ca (sem eglina c). Desta forma, usando as diluições e volumes conhecidos das soluções de eglina c, determinou-se a concentração da eglina c na solução de estoque.

(ii) Determinação da concentração e atividade específica das variantes de subtilisina

[00613] Amostras de variantes de subtilisina foram diluídas em tampão Tris 100 mM, pH 8,6, contendo CaCl_2 1 mM e 0,005% de TWEEN®-80 (tampão de Tris/Ca). Várias diluições da solução de estoque de eglina c de concentração conhecida também foram feitas no tampão de Tris/Ca. Uma alíquota de cada solução de eglina c diluída foi misturada com um volume igual de uma solução de variante de subtilisina. As soluções misturadas foram incubadas à temperatura ambiente durante 15 a 30 minutos e a atividade da protease de cada amostra foi, então, medida pelo teste AAPF. Usando a redução da atividade da protease observada pela adição de cada amostra de eglina c e a concentração conhecida da eglina c, calculou-se a concentração da eglina c necessária para a inibição completa de cada variante da enzima subtilisina. Esta concentração é equivalente à concentração de

enzimas na amostra. Uma alíquota do tampão de Tris/Ca sozinho, sem eglina c, também foi misturada com cada amostra da variante de subtilisina e a atividade de protease na ausência de eglina c foi medida. A atividade específica das variantes de subtilisina foi, então, calculada usando as concentrações de enzima determinadas acima.

Teste em amostras de tecido com SLT

[00614] Pequenas amostras de tecido manchadas com sangue, leite e tinta (SLT) (EMPA116) com diâmetro circular de 5,5 milímetros foram obtidos a partir de CFT. Em um método, o tecido EMPA116 com SLT é pré-enxaguado em água antes de ser cortado em uma placa de microtitulação de 96 poços (Corning 3641), uma amostra de tecido por poço. No segundo método, o pano EMPA 116 é cortado diretamente em uma placa de microtitulação de 96 poços (Corning 3641) onde as amostras são, então, enxaguadas com duas lavagens com água. Os enxágues são executados pela adição de 200 µl de água Milli Q a cada poço/amostra e misturados em um misturador de bancada (Lab line instruments, agitador de placa de titulação, modelo 4825) durante 15 minutos na regulagem 7. O líquido de lavagem é removido e 200 µl de água são adicionados novamente à amostra por um enxágue de mais 15 minutos. A água de lavagem é removida e as amostras são, então, secas ao ar na placa de microtitulação.

[00615] As composições detergentes 7 a 11 foram diluídas em água Milli-Q (deionizada) até as concentrações de trabalho finais descritas na tabela 1-1. Estes detergentes foram tamponados com carbonato de sódio 2 mM, pH 10,3. Adicionalmente, uma composição de dureza da água (3:1 Ca:Mg. - CaCl_2 : $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) foi adicionada a cada solução detergente até a concentração final descrita na tabela 1-1. As soluções detergentes foram misturadas à temperatura ambiente durante 0,5 a 2 horas, centrifugadas em tubos cônicos de polipropileno de 50 mL a 3000xg durante 5 a 10 minutos e foram mantidas à temperatura ambiente durante

para os testes a 32°C ou foram pré-equilibradas em um banho de água gelada para os testes a 16°C. A seguir, 190 µl da solução detergente desejada foram adicionados a cada poço da MTP contendo as amostras de tecido com SLT. A esta mistura, adicionou-se 5 a 15 µl da solução de diluição mestre da enzima diluída, fornecendo uma concentração de enzimas aproximada de 0,25 a 2 µg/mL na reação. A solução da diluição mestre da enzima foi preparada a partir dos sobrenadantes da cultura filtrados (vide teste de TCA descrito acima) a ~2,5 a 20 µg/mL. A MTP foi lacrada com fita e colocada na incubadora/agitador iEMS (Thermo/Labsystems) pré-ajustada a 16°C em um refrigerador por 30 minutos ou a 32°C sobre a bancada durante 30 minutos, com agitação a 1400 rpm. Após a incubação sob as condições adequadas, 120 a 125 µl da solução de cada poço foram transferidos para uma nova MTP (Corning 9017). A nova MTP contendo 125 µl de solução/poço foi lida a 600 nm (com modo de mistura de 5 seg no leitor de placa) usando um leitor MTP SpectraMax. Os controles em branco contendo uma pequena amostra de tecido e o detergente, sem enzima também foram incluídos. O valor da absorbância obtido foi corrigido para o valor em branco (substrato sem enzima), fornecendo uma medida da atividade hidrolítica. Para cada amostra (variante), o índice de desempenho foi calculado. O índice de desempenho compara o desempenho da variante (valor medido) e o de uma enzima padrão (valor teórico) na mesma concentração de proteína. Além disso, os valores teóricos podem ser calculados usando os parâmetros de uma curva dose-resposta de desempenho da protease padrão. Um índice de desempenho (PI) maior que 1 ($PI > 1$) identifica uma variante melhor em comparação a um padrão (por exemplo, selvagem), enquanto que um PI de 1 ($PI = 1$) identifica uma variante que tem o mesmo desempenho que o padrão e um PI menor que 1 ($PI < 1$) identifica uma variante que tem desempenho pior que o padrão. Desta forma, o PI identifica vencedores assim como variantes menos desejáveis para serem

usadas sob determinadas circunstâncias.

Tabela 1-1: Detergente final, dureza da água, e concentrações de tampão usadas para os testes em amostras de tecido com SLT			
Composição detergente	Concentração final do detergente (g/L)	Dureza da água final* (gpg)	Concentração final do tampão de carbonato de sódio (mM)
7	0,808	6	2
8	1	3	2
9	2,3	12	2
10	5,9	12	2
11	8,3	12	2

Teste de estabilidade em LAS/EDTA

[00616] A estabilidade das variantes de protease na presença de um tensoativo aniônico representativo (LAS=sulfonato de alquilbeno linear, dodecilbenzenossulfonato de sódio-DOBS) e EDTA dissódico é medida após incubação sob condições definidas e a atividade residual é determinada usando o teste AAPF descrito acima. Os reagentes usados foram sal de sódio de sulfonato de dodecilbenzeno (DOBS; Sigma No. D-2525), TWEEN®-80 (Sigma No. P-8074), EDTA dissódico (Siegfried Handel No. 164599-02), HEPES (Sigma No. H-7523), tampão não submetido a estresse: HEPES 50 mM (11,9 g/l) + 0,005% de TWEEN®-80, pH 8,0, tampão de estresse: HEPES 50 mM (11,9 g/l), 0,1% (p/v) DOBS (1 g/l), EDTA 10 mM (3,36 g/l), pH 8,0, sobrenadantes da cultura da protease de referência e da variante de protease contendo 200 a 400 µg/ml de proteína. O equipamento usado foram MTPs de fundo V ou U como placas de diluição (Greiner 651101 e 650161, respectivamente), MTPs de fundo F (Corning 9017) para tampão não submetido a estresse e tampão LAS/EDTA assim como para as placas com suc-AAPF-pNA, Biomek FX (Beckman Coulter), leitor de placas Spectramax Plus 384 (Molecular Devices), incubadora/agitador iEMS (Thermo /Labsystems).

[00617] A incubadora/agitador iEMS (Thermo/Labsystems) é

ajustada para 29°C. Os sobrenadantes da cultura foram diluídos nas placas contendo tampão não submetido a estresse até uma concentração de ~ 25 ppm (placa de diluição mestre). Para o teste, 20 µl de amostra da placa de diluição mestre foram adicionados a placas contendo 180 µl de tampão não submetido a estresse para fornecer uma concentração final de incubação de 2,5 ppm. Os conteúdos foram misturados e mantidos à temperatura ambiente e um teste AAPF foi feito nesta placa. Além disso, 20 µl de amostra da placa de diluição mestre também foram adicionados às placas contendo 180 µl de tampão de estresse (HEPES 50 mM (11,9 g/l), 0,1% (p/v) de DOBS (1 g/l), EDTA 10 mM (3,36 g/l), pH 8,0). As soluções foram misturadas e colocadas imediatamente em um agitador iEMS a 29°C durante 30 min a 400 rpm. Após 30 minutos de incubação, o teste AAPF foi feito na placa sob estresse. A estabilidade das amostras é determinada pelo cálculo da razão entre a atividade de AAPF residual e inicial, da seguinte forma: Atividade residual (%) = $[mOD.min^{-1} \text{ sob estresse}] * 100 / [mOD.min^{-1} \text{ sem estresse}]$.

[00618] O detergente final, a dureza da água e as concentrações de tampão são determinadas com base no sistema de teste a ser usado (por exemplo, condições norte-americanas, japonesas, da Europa Ocidental, ou da Europa Central). Em alguns aspectos, o desempenho de remoção de manchas das variantes de protease é determinado em detergentes comercialmente disponíveis. A inativação por calor de fórmulas detergentes comerciais serve para destruir a atividade enzimática de quaisquer componentes de proteína, mas mantendo as propriedades de componentes não enzimáticos. Desta forma, este método é adequado para preparar detergentes adquiridos comercialmente para uso no teste das variantes de enzima da presente invenção.

Teste de microtitulação com ovo cozido

[00619] Para este teste, placas de 96 poços com substrato de gema de ovo cozida são preparadas a partir de gemas de ovo de galinha. Gemas de ovo de galinha são separadas das claras, liberadas da membrana vitelínica e diluídas a 20% (vol/peso) com água Milli-Q. A gema diluída é agitada durante 15 minutos à temperatura ambiente usando um agitador magnético. Cinco μL são cuidadosamente pipetados no centro de cada poço de uma placa de fundo V de 96 poços (Costar No.3894) usando uma pipeta de 8 canais. As placas são cozidas a 90°C durante 1 hour e resfriadas à temperatura ambiente. As placas com substrato de gema de ovo cozida são armazenadas à temperatura ambiente e usadas dentro de uma semana após a preparação. Detergentes para lavagem automática de pratos são preparados conforme descrito na presente invenção e pré-aquecidos até 50°C. Uma alíquota de 190 μL de detergente é adicionada a cada poço de uma placa de 96 poços usando uma pipeta de 8 canais. Dez μL de enzima diluída são adicionados a cada poço usando um dispositivo de pipetagem de 96 canais. A placa é cuidadosamente lacrada com uma seladora de folha adesiva e incubada a 50°C com agitação durante 30 min. 120 μL da mistura de reação são transferidos para uma nova placa de fundo plano de 96 poços, e a absorbância/dispersão de luz é determinada a 405 nm. A absorbância/dispersão de luz a 405 nm é proporcional à remoção de gema de ovo.

Teste em pequena amostra de tecido com gema de ovo ("Teste em pequena amostra de tecido CS-38"; ou "OVO" ou "Prato")

[00620] Os detergentes para lavagem automática de pratos são preparados conforme descrito na presente invenção. O equipamento usado incluiu um agitador/incubadora New Brunswick Innova 4230 e um leitor de placas SpectraMAX (tipo 340). As MTPs são obtidas junto à Costar (tipo 9017). Amostras de gema de ovo envelhecida com pigmento (CS-38) são obtidas junto ao Center for Test Materials (Vlaardingen, Amsterdam). Antes de cortar pequenas amostras de

tecido circulares de 0,64 cm (0,25 polegada), o tecido é lavado com água. Uma pequena amostra de tecido é colocada em cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços. Um detergente de teste é equilibrado a 50°C. 190 µl da solução detergente são adicionados a cada poço da MTP contendo as pequenas amostras de tecido. A esta mistura, adicionou-se 10 µl da solução de diluição de enzima diluída. A MTP é lacrada com folha adesiva e colocada na incubadora durante 30 minutos, com agitação. Após a incubação, 100 µl da solução de cada poço são transferidos para uma MTP nova. Esta MTP é lida a 405 nm usando um leitor de placas SpectraMax. Controles em branco assim como controles contendo uma pequena amostra de tecido e detergente, mas sem enzima também foram incluídos.

[00621] Em alguns aspectos, amostras de tecido pré-lavadas podem ser usadas. Este tipo de amostra é pré-lavada em água deionizada durante 20 minutos à temperatura ambiente. Após a etapa de pré-lavagem, as amostras são colocadas sobre toalhas de papel para secar. As amostras secas ao ar são, então, perfuradas usando uma matriz circular de ¼" em uma prensa de expulsão. Finalmente, duas amostras de tecido são colocadas verticalmente em cada poço de uma MTP de 96 poços para expor toda a área superficial (isto é, não são colocadas em posição horizontal no fundo do poço).

[00622] As amostras das variantes de protease a serem testadas são obtidas a partir de caldo de cultura filtrado das culturas cultivadas nas placas MTP. Os equipamentos usados são Biomek FX Robot (Beckman Coulter), leitor de placas SpectraMAX (tipo 340; Molecular Devices), incubadora/agitador iEMS (Thermo/Labsystems); MTPs de fundo F (Costar tipo 9017 usadas para ler as placas reação após a incubação); e MTPs de fundo V (Greiner 651101 usadas para pré-diluição do sobrenadante). Neste teste, as proteases hidrolisam o substrato e liberam pigmento e partículas insolúveis a partir do substrato. Desta

forma, a taxa de turvação é uma medida da atividade enzimática.

[00623] O desempenho de remoção de manchas das serina proteases de referência e suas variantes nas pequenas amostras de tecido é determinado em uma escala de MTP em um detergente disponível para comercialização (Calgonit 5 em 1). As amostras de tecido CS-38 (gema de ovo com pigmento, envelhecida por aquecimento), obtidas junto à CFT Vlaardingen são usadas como substrato. Duas amostras são usadas por poço. Tabletes de ADW da Calgonit 5 em 1 são usados para preparar a solução detergente. Para inativar a atividade da protease presente nos tabletes, um tablete de 21 g é dissolvido em água Milli-Q aquecida em um banho-maria até uma temperatura de 60°C. A solução é resfriada até a temperatura ambiente e o volume de água é ajustado para 700 mL. A solução é diluída adicionalmente em água para atingir uma concentração final de 3 g/l. A dureza da água é ajustada para 21°GH pela adição de 1,46 ml da mistura de Ca/Mg (mistura de Ca/Mg [(3:1), 1,92 M de $\text{CaCl}_2 = 282,3$ g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,64 M de $\text{MgCl}_2 = 130,1$ g/L de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 15000 gpg]. As amostras de enzima são pré-diluídas em NaCl 10 mM, CaCl_2 0,1 mM, 0,005% de solução de TWEEN®-80 e testadas nas concentrações adequadas.

[00624] A incubadora é ajustada para a temperatura desejada de 50°C. 72 µl de tampão de diluição são adicionados à placa de fundo V vazia (isto é, uma "placa de diluição") seguido de 8 µl de sobrenadante. 9 µl provenientes da placa diluição são adicionados às placas contendo as pequenas amostras de tecido incubadas em 171 µl de solução detergente. 9 µl provenientes da placa diluição são adicionados às placas contendo as pequenas amostras de tecido para fornecer uma diluição total de sobrenadante de 200X. A placa da amostra (com detergente e enzima) é coberta com fita e colocada na incubadora/agitador durante 30 minutos a 1400 rpm. Após a

incubação, 75 µl da mistura de reação são transferidos para uma placa de fundo F vazia e a absorbância é lida em um leitor de MTP a 405 nm após remoção de bolhas com um secador de cabelo. Os controles em branco, contendo uma ou duas amostras de tecido e detergente sem a adição de amostras contendo protease de referência também são incluídos no teste.

[00625] O valor da absorbância obtido é corrigido para o valor em branco (substrato sem enzima), fornecendo uma medida da atividade hidrolítica. Para cada amostra (variante), o índice de desempenho é calculado. O índice de desempenho compara o desempenho da variante (valor real) e o de uma enzima padrão (valor teórico) na mesma concentração de proteína. Além disso, os valores teóricos podem ser calculados usando os parâmetros de uma equação de Langmuir da enzima padrão.

Manchas de gema de ovo em aço inoxidável

[00626] As folhas de aço inoxidável (10 x 15 cm; escovadas de um dos lados) usadas nestes experimentos são cuidadosamente lavadas a 95°C em uma lava-louças laboratorial com um detergente comercial com alta alcalinidade (por exemplo, detergente ECOLAB®; Henkel) para fornecer folhas limpas e sem gordura. As rebarbas destas são folhas removidas antes do primeiro uso. As folhas são secas durante 30 minutos a 80°C em um gabinete térmico antes de serem sujas com gema de ovo. As superfícies que serão pinceladas não são tocadas antes de serem sujas. Além disso, não são permitidas manchas de água ou penugens sobre as superfícies. As folhas resfriadas são pesadas antes de serem sujas.

[00627] As gemas de ovo são preparadas por separar as gemas de aproximadamente 10 a 11 ovos (200 g de gema de ovo) das claras. As gemas são agitadas com um garfo em um béquer de vidro para homogeneizar a suspensão de gemas. As gemas são, então, filtradas

(malha de aproximadamente 0,5 mm) para remover partículas grosseiras e quaisquer fragmentos da casca do ovo.

[00628] Um pincel plano (6,4 cm (2,5")) é usado para aplicar $1,0 \pm 0,1$ g de suspensão de gema de ovo da forma mais uniforme possível sobre uma área de 140 cm^2 sobre os lados escovados de cada uma das folhas de aço inoxidável, deixando uma margem limpa de aproximadamente 1 cm de largura (fita adesiva é usada, se necessário). As folhas sujas são secas horizontalmente (para evitar a formação de gotículas sobre as bordas das folhas), à temperatura ambiente durante 4 horas (máx. 24 h).

[00629] Para desnaturação, as folhas são imersas durante 30 segundos em água desmineralizada fervente (usando um dispositivo de retenção, se necessário). A seguir, as folhas são secas novamente durante 30 min a 80°C . Após secagem e resfriamento, as folhas são pesadas. Após a pesagem, as folhas são reservadas por pelo menos 24 horas (20°C , 40 a 60% de umidade relativa) antes de serem submetidas ao teste de lavagem. De modo a satisfazer os requisitos do teste, apenas as folhas com $500 \pm 100 \text{ mg}/140 \text{ cm}^2$ (gema de ovo após desnaturação), são usadas no teste. Após os testes de lavagem serem conduzidos, as folhas são secas durante 30 min a 80°C no gabinete térmico e pesadas novamente após o resfriamento. O percentual de desempenho de limpeza é determinado por dividir (mg de gema de ovo liberados pela lavagem x 100) por (mg de gema de ovo desnaturada aplicados).

Carne moída sobre pratos de porcelana

[00630] Para estes experimentos, pratos de sobremesa (porcelana branca vitrificada Arzberg) que se adequam à norma EN 50242, forma 1495, nº 0219, 19 cm de diâmetro são usados. Um total de 225 g de carne magra de porco e de boi (50% de cada) são finamente cortadas e resfriadas, após remoção da gordura visível. A mistura é passada

duas vezes por um moedor. Temperaturas acima de 35°C são evitadas. A seguir, 225 g da carne moída são misturados com 75 g de ovo (clara e gema misturadas). A preparação é então congelada por até três meses a -18°C, antes do uso. Se carne de porco não estiver disponível, carne bovina é usada.

[00631] A mistura de carne moída e ovo (300 g) é levada até a temperatura ambiente e misturada com 80 ml de água sintética. A mistura é então homogeneizada usando um misturador de cozinha manual durante 2 minutos. A seguir, um garfo é usado para espalhar 3 g da mistura de carne/ovo/água sobre cada prato de porcelana branca, deixando uma margem limpa de aproximadamente 2 cm de largura em torno da borda. A quantidade aplicada é de $11,8 \pm 0,5 \text{ mg/cm}^2$. Os pratos são secos durante 2 horas a 120°C em um gabinete térmico pré-aquecido. Assim que os pratos estiverem frios, eles estão prontos para uso. Os pratos são empilhados com toalhas de papel entre eles.

[00632] Após a lavagem, os pratos são pulverizados com solução de ninidrina (1% de etanol) para melhor identificação dos resíduos de carne moída. Para promover a reação da cor, os pratos são aquecidos durante 10 minutos a 80°C no gabinete térmico. A avaliação do desempenho de lavagem é feita por inspecionar visualmente as reações de cor dos resíduos de carne moída comparando com o catálogo fotográfico IKW (IKW).

Manchas de ovo/leite em aço inoxidável

[00633] As folhas de aço inoxidável (10 x 15 cm; escovadas de um dos lados) usadas nestes experimentos são cuidadosamente lavadas a 95°C em uma lava-louças laboratorial com um detergente comercial com alta alcalinidade para remover gordura e limpar as folhas. As folhas são polidas a seco com um pano de celulose. As superfícies que serão pinceladas não são tocadas antes de serem sujas. Além disso, não são permitidas manchas de água ou penugens sobre as

superfícies. Antes de serem sujas, as folhas são colocadas em um gabinete térmico a 80°C, durante 30 min. As folhas resfriadas são pesadas antes de serem sujas.

[00634] As gemas e claras de ovo de ovos crus inteiros (3 a 4 ovos; 160 g/ovo) são colocadas em uma vasilha e batidas com um batedor de ovos. A seguir, 50 ml de leite UHT semi-desnatado (1,5% de gordura, ultra-alta temperatura, homogeneizado) são adicionados à mistura. O leite e o ovo são misturados sem gerar espuma. Um pincel plano é usado para distribuir uniformemente $1,0 \pm 0,1$ g da mistura de ovo/leite sobre o lado escovado das folhas de aço inoxidável, usando uma balança para verificar a distribuição. Uma margem de aproximadamente 1,0 cm é deixada em torno dos lados curtos das folhas. As folhas sujas são secas horizontalmente (para evitar a formação de gotículas sobre as bordas das folhas), à temperatura ambiente durante 4 horas (máx. 24 h).

[00635] As folhas são imersas durante 30 segundos em água desmineralizada fervente (usando um dispositivo de retenção, se necessário). A seguir, as folhas são secas novamente durante 30 min a 80°C. Após secagem e resfriamento, as folhas são pesadas. Após a pesagem, as folhas são reservadas por pelo menos 24 horas (20°C, 40 a 60% de umidade relativa) antes de serem submetidas ao teste de lavagem. De modo a satisfazer os requisitos do teste, apenas as folhas com 190 ± 10 mg de gema de ovo são usadas.

[00636] Após os testes de lavagem serem conduzidos, as folhas são secas durante 30 min a 80°C no gabinete térmico e pesadas novamente após o resfriamento. O percentual de desempenho de limpeza é determinado por dividir (mg de ovo/leite liberados pela lavagem x 100) por (mg de ovo/leite aplicados).

Preparação da mancha de mistura de espaguete sobre pratos de porcelana

[00637] Molho de macarrão (390 g) é misturado com 150 g de macarrão espaguete cozido, 25 g de carne moída (composição IKW aprimorada- uma combinação de 225 gramas de carne moída sem gordura e 75 gramas de gema de ovo) e 50 g de queijo Grozette Formaggio. Uma colher é usada para espalhar 3 g desta mistura sobre cada prato de porcelana branca (porcelana vitrificada branca com 19 cm de diâmetro, Arzberg, em conformidade com a norma EN 50242, forma 1495, nº 0219) deixando uma margem limpa de aproximadamente 2 cm em torno da borda. Os pratos são secos aquecimento durante 2 horas a 120°C em um forno. Assim que os pratos estiverem frios, eles estão prontos para uso. Os pratos são empilhados com toalhas de papel entre eles para serem armazenados. Após a lavagem, os pratos são pulverizados com solução de iodo (0,05 N) para melhor identificação dos resíduos de carboidrato. A avaliação do desempenho da lavagem é feita por inspecionar visualmente as reações de cor dos resíduos de carboidrato comparando com o catálogo fotográfico IKW (IKW) e é classificada em uma escala de 0 a 10 (10 sendo limpo).

Índice de desempenho

[00638] O índice de desempenho compara o desempenho da variante (valor medido) e o de uma enzima padrão (valor teórico) na mesma concentração de proteína. Além disso, os valores teóricos podem ser calculados usando os parâmetros de uma curva dose-resposta de desempenho da protease padrão. Vários termos apresentados abaixo são usados para descrever a variante: variantes não prejudiciais possuem um PI >0,05; variantes prejudiciais possuem um PI = 0,05; variantes combináveis são aquelas para as quais a variante tem valores de índice de desempenho maiores que ou iguais a 0,2 para pelo menos uma propriedade, e >0,05 para todas as propriedades. As variantes combináveis são aquelas que podem ser combinadas para gerar proteínas com índices de desempenho

adequados para uma ou mais propriedades desejadas. Estes dados podem ser usados na manipulação de qualquer subtilisina/subtilase. Ainda que a subtilase a ser manipulada tenha um aminoácido diferente do da subtilisina GG36 em uma ou mais posições específicas, estes dados podem ser usados na identificação de substituições de aminoácido que irão alterar as propriedades desejadas pela identificação das melhores escolhas para substituições, incluindo substituições ao aminoácido de GG36 selvagem.

Exemplo 2

Geração de mutantes únicos de GG36 usando bibliotecas de avaliação de sítio (SELs)

[00639] A construção das SELs de GG36 descritas neste exemplo foi feita pela GENEART usando seus métodos patenteados e plataforma de tecnologia para otimização gênica, síntese de genes, geração de e análise bibliotecas (WO 2004/059556A3, patentes europeias n°s 0 200 362 e 0 201 184; e Patentes US n°s 4.683.195, 4.683.202 e 6.472.184). As SELs de GG36 foram produzidas nas posições pré-selecionadas pelos inventores usando o plasmídio de expressão pHPLT-GG36 de *B. subtilis* (vide figura 6). Este plasmídio de expressão de *B. subtilis* contém o cassete de expressão de GG36 mostrado abaixo, o promotor LAT (Plat) de *B. licheniformis*, e elementos adicionais de pUB110 (McKenzie et al., Plasmid, 15:93-103, 1986) incluindo um gene de replicase (reppUB), um gene de resistência à neomicina/canamicina (neo) e um marcador de resistência à bleomicina (bleo) (figura 4 na patente US 6.566.112). O mapa do plasmídio pHPLT-GG36 é fornecido na figura 6. A sequência do cassete de expressão de GG36 é fornecida abaixo.

[00640] A sequência de DNA de GG36 (a sequência de sinal é mostrada em letras minúsculas, o pró-peptídeo em letras minúsculas sublinhadas, e a sequência madura de GG36 em letras maiúsculas) é

forneceida abaixo:

Gtgagaagcaaaaaattgtggatcgctcgctcgaccgcactactcatttctgttgctttcagttcatc
gatcgcatcggctgctgaagaagcaaaagaaaaatattaattggctttaatgagcaggaagctg
tcagtgaagttttagaacaagtagaggcaaatgacgaggtcgccattctctctgaggaagagga
agtcgaaattgaattgcttcatgaatttgaaacgattcctgtttatccgttgagttaagcccagaaga
tgtggacgcgcttgagctcgatccagcgatttcttatattgaagaggatgcagaagtaacgacaat
gGCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGCCGTGTGCAAGCCCCAG
CTGCCATAACCGTGGATTGACAGGTTCTGGTGTAAGTTGCTG
TCCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGG
TGGCGCTAGCTTTGTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAA
TGGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGACGATTGCTGCTTTAAACA
ATTCGATTGGCGTTCTTGCGTAGCGCCGAGCGCGGAACACTATAC
GCTGTAAAGTATTAGGGGCGAGCGGTTTCAGGTTCCGGTCAGCTC
GATTGCCCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACG
TTGCTAATTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCAAGTGCCACACTTGA
GCAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGAGGCGTTCTTGTTGTAGC
GGCATCTGGAAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCC
GTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGACCAAACAACA
ACCGCGCCAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGGCTTGACATTGTGCG
CACCAGGTGTAAACGTGCAGAGCACATACCCAGGTTCAACGTATG
CCAGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTG
CAGCAGCCCTTGTTAAACAAAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTACA
AATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACGAGCTTAGGAAGCAC
GAACTTGTATGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCTGCAACTCG
TTAA (SEQ ID n° 756).

[00641] A sequência de proteína de GG36 (a sequência de sinal é mostrada em letras minúsculas, o pró-peptídeo em letras minúsculas sublinhadas, e a sequência madura da protease GG36 em letras maiúsculas) é fornecida abaixo:

vrskklwivastallisvafsssiassaaeeakekyligfneqeavsefveqveandevailseeev

eiellhefetipvlsvelspedvdaleldpaisyieedaevttmAQSVPWGISRVQAPAAH
 NRGLTGSGVKVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPTQDGNGHG
 THVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEW
 AGNNGMHVANLSLGSPSPSATLEQAVNSATSRGVLVVAASGNSGAG
 SISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFQYGAGLDIVAPGVNVQSTY
 PGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNVQIRNHLKNTAT
 SLGSTNLYGSGLVNAEAATR (SEQ ID n° 757).

[00642] O método de mutagênese se baseou na abordagem de mutação códon-específica na qual todas as possíveis substituições de aminoácido são criadas simultaneamente em um códon específico de interesse usando iniciadores mutagênicos de sentido direto e reverso que contêm um códon degenerado, NNS ((A,C,T ou G), (A,C,T ou G), (C ou G)) no sítio de interesse. Para construir cada uma das SELs de GG36, três reações de PCR foram feitas: duas reações de mutagênese (PCR1 e PCR2 primárias) para introduzir o códon mutado de interesse na sequência de DNA de GG36 madura usando os iniciadores mutagênicos NNS de sentido direto e reverso (25 a 45 nucleotídeos de extensão), e uma terceira reação para fundir os dois produtos de PCR mutagênicos juntos para construir o vetor de expressão pHPLT-GG36 que tem os códons mutados desejados na sequência madura de GG36.

As sequências dos iniciadores usados neste exemplo são fornecidas abaixo:

Tabela 2-1. Iniciadores	
Sequência	Nome do iniciador
CGCGCTT GAGCT CGATCCAGCGATTTC (SEQ ID n° 758)	SacI-Fw
GTCTCCA AAGCTT TAACGAGTTGCAG (SEQ ID n° 759)	HindIII-Rv
GCAATTCAG ATCTT CCTTCAGGTTATGACC (SEQ ID n° 760)	pHPLT-BglII-Fw
GCATCGA AAGATCT GATTGCTTAAGTCTTC (SEQ ID n° 761)	pHPLT-BglII-Rv

[00643] A DNA polimerase de alta fidelidade Phusion (n° de catálogo

da Finnzymes F-530L) foi usada para todas as reações de PCR, e as reações foram executadas de acordo com os protocolos do fabricante que foram fornecidos com a polimerase. Em particular, para a PCR 1 primária, 1 µL de (10 µM) de cada iniciador, iniciador pHPLT-BglII-Fw e iniciador de mutagênese reverso NNS, foi usado, e para a PCR 2 primária, 1 µL (10 µM) do iniciador pHPLT-BglII-Rv e um iniciador de sentido direto de mutagênese NNS foi usado. Cada reação também incluiu 1 µL do DNA molde do plasmídio pHPLT-GG36 (0,1 a 1 ng/ µL). As PCRs foram feitas usando um termociclador MJ Research PTC-200 Peltier. As reações geraram dois fragmentos de aproximadamente 2 a 3 kb tendo uma sobreposição de aproximadamente 30 nucleotídeos em torno do códon GG36 de interesse. Os fragmentos obtidos foram fundidos em uma terceira reação de PCR similar às descritas acima usando 1 µL da mistura de reação da PCR 1 primária, 1 µL da mistura de reação da PCR 2 primária e 1 µL (10 µM) de cada um dos iniciadores de sentido direto e reverso SacI-Fw e HindIII-Rv. O fragmento linear de 859 bp amplificado que codifica o gene da variante de GG36 foi purificado (usando o kit de purificação de PCR Qiaquick QIAGEN®) e digerido com as enzimas de restrição SacI e HindIII para criar extremidades coesivas em ambos os lados do fragmento de fusão. Cerca de 50 ng do plasmídio pHPLT-GG36 também foram purificados após digestão com SacI e HindIII, resultando em um fragmento da cadeia principal do vetor de 3,9 kb. O fragmento do vetor digerido foi ligado com 50 ng do fragmento de 859 bp digerido que codifica a enzima variante usando a DNA ligase T4 (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante para clonar as extremidades coesivas. Subsequentemente, a mistura de ligação foi usada para transformar células de *B. subtilis* ($\Delta aprE$, $\Delta nprE$, $oppA$, $\Delta spoII E$, $degU Hy32$, $\Delta amyE::[xylR,pxylA-comK]$) conforme descrito (WO 2002/014490).

[00644] Para expressar as proteínas variantes para análises bioquímicas adicionais, as cepas de *B. subtilis* carregando os plasmídios

com a variante GG36 foram inoculados em placas de microtitulação contendo 150 µl de caldo Luria suplementado com 10 µg/ml de neomicina. As placas foram cultivadas de um dia para o outro a 37°C com agitação a 300 rpm e 80% de umidade com o uso de tampas Enzyscreen para placas de microtitulação (Enzyscreen). Dez microlitros provenientes da placa de cultura de um dia para o outro foram usados para inocular uma nova placa de microtitulação contendo 190 µl de meio MBD (um meio definido à base de MOPS) com 10 µg/ml de neomicina. O meio MBD foi preparado essencialmente conforme conhecido na técnica (vide Neidhardt et al., J. Bacteriol. 119:736-747 [1974]), exceto que NH_4Cl_2 , FeSO_4 , e CaCl_2 foram omitidos do meio base, K_2HPO_4 3 mM foi usado, e o meio base foi suplementado com ureia 60 mM, e 100 ml de uma solução feita de 210 g/L de glicose, e 350 g/L de maltodextrina. Os micronutrientes foram supridos como uma solução de estoque 100X contendo em um litro, 400 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mg de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 10 ml de CaCl_2 1M e 10 ml de citrato de sódio 0,5 M. As placas de microtitulação contendo meio MBD foram cultivadas por 68 horas a 37°C, 300 rpm e 80% de umidade usando tampas Enzyscreen (Enzyscreen) para determinar a expressão de proteína. No dia seguinte, as culturas foram filtradas através de uma placa de microfiltro (0,22 µm; Millipore) e o filtrado resultante foi usado para análise bioquímica. Os testes nas amostras de TCA e SLT para as composições detergentes 7 a 11 foram executados conforme descrito no exemplo 1. Os índices de desempenho também foram calculados conforme descrito na descrição do teste SLT no exemplo 1, e eles são mostrados na tabela 2-2 com relação a GG36. Nas tabelas a seguir, as composições detergentes ("Det.") correspondem àquelas mostradas na tabela D, acima. Além disso, conforme indicado, a posição do aminoácido é mencionada de acordo com a numeração de BPN'.

Tabela 2-2. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 com relação a GG36 no teste de limpeza de amostras com TCA ou SLT a 16°C nos detergentes 7 a 11.

Posição de aminoácido de GG36 (numeração de acordo com BPN')	Resíduo selvagem	Resíduo mutante
1	A	R
2	Q	A
2	Q	R
2	Q	S
2	Q	M
2	Q	W
3	S	R
4	V	R
4	V	S
4	V	C
8	I	A
9	S	W
9	S	F
9	S	A
10	R	A
10	R	M
10	R	S
10	R	H
12	Q	F
12	Q	R
14	P	F
14	P	K
14	P	Q
15	A	R
15	A	F

Tabela 2-2. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 com relação a GG36 no teste de limpeza de amostras com TCA ou SLT a 16°C nos detergentes 7 a 11.

16	A	S
17	H	R
17	H	F
17	H	M
18	N	R
18	N	K
20	G	R
20	G	K
20	G	F
22	T	R
22	T	Q
22	T	L
22	T	V
22	T	W
22	T	Y
22	T	A
23	G	A
23	G	S
23	G	F
24	S	R
24	S	W
24	S	H
24	S	L
24	S	Q
24	S	F
25	G	R
25	G	F
25	G	V

Tabela 2-2. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 com relação a GG36 no teste de limpeza de amostras com TCA ou SLT a 16°C nos detergentes 7 a 11.

26	V	F
27	K	R
27	K	L
27	K	V
27	K	F
28	V	A
28	V	E
28	V	N
29	A	T
30	V	E
31	L	F
33	T	S
33	T	G
33	T	D
34	G	P
35	I	M
36	S	T
36	S	F
36	S	R
38	T	R
38	T	F
38	T	L
40	P	H
40	P	W
40	P	R
40	P	N
40	P	T
40	P	L

Tabela 2-2. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 com relação a GG36 no teste de limpeza de amostras com TCA ou SLT a 16°C nos detergentes 7 a 11.

42	L	I
43	N	R
43	N	A
43	N	S
43	N	W
43	N	F
43	N	I
43	N	D
43	N	M
45	R	T
46	G	R
48	A	R
50	F	C
51	V	W
51	V	F
51	V	H
52	P	F
52	P	N
52	P	E
55	P	Y
57	T	R
59	Q	A
59	Q	F
59	Q	R
60	D	P
60	D	A
60	D	Q
62	N	Q

Tabela 2-2. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 com relação a GG36 no teste de limpeza de amostras com TCA ou SLT a 16°C nos detergentes 7 a 11.

62	N	E
63	G	S
63	G	A
63	G	M
63	G	V
63	G	T
63	G	H
63	G	Q
63	G	I
63	G	D
63	G	E
63	G	P
64	H	F
64	H	T
68	V	A
68	V	C
69	A	N
69	A	T
69	A	W
69	A	P
71	T	G
72	I	C
74	A	C
75	L	R
75	L	A
75	L	E
75	L	F
78	S	R

Tabela 2-2. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 com relação a GG36 no teste de limpeza de amostras com TCA ou SLT a 16°C nos detergentes 7 a 11.

78	S	I
78	S	N
79	I	Q
79	I	W
81	V	R
82	L	R
82	L	T
82	L	M
82	L	F
82	L	V
85	A	M
86	P	W
86	P	I
86	P	L
89	E	P
89	E	W
89	E	T
89	E	I
89	E	H
89	E	V
89	E	F
89	E	L
89	E	W
89	E	G
91	Y	F
91	Y	N
92	A	F
94	K	N

Tabela 2-2. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 com relação a GG36 no teste de limpeza de amostras com TCA ou SLT a 16°C nos detergentes 7 a 11.

99	S	F
99	S	T
99	S	M
99	S	G
99	S	P
100	G	I
100	G	S
100	G	N
100	G	Q
101	S	N
101	S	G
101	S	T
101	S	A
101	S	D
101	S	F
101	S	D
101	S	E
101	S	P
102	G	A
102	G	N
102	G	T
102	G	E
102	G	H
103	S	N
103	S	G
103	S	D
104	V	L
104	V	I

Tabela 2-2. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 com relação a GG36 no teste de limpeza de amostras com TCA ou SLT a 16°C nos detergentes 7 a 11.

104	V	E
104	V	D
105	S	T
105	S	Q
105	S	E
106	S	V
106	S	G
106	S	T
106	S	A
106	S	E
106	S	D
106	S	F
107	I	F
107	I	M
108	A	I
108	A	G
109	Q	M
111	L	V
111	L	I
112	E	V
112	E	L
112	E	Q
114	A	G
115	G	R
115	G	K
116	N	L
116	N	A
116	N	K

Tabela 2-2. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 com relação a GG36 no teste de limpeza de amostras com TCA ou SLT a 16°C nos detergentes 7 a 11.

117	N	F
118	G	I
118	G	R
119	M	C
120	H	A
120	H	F
120	H	R
121	V	E
121	V	F
123	N	G
123	N	E
124	L	S
128	S	N
128	S	M
128	S	H
128	S	Q
128	S	I
128	S	F
128	S	L
128	S	D
129	P	E
132	S	A
132	S	E
138	A	G
144	S	R
147	V	L
148	L	I
158	A	E

Tabela 2-2. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 com relação a GG36 no teste de limpeza de amostras com TCA ou SLT a 16°C nos detergentes 7 a 11.

159	G	C
159	G	E
160	S	D
166	S	E
166	S	D
167	Y	W
175	M	V
177	V	C
181	D	A
182	Q	R
183	N	D
183	N	R
183	N	I
183	N	F
183	N	M
185	N	I
185	N	E
185	N	V
186	R	H
186	R	K
188	S	R
188	S	E
188	S	D
192	Y	W
192	Y	H
194	A	V
194	A	F
194	A	E

Tabela 2-2. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 com relação a GG36 no teste de limpeza de amostras com TCA ou SLT a 16°C nos detergentes 7 a 11.

197	D	F
198	I	L
198	I	F
203	V	E
203	V	C
208	T	S
209	Y	N
209	Y	S
209	Y	F
209	Y	T
209	Y	H
209	Y	L
209	Y	G
209	Y	E
210	P	V
210	P	R
210	P	L
211	G	R
211	G	Q
212	S	I
212	S	F
212	S	M
213	T	A
214	Y	F
215	A	F
215	A	N
215	A	H
215	A	E

Tabela 2-2. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 com relação a GG36 no teste de limpeza de amostras com TCA ou SLT a 16°C nos detergentes 7 a 11.

215	A	D
216	S	F
216	S	A
217	L	E
217	L	N
217	L	D
218	N	P
218	N	E
218	N	D
224	T	A
224	T	G
227	V	I
230	A	E
231	A	I
231	A	C
233	L	C
234	V	F
235	K	F
236	Q	N
236	Q	F
238	N	R
238	N	K
238	N	L
239	P	R
239	P	S
239	P	R
239	P	H
239	P	N

Tabela 2-2. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 com relação a GG36 no teste de limpeza de amostras com TCA ou SLT a 16°C nos detergentes 7 a 11.

239	P	K
239	P	T
239	P	F
239	P	G
240	S	R
241	W	R
242	S	R
242	S	L
243	N	R
243	N	F
244	V	R
246	I	S
248	N	I
248	N	V
248	N	R
249	H	R
249	H	T
250	L	I
251	K	R
251	K	S
252	N	R
252	N	F
252	N	H
252	N	I
253	T	R
253	T	F
253	T	I
254	A	C

Tabela 2-2. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 com relação a GG36 no teste de limpeza de amostras com TCA ou SLT a 16°C nos detergentes 7 a 11.

256	S	N
258	G	R
260	T	V
260	T	I
262	L	H
262	L	D
263	Y	F
265	S	F
267	L	N
267	L	M
267	L	V
269	N	R
269	N	I
270	A	C
271	E	T
271	E	V
271	E	L
271	E	H
271	E	F
271	E	P
271	E	A
271	E	M
271	E	I
272	A	F
272	A	R
273	A	I
273	A	F
274	T	G

Tabela 2-3. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 1,5 com relação a GG36 no teste de limpeza de amostras com SLT a 32°C no detergente 7.
Variante de GG36
N62E
A158E
G159E

Tabela 2-4. Variantes únicas de GG36 com índices de desempenho de pelo menos 1,2 em relação a GG36 no teste de limpeza de amostra com SLT a 32°C no detergente 10.
Variante de GG36
A1R
S78R
V244R
N269R
E271L

Exemplo 3

Construção e desempenho de limpeza dos grupos NHJ1 e WCE1 de variantes de GG36

[00645] Os grupos NHJ1 e WCE1 de variantes de GG36 aqui descritos foram construídos na empresa DNA 2.0, Inc., usando o plasmídio de expressão pHPLT-GG36 de *B. subtilis* descrito acima (figura 6). As variantes foram expressas em células de *B. subtilis* (genótipo: $\Delta aprE$, $\Delta nprE$, $amyE::xylRPxylAcomK-phleo$) conforme descrito no exemplo 2, e foram caracterizadas adicionalmente usando o teste de TCA para determinação do teor de proteína, teste estabilidade em LAS/EDTA, e teste de limpeza de amostras de tecido com SLT, conforme descrito no exemplo 1. Estes resultados são mostrados nas tabelas 3-1 e 3-2. Nas tabelas a seguir, as composições detergentes ("Det.") correspondem àquelas mostradas na tabela D, acima. Além disso, conforme indicado, a posição do aminoácido é mencionada de acordo com a numeração de BPN'.

Tabela 3-1. Variantes de NHJ1 com índices de desempenho de pelo menos 0,25 em relação a GG36 em qualquer um dos testes de limpeza de TCA, estabilidade em LAS/EDTA, ou SLT a 16°C nos detergentes 7, 8 ou 9.

Variante de GG36 (numeração de acordo com BPN')
N062E-A158E
S103G-A158E
S128N-A158E
A016S-A158E
V104L-A158E
E089P-A158E
L111V-A158E
T022A-A158E
S101A-A158E
L148I-A158E
P129E-A158E
T022A-E089P
A016S-E089P
N062E-E089P
N062E-E271F
A158E-E271F
R186H-E271F
P129E-E271F
L111V-E271F
Y209E-E271F
A016S-E271F
S188D-E271F
T022A-E271F
G159E-E271F
V104L-E271F
S101A-E271F
E089P-E271F
S128N-E271F
S103G-E271F
L148I-E271F
H249R-E271F
N062E-G159E
A016S-G159E

Tabela 3-1. Variantes de NHJ1 com índices de desempenho de pelo menos 0,25 em relação a GG36 em qualquer um dos testes de limpeza de TCA, estabilidade em LAS/EDTA, ou SLT a 16°C nos detergentes 7, 8 ou 9.

Variante de GG36 (numeração de acordo com BPN')

S128N-G159E

L148I-G159E

L111V-G159E

E089P-G159E

T022A-G159E

P129E-G159E

S103G-G159E

V104L-G159E

A158E-G159E

S101A-G159E

A158E-H249R

L111V-H249R

P129E-H249R

N062E-H249R

A016S-H249R

R186H-H249R

L148I-H249R

G159E-H249R

S101A-H249R

S188D-H249R

V104L-H249R

Y209E-H249R

T022A-H249R

S128N-H249R

S103G-H249R

E089P-H249R

T022A-L111V

S101A-L111V

A016S-L111V

V104L-L111V

N062E-L111V

S103G-L111V

E089P-L111V

Tabela 3-1. Variantes de NHJ1 com índices de desempenho de pelo menos 0,25 em relação a GG36 em qualquer um dos testes de limpeza de TCA, estabilidade em LAS/EDTA, ou SLT a 16°C nos detergentes 7, 8 ou 9.

Variante de GG36 (numeração de acordo com BPN')

A016S-L148I

N062E-L148I

T022A-L148I

P129E-L148I

V104L-L148I

S103G-L148I

S128N-L148I

S101A-L148I

E089P-L148I

L111V-L148I

A016S-N062E

T022A-N062E

N062E-P129E

T022A-P129E

S128N-P129E

A016S-P129E

S101A-P129E

V104L-P129E

E089P-P129E

S103G-P129E

L111V-P129E

N062E-R186H

S128N-R186H

S101A-R186H

T022A-R186H

A016S-R186H

A158E-R186H

E089P-R186H

P129E-R186H

G159E-R186H

S103G-R186H

V104L-R186H

L111V-R186H

Tabela 3-1. Variantes de NHJ1 com índices de desempenho de pelo menos 0,25 em relação a GG36 em qualquer um dos testes de limpeza de TCA, estabilidade em LAS/EDTA, ou SLT a 16°C nos detergentes 7, 8 ou 9.

Variante de GG36 (numeração de acordo com BPN')
L148I-R186H
N062E-S101A
T022A-S101A
A016S-S101A
E089P-S101A
N062E-S103G
T022A-S103G
A016S-S103G
S101A-S103G
E089P-S103G
N062E-S128N
A016S-S128N
T022A-S128N
S101A-S128N
V104L-S128N
E089P-S128N
S103G-S128N
L111V-S128N
L111V-S188D
N062E-S188D
A016S-S188D
L148I-S188D
T022A-S188D
S128N-S188D
S101A-S188D
V104L-S188D
E089P-S188D
P129E-S188D
G159E-S188D
R186H-S188D
S103G-S188D
A158E-S188D
A016S-T022A

Tabela 3-1. Variantes de NHJ1 com índices de desempenho de pelo menos 0,25 em relação a GG36 em qualquer um dos testes de limpeza de TCA, estabilidade em LAS/EDTA, ou SLT a 16°C nos detergentes 7, 8 ou 9.
Variante de GG36 (numeração de acordo com BPN')
A016S-V104L
T022A-V104L
S101A-V104L
N062E-V104L
S103G-V104L
E089P-V104L
G159E-Y209E
L111V-Y209E
S101A-Y209E
A016S-Y209E
S128N-Y209E
L148I-Y209E
P129E-Y209E
N062E-Y209E
T022A-Y209E
S103G-Y209E
A158E-Y209E
S188D-Y209E
V104L-Y209E
E089P-Y209E
R186H-Y209E
GG36

Tabela 3-2. Variantes de WCE1 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 em relação a GG36 em qualquer um dos testes de limpeza de TCA, estabilidade em LAS/EDTA, ou SLT a 16°C nos detergentes 10 ou 11.
variante de GG36 (numeração de acordo com BPN')
N018R-W241R
G020R-W241R
S024R-W241R

Tabela 3-2. Variantes de WCE1 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 em relação a GG36 em qualquer um dos testes de limpeza de TCA, estabilidade em LAS/EDTA, ou SLT a 16°C nos detergentes 10 ou 11.
variante de GG36 (numeração de acordo com BPN')
S009A-W241R
G020R-W241R
V004R-W241R
N043R-W241R
S078R-W241R
T022R-W241R
G115R-W241R
A001R-W241R
S212F-W241R
L082R-W241R
N018R-V244R
S024R-V244R
S078R-V244R
G020R-V244R
S212F-V244R
S009A-V244R
L082R-V244R
A001R-V244R
N043R-V244R
T022R-V244R
V004R-V244R
G115R-V244R
W241R-V244R
S242R-V244R

Tabela 3-2. Variantes de WCE1 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 em relação a GG36 em qualquer um dos testes de limpeza de TCA, estabilidade em LAS/EDTA, ou SLT a 16°C nos detergentes 10 ou 11.
variante de GG36 (numeração de acordo com BPN')
A001R-V004R
S009A-T022R
N018R-T022R
G020R-T022R
V004R-T022R
A001R-T022R
S024R-S242R
N018R-S242R
V004R-S242R
G020R-S242R
S212F-S242R
L082R-S242R
S078R-S242R
A001R-S242R
S009A-S242R
T022R-S242R
G115R-S242R
N043R-S242R
W241R-S242R
N018R-S212F
T022R-S212F
V004R-S212F
S024R-S212F
A001R-S212F

Tabela 3-2. Variantes de WCE1 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 em relação a GG36 em qualquer um dos testes de limpeza de TCA, estabilidade em LAS/EDTA, ou SLT a 16°C nos detergentes 10 ou 11.
variante de GG36 (numeração de acordo com BPN')
G115R-S212F
G020R-S212F
S009A-S212F
N043R-S212F
S078R-S212F
L082R-S212F
S009A-S078R
G020R-S078R
S024R-S078R
T022R-S078R
N018R-S078R
V004R-S078R
A001R-S078R
N043R-S078R
T022R-S024R
G020R-S024R
N018R-S024R
A001R-S024R
V004R-S024R
S009A-S024R
V004R-S009A
A001R-S009A
S242R-N269R
S024R-N269R

Tabela 3-2. Variantes de WCE1 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 em relação a GG36 em qualquer um dos testes de limpeza de TCA, estabilidade em LAS/EDTA, ou SLT a 16°C nos detergentes 10 ou 11.
variante de GG36 (numeração de acordo com BPN')
G020R-N269R
T022R-N269R
H249R-N269R
S212F-N269R
N043R-N269R
V244R-N269R
A001R-N269R
N018R-N269R
S078R-N269R
S009A-N269R
G115R-N269R
W241R-N269R
V004R-N269R
L082R-N269R
N018R-N043R
G020R-N043R
V004R-N043R
T022R-N043R
S009A-N043R
A001R-N043R
S024R-N043R
S009A-N018R
V004R-N018R
A001R-N018R

Tabela 3-2. Variantes de WCE1 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 em relação a GG36 em qualquer um dos testes de limpeza de TCA, estabilidade em LAS/EDTA, ou SLT a 16°C nos detergentes 10 ou 11.
variante de GG36 (numeração de acordo com BPN')
S024R-L082R
S009A-L082R
N018R-L082R
A001R-L082R
S078R-L082R
G020R-L082R
T022R-L082R
V004R-L082R
N043R-L082R
N043R-H249R
G020R-H249R
V004R-H249R
N018R-H249R
S009A-H249R
S212F-H249R
T022R-H249R
S024R-H249R
G115R-H249R
A001R-H249R
L082R-H249R
S242R-H249R
W241R-H249R
V244R-H249R
S078R-H249R

Tabela 3-2. Variantes de WCE1 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 em relação a GG36 em qualquer um dos testes de limpeza de TCA, estabilidade em LAS/EDTA, ou SLT a 16°C nos detergentes 10 ou 11.
variante de GG36 (numeração de acordo com BPN')
N018R-G115R
G020R-G115R
T022R-G115R
S078R-G115R
S009A-G115R
V004R-G115R
A001R-G115R
L082R-G115R
N043R-G115R
S024R-G115R
S009A-G020R
N018R-G020R
V004R-G020R
A001R-G020R
S009A-E271L
G020R-E271L
S024R-E271L
V244R-E271L
W241R-E271L
N043R-E271L
T022R-E271L
H249R-E271L
S212F-E271L
G115R-E271L

Tabela 3-2. Variantes de WCE1 com índices de desempenho de pelo menos 0,2 em relação a GG36 em qualquer um dos testes de limpeza de TCA, estabilidade em LAS/EDTA, ou SLT a 16°C nos detergentes 10 ou 11.
variante de GG36 (numeração de acordo com BPN')
S242R-E271L
S078R-E271L
V004R-E271L
N269R-E271L
A001R-E271L
N018R-E271L
L082R-E271L
GG36

Exemplo 4

Construção e desempenho de limpeza do grupo NHJ4 de variantes de GG36

[00646] O grupo NHJ4 de variantes de GG36 descrito na tabela 4-4 abaixo foi construído usando o plasmídio de expressão pHPLT-GG36 de *B. subtilis* (figura 6) usando fusão por PCR ou o kit de mutagênese multi sítio-dirigida QUIKCHANGE® ("kit QCMS"; Stratagene) conforme descrito abaixo.

a) Construção das variantes de NHJ4 por mutagênese multissítio-dirigida QUIKCHANGE®

[00647] As variantes criadas usando a mutagênese multissítio-dirigida QUIKCHANGE® são mostradas na tabela 4-1. O plasmídio original pHPLT-GG36 (DNA molde) foi metilado usando duas microgramas de DNA e Dam metilase (NEB), de acordo com as instruções do fabricante. Os mutantes sítio-dirigidos foram feitos por um kit de mutagênese multi sítio-dirigida QuikChange® ("kit QCMS"; Stratagene) de acordo com o protocolo do fabricante. As seguintes mutações foram introduzidas no plasmídio original S101A-S103G-

V104L, G159E, T22A, Y209E, E271F, S101A, S103G, L111V, S128N, N62E, e S188D,. Para uma transformação eficaz de *B. subtilis*, o DNA das misturas da reação de QCMS foi amplificado por amplificação por círculo rolante (RCA) usando o kit Illustra Templiphi (GE Healthcare) e a reação foi executada de acordo com o protocolo do fabricante. Um microlitro de um DNA amplificado diluído 10 vezes foi usado para transformar 50 µL de células de *B. subtilis* competentes (genótipo: ΔaprE, ΔnprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo). A mistura de transformação foi agitada a 37°C durante 1 hora. Alíquotas de dez microlitros da mistura de transformação foram plaqueadas sobre placas de ágar Luria com leite desnatado (1,6%) suplementado com 10 µg/ml de neomicina (Teknova). Subsequentemente, as colônias com halos foram inoculadas em 120 µl de meio LB contendo 10 µg/mL de neomicina para extração do DNA plasmidial (kit QIAprep Spin Miniprep, Qiagen). Os plasmídios extraídos foram sequenciados para confirmar a presença das mutações desejadas.

b) Construção das variantes de NHJ4 por PCR de extensão

[00648] Dez mutantes combinatórios de GG36 foram criados por PCR de extensão. A lista de mutações introduzidas no gene GG36 contido no plasmídio pHPLT é a seguinte: T22A, N62E, S103G, S103G-L111V, S101G-S103A-V104I, S101A-S103G-V104L, S101A, S128N, G159D, G159E, Y209E, e L111V. Para criar cada mutante, fragmentos de PCR contendo as mutações desejadas foram amplificados usando iniciadores mutagênicos assim como iniciadores de sentido direto e reverso para amplificar a variante de GG36 inteira. Cada reação de amplificação por PCR continha 30 pmol de cada iniciador mutagênico e 100 ng do DNA molde, o plasmídio pHPLT-GG36. As amplificações foram executadas usando a Vent DNA polimerase (NEB). A reação de PCR (20 µL) foi inicialmente aquecida a 95°C durante 2,5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C

durante 15 seg., anelamento a 55°C durante 15 seg. e extensão a 72°C durante 1 min. Após a amplificação, 2 a 4 fragmentos de PCR para cada variante foram purificados em gel usando um kit de purificação de bandas em gel QIAGEN® e misturados (50 ng de cada fragmento). Estas misturas serviram como moldes de DNA para a PCR de extensão para gerar os fragmentos do gene de extensão completa. As condições da PCR foram as mesmas descritas acima, com a exceção da fase de extensão, que foi executada a 72°C durante 2 minutos. O fragmento de DNA de extensão completa foi purificado em gel usando um kit de purificação de bandas em gel QIAGEN®, digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III e ligado com pHLT-GG36, que foi digerido com as mesmas enzimas de restrição. Um microlitro das misturas de ligação foi amplificado usando amplificação por círculo rolante pelo kit Illustra Templiphi de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare) para gerar DNA multimérico para a transformação em *Bacillus subtilis*. Os produtos da amplificação por círculo rolante foram diluídos 100 vezes e usados para transformar células de *B. subtilis* com o genótipo: Δ aprE, Δ nprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo). Uma alíquota da mistura de transformação foi plaqueada sobre placas com meio LB contendo 1,6% de leite desnatado e 10 µg/mL de neomicina e incubadas de um dia para o outro a 37°C. Subsequentemente, as colônias com halos foram inoculadas em 120 µl de meio caldo Luria contendo 10 µg/mL de neomicina para extração do DNA plasmidial (kit QIAprep Spin Miniprep, Qiagen). Os plasmídios extraídos foram sequenciados para confirmar a presença das mutações desejadas. As variantes criadas usando PCR de extensão são mostradas na tabela 4-1.

[00649] Para expressar o grupo NHJ4 de proteínas variantes para análises bioquímicas adicionais, as cepas de *B. subtilis* carregando os plasmídios com a variante foram inoculados em placas de

microtitulação contendo 150 µl de meio caldo Luria suplementado com 10 µg/ml de neomicina. As culturas foram cultivadas para expressão de proteína conforme descrito no exemplo 2, e foram filtradas através de uma placa com microfiltros (0,22 µm; Millipore) também conforme descrito no exemplo 2. O filtrado resultante foi usado para análise bioquímica. O teste de inibição de eglina c para determinação do teor de proteína e os testes em amostras de tecido com SLT feitos em vários detergentes foram executados conforme descrito no exemplo 1. Os índices de desempenho também foram calculados conforme descrito na descrição do teste SLT no exemplo 1. A tabela 4-1 fornece informações referentes a estas variantes com múltiplas mutações e os resultados obtidos para elas. Os valores de PI são em relação a GG36. Nas tabelas a seguir, as composições detergentes ("Det.") correspondem àquelas mostradas na tabela D, acima. Além disso, conforme indicado, a posição do aminoácido é mencionada de acordo com a numeração de BPN'.

Tabela 4-1. Variantes de NHJ4 com múltiplas mutações com índices de desempenho de limpeza de SLT de pelo menos 0,2 em relação a GG36 nos detergentes 7, 8 ou 9 a 16°C.		
Nome da variante	Criada por	Mutações (numeração de acordo com BPN')
		GG36
NHJ4-1	PCR de extensão	S101G S103A V104I
NHJ4-10	PCR de extensão	T22A S101A Y209E
NHJ4-11	PCR de extensão	S103G L111V G159E
NHJ4-12	PCR de extensão	T22A S103G G159E
NHJ4-13	QCMS	T22A L111V G159E
NHJ4-14	QCMS	T22A S128N E271F Y209E
NHJ4-15	QCMS	T22A S103G L111V
NHJ4-16	QCMS	N62E L111V S128N
NHJ4-17	QCMS	T22A L111V S128N
NHJ4-18	PCR de extensão	T22A N62E L111V
NHJ4-19	QCMS	S101A S103G V104L S188D
NHJ4-2	PCR de extensão	S101G S103A V104I G159D

Tabela 4-1. Variantes de NHJ4 com múltiplas mutações com índices de desempenho de limpeza de SLT de pelo menos 0,2 em relação a GG36 nos detergentes 7, 8 ou 9 a 16°C.		
Nome da variante	Criada por	Mutações (numeração de acordo com BPN')
NHJ4-20	PCR de extensão	S101A S103G V104L S128N
NHJ4-24	QCMS	T22A S101A G159E
NHJ4-3	PCR de extensão	S101A S103G V104L
NHJ4-4	PCR de extensão	S101A S103G V104L G159E
NHJ4-5	PCR de extensão	T22A S101A S103G V104L
NHJ4-6	QCMS	S101A S103G V104L Y209E
NHJ4-7	QCMS	T22A Y209E E271F
NHJ4-8	QCMS	T22A S101A E271F
NHJ4-9	QCMS	S101A Y209E E271F

Exemplo 5

Construção e desempenho de limpeza do grupo NHJ3 de variantes de GG36

[00650] O grupo NHJ3 de variantes aqui descrito se baseia em uma variante de GG36 (chamada de GG36-9) contendo as seguintes mutações: S101G, S103A, V104I, G159D, A232V, Q236H, Q245R, N248D, e N252K (numeração de acordo com BPN'). Estas variantes foram criadas usando o kit de mutagênese QUIKCHANGE® Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (kit QCLDS; Stratagene), com o plasmídio pRA68 (vide figura 7) como o molde de DNA. O plasmídio pRA68 foi gerado a partir do vetor pBN3 (vide Babé et al., Biotech. Appl. Biochem. 27:117-124 [1998]).

[00651] A sequência de DNA da variante GG36-9 (a sequência de sinal é mostrada em letras minúsculas, o pró-peptídeo em letras minúsculas sublinhadas, e a sequência madura de GG36-9 em letras maiúsculas) é fornecida abaixo:

Gtgagaagcaaaaaattgtggatcgctgcgctgcaccgcactactcatttctgttgcttttagttcatc
 gatcgcatcggctgctgaagaagcaaaaagaaaaatatttaattggctttaatgagcaggaagctg
 tcagtgagttttagaacaagtagaggcaaatgacgaggtcgccattctctctgaggaagagga

agtcgaaattgaattgcttcatgaatttgaacgattcctgtttatccgttgagtaagcccagaaga
tgtggacgcgcttgaactcgatccagcgatttcttatattgaagaggatgcagaagtaacgacaat
 gGCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGCCGTGTGCAAGCCCCGG
 CTGCCATAACCGTGGATTGACAGGTTCTGGTGTAAGTTGCTG
 TCCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGG
 TGGCGCTAGCTTTGTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAA
 TGGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGACGATTGCTGCTCTAAACA
 ATTCGATTGGCGTACTTGGCGTAGCGCCGAGCGCGGAACCTATAC
 GCTGTAAAGTATTAGGGGCGAGCGGTGGGGGCGCCATCAGCTC
 GATTGCCCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACG
 TTGCTAATTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCAAGTGCCACACTTGA
 GCAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGGGGCGTTCTTGTTGTAGC
 GGCATCTGGAAATTCGGGTGCAGACTCAATCAGCTATCCGGCCC
 GTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGACCAAACAACA
 ACCGCGCCAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGGCTTGACATCGTC
 GCACCAGGTGTAAACGTGCAGAGCACATACCCAGGTTCAACGTAT
 GCCAGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGT
 GCAGCAGTCCTTGTTAAACATAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTAC
 GAATCCGCGATCATCTAAAGAAAACGGCAACGAGCTTAGGAAGCA
 CGAACTTGTATGGAAGCGGACTTGTCAATGCCGAAGCTGCAACTC
 GTTAA (SEQ ID n° 762)

[00652] A sequência de proteína da variante GG36-9 (a sequência de sinal é mostrada em letras minúsculas, o pró-peptídeo em letras minúsculas sublinhadas, e a sequência madura da protease GG36-9 em letras maiúsculas) é fornecida abaixo:

vrskklwivastallisvafssssiasaaeeeakekyligfneqeavsefveqveandevailseeeev
eiellhefetipvlsvlspedvdaleldpaisyieedaevttmAQSVPWGISRVQAPAAH
 NRGLTGSQVKVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPTQDGNGHG
 THVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGGGAISSIAQGLEW
 AGNNGMHVANLSLGSPSPSATLEQAVNSATSRGVLVVAASGNSGAD

SISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFQYGAGLDIVAPGVNVQSTY
PGSTYASLNGTSMATPHVAGAAVLVKHKNPSWSNVRIRDHLKKTATS
LGSTNLYGSGLVNAEAATR (SEQ ID nº 763)

[00653] Para criar as variantes de NHJ3 usando o kit QCLSD, iniciadores mutagênicos foram desenhados para cada uma das variantes de acordo com o protocolo do fabricante. A reação de mutagênese para cada variante consistiu em 0,5 µl de tampão 10X, 0,5 µL de DNA do plasmídio pRA68 (168 ng/µL), 0,5 µl de iniciador mutagênico de sentido direto (25 µM), 0,5 µl de iniciador mutagênico de sentido reverso (25 µM), 1 µl de dNTPs (fornecidas no kit QCLSD), 1,5 µl de solução Quik (fornecida no kit QCLMS), 1 µl de mistura de enzimas (fornecida no kit QCLSD), e 40 µl de água deionizada destilada para fazer um volume de reação de 50 µL, de acordo com as instruções do fabricante. O programa de ciclagem foi 1 ciclo a 95°C durante 2 minutos, 18 ciclos de 95°C durante 20 segundos, 60°C durante 10 segundos e 68°C durante 3 minutos, 22 segundos, e um ciclo final de 68°C durante 5 minutos. A seguir, 1 µL da enzima de restrição *DpnI* fornecida no kit foi usado para digerir o DNA plasmidial na reação e, então, 2 µL da reação foram usados para transformar células competentes *E. coli* TOP 10 (Invitrogen). Os transformantes de *E. coli* foram selecionados em placas com meio caldo Luria contendo 50 µg/mL (ppm) de carbenicilina após cultura de um dia para o outro a 37°C. O DNA plasmidial foi extraído a partir de 4 a 8 colônias de *E. coli* cultivadas em meio LA contendo 50 µg/mL (ppm) de carbenicilina usando o kit QIAprep spin miniprep (Qiagen). Os plasmídios foram sequenciados para confirmar a presença das mutações desejadas. Os plasmídios variantes foram então transformados em células de *B. subtilis* conforme descrito no exemplo 2. As cepas variantes de *B. subtilis* foram cultivadas conforme descrito no exemplo 2 para análise bioquímica adicional, como, por exemplo, determinação do teor de

proteína usando o teste de inibição de eglina c (Exemplo 1) e um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT (Exemplo 1). Os resultados são fornecidos abaixo nas tabelas 5-1 e 5-2. Os PIs são em relação a GG36. Nas tabelas a seguir, as composições detergentes ("Det.") correspondem àquelas mostradas na tabela D, acima. Além disso, conforme indicado, a posição do aminoácido é mencionada de acordo com a numeração de BPN'.

Tabela 5-1. Variantes de NHJ3 com múltiplas mutações com índices de desempenho de limpeza de SLT de pelo menos 1,1 em relação a GG36 nos detergentes 7, 8 ou 9 a 16°C.	
Variante	Sequência da variante em relação a GG36 (usando numeração de acordo com BPN')
	GG36
NHJ3-1	S103A-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-2	S101G-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-3	S101G-S103A-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-4	S101G-S103A-V104L-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-5	S101G-S103A-V104L-G159D-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-6	S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-7	S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-N248D-N252K
NHJ3-8	S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N252K
NHJ3-9	S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D

Tabela 5-2. Variantes de NHJ3 com múltiplas mutações com índices de desempenho de limpeza de SLT de pelo menos 0,3 em relação a GG36 nos detergentes 10 ou 11 a 16°C.	
Variante	Sequência da variante em relação a GG36 (usando numeração de acordo com BPN')
	GG36
NHJ3-1	S103A-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-2	S101G-V104I-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-3	S101G-S103A-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-4	S101G-S103A-V104L-A232V-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-5	S101G-S103A-V104L-G159D-Q236H-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-6	S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q245R-N248D-N252K
NHJ3-7	S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-N248D-N252K

Tabela 5-2. Variantes de NHJ3 com múltiplas mutações com índices de desempenho de limpeza de SLT de pelo menos 0,3 em relação a GG36 nos detergentes 10 ou 11 a 16°C.	
Variante	Sequência da variante em relação a GG36 (usando numeração de acordo com BPN')
NHJ3-8	S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N252K
NHJ3-9	S101G-S103A-V104L-G159D-A232V-Q236H-Q245R-N248D

Exemplo 6

Construção e desempenho de limpeza do grupo NHJ5 de variantes de GG36

[00654] O grupo NHJ5 de variantes aqui descrito se baseia em uma variante de GG36 (chamada de GG36-7) contendo as seguintes mutações: S101G, S103A, V104I, G159D, A232V, Q245R, N248D, e (numeração de acordo com BPN'). Estas variantes foram criadas usando o kit QUIKCHANGE® Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis ("kit QCLMS") com o plasmídio pRA96 como o molde de DNA (vide figura 8). As mutações incorporadas incluíram: H243R (H249R), E265F (E271F), D157E (D159E), A156E (A158E), A156E-D157G (A158E-D159E), T22A, N60E (N62E), N232R (N238R), D242R (D248R), T247R (T253R), S24R, N74D (N76D) {A numeração de GG36 e numeração de BPN' são mostradas entre parênteses.

[00655] As variantes foram geradas usando os métodos descritos no exemplo 5. As cepas variantes de *B. subtilis* foram cultivadas conforme descrito no exemplo 2 para análise bioquímica adicional, como, por exemplo, determinação do teor de proteína usando o teste de inibição de eglina c (Exemplo 1) e um teste de limpeza de amostras de tecido com SLT (Exemplo 1). Os resultados são fornecidos abaixo na tabela 6-1. Os valores de PI são em relação a GG36. Nas tabelas a seguir, as composições detergentes ("Det.") correspondem às aquelas mostradas na tabela D, acima. Além disso, conforme indicado, a posição do aminoácido é mencionada de acordo com a numeração de BPN'.

[00656] A sequência de DNA da variante GG36-7 (a sequência de sinal é mostrada em letras minúsculas, o pró-peptídeo em letras minúsculas sublinhadas, e a sequência madura da protease GG36-7 em letras maiúsculas) é fornecida abaixo:

gtgagaagcaaaaaattgtggatcgctcgctcgaccgcactactcatttctgttgcttttagttcatcg
atcgcatcggtgctgaagaagcaaaagaaaaatatttaattggctttaatgagcaggaagctgt
cagtgagttttagaacaagtagaggcaaatgacgaggtcgccattctctctgaggaagaggaa
gtcgaaattgaattgcttcatgaatttgaacgattcctgttttatccgttgagttaagcccagaagat
gtggacgcgctgaactcgatccagcgatttcttatattgaagaggatgcagaagtaacgacaatg
 GCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGCCGTGTGCAAGCCCCGGC
 TGCCCATACCGTGGATTGACAGGTTCTGGTGTAAGTTGCTGT
 CCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGT
 GGCGCTAGCTTTGTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAAT
 GGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGACGATTGCTGCTCTAAACAA
 TTCGATTGGCGTACTTGGCGTAGCGCCGAGCGCGGAACCTATACG
 CTGTTAAAGTATTAGGGGCGAGCGGTGGGGGCGCCATCAGCTCG
 ATTGCCCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTT
 GCTAATTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCAAGTGCCACACTTGAG
 CAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGGGGCGTTCTTGTTGTAGCG
 GCATCTGGAAATTCGGGTGCAGACTCAATCAGCTATCCGGCCCGT
 TATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGACCAAAACAACAAC
 CGCGCCAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGGCTTGACATCGTCGC
 ACCAGGTGTAAACGTGCAGAGCACATACCCAGGTTCAACGTATGC
 CAGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGC
 AGCAGTCCTTGTTAAACAAAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTACGA
 ATCCGCGATCATCTAAAGAATACGGCAACGAGCTTAGGAAGCACG
 AACTTGTATGGAAGCGGACTTGTCAATGCCGAAGCTGCAACTCGT
 (SEQ ID nº 764)

[00657] A sequência de proteína da variante GG36-7 (a sequência de sinal é mostrada em letras minúsculas, o pró-peptídeo em letras

minúsculas sublinhadas, e a sequência madura da protease GG36-7 em letras maiúsculas) é fornecida abaixo:

vrskklwivastallisvafsssiassaaeeeakekyligfneqeavsefveqveandevailseeeev
eiellhefetipvlsvlspedvdaleldpaisyieedaevttmAQSVPWGISRVQAPAAH
 NRGLTGSQGVKVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPTQDGNGHG
 THVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGGGAISSIAQGLEW
 AGNNGMHVANLSLGSPSPSATLEQAVNSATSRGVLVVAASGNSGAD
 SISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFQYAGLDIVAPGVNVQSTY
 PGSTYASLNGTSMATPHVAGAAVLVKQKNPSWSNVRIRDHLKNTAT
 SLGSTNLYGSGLVNAEAATR (SEQ ID n° 765)

Tabela 6-1: Variantes de NHJ5 com múltiplas mutações com índices de desempenho de limpeza de SLT de pelo menos 0,6 em relação a GG36 nos detergentes 7 a 11 a 16°C.

Variante	Sequência da variante em relação a GG36 (numeração de acordo com BPN')
	GG36
GG36-7	S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D
NHJ5-1	S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F
NHJ5-2	S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N238R
NHJ5-3	S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N248R
NHJ5-4	S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-T253R
NHJ5-5	S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-S24R
NHJ5-6	S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-N76D
NHJ5-7	S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-H249R
NHJ5-8	S101G-S103A-V104I-G159E-A232V-Q245R-N248D-E271F
NHJ5-9	S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-H249R
NHJ5-10	S101G-S103A-V104I-A158E-A232V-Q245R-N248D-E271F
NHJ5-11	T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R

Tabela 6-1: Variantes de NHJ5 com múltiplas mutações com índices de desempenho de limpeza de SLT de pelo menos 0,6 em relação a GG36 nos detergentes 7 a 11 a 16°C.

NHJ5-12	T22A-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F
NHJ5-13	N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-H249R
NHJ5-14	N62E-S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248D-E271F

Exemplo 7

Construção da biblioteca combinatória NHJ2

[00658] Este Exemplo descreve a construção de uma biblioteca combinatória de GG36 envolvendo uma ou mais das seguintes mutações: A16S, T22A, S101A, S103G, V104L, L111V, S128N, e L148I (numeração de acordo com BPN'). O plasmídio de expressão pHPLT-GG36 de *B. subtilis* foi fornecido para a empresa DNA 2.0 Inc. para a geração da biblioteca combinatória de NHJ2. Uma reação de ligação da biblioteca NHJ2 construída foi fornecida pela empresa DNA 2.0, Inc. para transformação na cepa de *B. subtilis* (genótipo: Δ aprE, Δ nprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo). As variantes geradas contendo uma ou várias das mutações aqui descritas são testadas em aplicações para limpeza em água fria usando os métodos e as composições detergentes aqui descritas.

Exemplo 8

Construção de bibliotecas e variantes de GG36 adicionais

[00659] Bibliotecas e variantes adicionais são construídas usando o seguinte conjunto de mutações: A1R, A230E, E271L, G115R, G20R, H249R, K235F, K27V/F/L, L75E, L82R, N18R, N269R, N43D, N43R, N76D, R45T, S212F, S242R, S24R, S78R, S9A, T22R, V121E, V244R, V28E, V30E, V4R, W241R (numeração de acordo com BPN'). As variantes geradas contendo uma ou mais destas mutações são testadas em aplicações para limpeza em água fria usando os métodos e as composições detergentes aqui descritas.

[00660] Conjuntos adicionais de variantes de GG36 são construídos e testados para aplicações de limpeza em água fria usando os métodos e composições as detergentes aqui descritas e incluem: G20R-N43R-H249R, G20R-T22R-N43R, G20R-N43R-S242R, G20R-N43R-E271L, G20R-N43R-V244R, G20R-S24R-N43R-S242R, S9A-T22R-S78R-S212F-W241R, S9A-G20R-N43R-S212F, S9A-N43R-S212F, G20R-N43R-S212F, G20R-T22R-N43R-S212F, S24R-S78R-S212F, S9A-N43R-S78R, S9A-N43R-S78R-S242R, S9A-G20R-N43R-S78R, G20R-S24R-N43R-S78R-S242R, T22R-S24R-S78R-S212F, S9A-G20R-N43R-S78R-S242R, G20R-N43R-S78R-H249R, G20R-N43R-S78R, S9A-S78R-S212F, S9A-T22R-N43R-S78R, S9A-G20R-S24R-N43R, S9A-T22R-S78R-S212F, V4R-S9A-T22R-S78R-S212F, G20R-S24R-N43R, A1R-S9A-N43R, G20R-S24R-N43R-G115R, S9A-S24R-N43R, G20R-T22R-S24R-N43R, A1R-S24R-N43R, S9A-G20R-S24R-N43R-S242R, S9A-G20R-T22R-S78R-S212F, S9A-S24R-N43R-V244R, S9A-S24R-N43R-S242R, V4R-S9A-T22R-S24R-S212F, e T22R-S24R-N43R (numeração de BPN').

Exemplo 9

Construção e desempenho de limpeza da biblioteca WCE2 de GG36

[00661] A biblioteca combinatória WCE2 foi gerada pela DNA 2.0, Inc. usando o plasmídio de expressão pHPLT-GG36 de *B. subtilis*. Uma reação de ligação da biblioteca WCE2 construída foi fornecida pela empresa DNA 2.0, Inc. para transformação na cepa de *B. subtilis* (genótipo: Δ aprE, Δ nprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo). O conjunto de mutações usado para gerar a biblioteca WCE2 é A230E, G20R, H249R, N18R, N43R/D, N76D, R45T, S242R, e S24R (numeração de BPN'). As variantes geradas contendo uma ou mais destas mutações são testadas em aplicações para limpeza em água fria usando os métodos e as composições detergentes aqui descritas.

Exemplo 10

Construção e desempenho de limpeza do grupo WCE3 de variantes de GG36

[00662] Este exemplo descreve o grupo WCE3 de mutantes com base nas variantes de GG36, GG36-7 (Exemplo 5) e GG36-9 (Exemplo 4). Estas variantes são: S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-G159R-A232V-Q245R-N248D, S101G-S103A-V104I-G159D-A232V-Q245R-N248R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R, S101G-S103A-V104I-A232V-Q245R-N248R, S101G-S103A-V104I-G159R-A232V-Q245R-N248R, e S101G, S103A, V104I, A232V, Q236H, Q245R, e N252K. Elas foram criadas usando o kit de mutagênese QuikChange® Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis (kit QCLMS; Stratagene) com o plasmídio pRA96 como o molde de DNA descrito no Exemplo 5. As variantes geradas serão testadas em aplicações para limpeza em água fria usando os métodos e as composições detergentes descritas neste pedido.

Exemplo 11

Construção de bibliotecas e variantes adicionais de GG36

[00663] Este exemplo descreve a construção de variantes e bibliotecas de GG36 usando uma ou mais das seguintes mutações: A16S, T22A, S24R, N62E, N76D, E89P, S101A/G, S103G/A, V104L/I, L111V, S128N, P129E, A232V, L148I, A158E, G159D/E, S166D, R186H, S188D, Y209E, Q236H, N238R, Q245R, N248D/R, H249R, N252K/R, T253R, E271F (numeração de BPN') usando um plasmídio de expressão de *B. subtilis* (por exemplo, pHPLT-GG36; figura 6). As variantes geradas contendo uma ou mais destas mutações são testadas em aplicações para limpeza em água fria usando os métodos e as composições detergentes aqui descritas.

Exemplo 12

Construção de bibliotecas e variantes adicionais de GG36

[00664] Este exemplo descreve a construção de variantes e bibliotecas de GG36 em *B. subtilis* usando uma ou mais das seguintes mutações (numeração de BPN'): A1R, Q2S, Q2M, Q2A, Q2R, Q2W, S3R, V4R, V4S, V4C, I8A, S9A, S9F, S9W, R10S, R10A, R10H, R10M, Q12F, Q12R, P14K, P14F, P14Q, A15R, A15F, A16S, H17R, H17M, H17F, N18R, N18K, G20F, G20K, G20R, T22A, T22R, T22Y, T22V, T22Q, T22L, T22W, G23A, G23S, G23F, S24R, S24F, S24W, S24Q, S24H, S24L, G25V, G25F, G25R, V26F, K27L, K27F, K27R, K27V, V28A, V28N, V28E, A29T, V30E, L31F, T33S, T33G, T33D, G34P, I35M, S36T, S36F, S36R, T38L, T38F, T38R, P40N, P40L, P40T, P40W, P40H, P40R, L42I, N43A, N43F, N43I, N43S, N43R, N43M, N43W, N43D, R45T, G46R, A48R, F50C, V51W, V51F, V51H, P52F, P52E, P52N, P55Y, T57R, Q59A, Q59F, Q59R, D60P, D60Q, D60A, N62E, N62Q, G63V, G63M, G63T, G63I, G63A, G63S, G63H, G63Q, G63D, G63E, G63P, H64F, H64T, V68A, V68C, A69N, A69T, A69P, A69W, T71G, I72C, A74C, L75A, L75F, L75E, L75R, N76D, S78R, S78N, S78I, I79W, I79Q, V81R, L82F, L82T, L82V, L82R, L82M, A85M, P86W, P86L, P86I, E89P, E89T, E89G, E89H, E89L, E89V, E89W, E89F, E89I, Y91N, Y91F, A92F, K94N, S99F, S99T, S99P, S99G, S99M, G100S, G100N, G100Q, G100I, S101A, S101N, S101G, S101T, S101D, S101E, S101P, S101F, G102A, G102T, G102N, G102H, G102E, S103G, S103N, S103D, S103A, V104L, V104I, V104E, V104D, S105T, S105E, S105Q, S106G, S106T, S106E, S106D, S106A, S106V, S106F, I107M, I107F, A108I, A108G, Q109M, L111V, L111I, E112V, E112L, E112Q, A114G, G115K, G115R, N116K, N116A, N116L, N117F, G118R, G118I, M119C, H120A, H120F, H120R, V121F, V121E, N123G, N123E, L124S, S128D, S128F, S128L, S128N, S128H, S128M, S128I, S128Q, P129E, S132A, S132E, A138G, S144R, V147L, L148I, A158E, G159D, G159E, G159C, S160D, S166D, S166E, Y167W, M175V, V177C, D181A,

Q182R, N183I, N183D, N183M, N183F, N183R, N185E, N185V, N185I, R186H, R186K, S188E, S188D, S188R, Y192H, Y192W, A194E, A194V, A194F, D197F, I198L, I198F, V203E, V203C, T208S, Y209S, Y209N, Y209F, Y209T, Y209E, Y209H, Y209G, Y209L, P210R, P210V, P210L, G211Q, G211R, S212I, S212M, S212F, T213A, Y214F, A215N, A215D, A215E, A215H, A215F, S216F, S216A, L217E, L217N, L217D, N218D, N218P, N218E, T224A, T224G, V227I, A230E, A231I, A231C, A232V, L233C, V234F, K235F, Q236F, Q236N, Q236H, N238R, N238K, N238L, P239K, P239G, P239R, P239H, P239T, P239N, P239S, P239F, S240R, W241R, S242L, S242R, N243F, N243R, V244R, Q245R, I246S, N248D, N248V, N248I, N248R, H249R, H249T, L250I, K251R, K251S, N252I, N252F, N252R, N252K, N252H, T253I, T253R, T253F, A254C, S256N, G258R, T260V, T260I, L262D, L262H, Y263F, S265F, L267V, L267N, L267M, N269I, N269R, A270C, E271I, E271V, E271H, E271M, E271L, E271P, E271A, E271F, E271T, A272F, A272F, A272R, A273F, A273I, e T274G. As variantes geradas contendo uma ou mais destas mutações são testadas em aplicações para limpeza em água fria usando os métodos e as composições detergentes aqui descritas.

Exemplo 13

Testes de desempenho em lavagem de louças automática

[00665] Neste exemplo, são descritos os métodos usados para determinar o desempenho de lavagem das variantes de protease usando alguns detergentes para louça comercialmente disponíveis. Estas variantes de protease são testadas sob várias condições. Estes detergentes são disponíveis comercialmente junto à WFK e são chamados pelas designações fornecidas abaixo. Os protocolos para cada um dos tipos de mancha (carne moída, gema de ovo, e gema de ovo com leite) são fornecidos abaixo. Antes de os tipos de sujeira individuais poderem ser aplicados aos pratos em teste, os pratos

precisam ser cuidadosamente lavados. Isto é particularmente necessário, uma vez que resíduos de determinadas manchas persistentes podem ainda estar presentes nos pratos de testes anteriores. Pratos novos também foram submetidos a três lavagens meticulosas antes de serem usados pela primeira vez em um teste.

[00666] Os testes de lavagem são feitos tipicamente em uma lavadora automática (por exemplo, Miele: G690SC), equipada com pratos sujos e folhas de aço inoxidável, conforme descrito acima. Uma quantidade definida do detergente é usada, conforme indicado nas tabelas de resultados abaixo. Em alguns experimentos, as temperaturas testadas são 45°C, 55°C e 65°C. Em alguns experimentos, a dureza da água é 9° ou 21° GH (dureza alemã) (374 ppm de Ca).

[00667] Conforme indicado acima, após a lavagem, os pratos sujos com carne moída ou macarrão/molho/carne/queijo são avaliados visualmente usando uma escala de classificação visual de 0 a 10, em que "0" designou um prato completamente sujo e "10" designou um prato limpo. Estes valores correspondem à capacidade de remoção da mancha ou sujeira (SR) do detergente contendo a enzima.

[00668] Os pratos de aço inoxidável lavados sujos com gema de ovo e/ou gema de ovo e leite são analisados gravimetricamente para determinar a quantidade de mancha residual após a lavagem.

Alguns detergentes exemplificadores são fornecidos abaixo.

Detergente sem fosfato, IEC-60436 WFK tipo B (pH=10,4 em 3 g/l)	
Componente	% em peso
Citrato de sódio desidratado,	30,0
sal de sódio de copolímero de ácido maleico/ ácido acrílico (SOKALAN® CP5; BASF)	12,0
Perborato de sódio mono-hidratado,	5,0
TAED,	2,0
Dissilicato de sódio: Protil A (Cognis),	25,0

Detergente sem fosfato, IEC-60436 WFK tipo B (pH=10,4 em 3 g/l)	
Componente	% em peso
etoxilato de álcool graxo linear,	2,0
carbonato de sódio anidro,	adicionar para 100

Detergente contendo fosfato: IEC-60436 WFK tipo C (pH=10,5 em 3 g/l)	
Componente	% em peso
Tripolifosfato de sódio	23,0
Citrato de sódio desidratado	22,3
Sal de sódio de copolímero de ácido maleico/ ácido acrílico	4,0
perborato de sódio mono-hidratado	6,0
TAED	2,0
Dissilicato de sódio: Protil A (Cognis)	5,0
Etoxilato de álcool graxo linear	2,0
Carbonato de sódio anidro,	adicionar para 100

Exemplo 14

Composições de lavanderia granulares e/ou em tablete

[00669] Este Exemplo fornece várias formulações para detergentes de lavanderia granulares e/ou em tablete. As composições de lavanderia da presente invenção, que podem estar sob a forma de grânulos ou tablete, são fornecidas abaixo. Em cada uma destas formulações, pelo menos uma variante de protease aqui fornecida está incluída a uma concentração de cerca de 0,0001 até cerca de 10 por cento, em peso. Em alguns aspectos alternativos, outras concentrações poderão ser usadas, conforme determinado pelo formulador, com base nas suas necessidades.

Tabela 14-1: Composições de lavanderia granulares e/ou em tablete					
Composto	Formulações				
	I	II	III	IV	V
Produto-base					
C ₁₄ -C ₁₅ AS ou TAS	8,0	5,0	3,0	3,0	3,0
LAS	8,0	-	8,0	-	7,0

Tabela 14-1: Composições de lavanderia granulares e/ou em tablete					
Composto	Formulações				
	I	II	III	IV	V
C ₁₂ -C ₁₅ AE ₃ S	0,5	2,0	1,0	-	-
C ₁₂ -C ₁₅ E ₅ ou E ₃	2,0	-	5,0	2,0	2,0
QAS	-	-	-	1,0	1,0
Zeólito A	20,0	18,0	11,0	-	10,0
SKS-6 (adicionar a seco)	-	-	9,0	-	-
MA/AA	2,0	2,0	2,0	-	-
AA	-	-	-	-	4,0
Citrato de 3Na 2H ₂ O	-	2,0	-	-	-
Ácido cítrico (anidro)	2,0	-	1,5	2,0	-
DTPA	0,2	0,2	-	-	-
EDDS	-	-	0,5	0,1	-
HEDP	-	-	0,2	0,1	-
PB1	3,0	4,8	-	-	4,0
percarbonato	-	-	3,8	5,2	-
NOBS	1,9	-	-	-	-
NACA OBS	-	-	2,0	-	-
TAED	0,5	2,0	2,0	5,0	1,00
BB1	0,06	-	0,34	-	0,14
BB2	-	0,14	-	0,20	-
Carbonato de Na anidro	15,0	18,0	-	15,0	15,0
Sulfato	5,0	12,0	5,0	17,0	3,0
Silicato	-	1,0	-	-	8,0
nprE (opcional)	0,03	-	0,1	0,06	-
PMN	-	0,05	-	-	0,1
Protease B (opcional)	-	0,01	-	-	-
Protease C (opcional)	-	-	-	0,01	-
Lipase	-	0,008	-	-	-
amilase	0,001	-	-	-	0,001
Celulase	-	0,0014	-	-	-
Pectina liase	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Aldose Oxidase	0,03	-	0,05	-	-
PAAC	-	0,01	-	-	0,05
qsp 100% umidade e/ou substâncias secundárias*					

* Perfume, corante, alvejante/SRP1/carbóxi metilcelulose de

Na/fotobranqueador/MgSO₄/PVPVI/ supressor de espuma /PEG de alto peso molecular /argila.

Exemplo 15

Composições detergentes em tabletes

[00670] Este exemplo fornece várias formulações detergentes em tabletes. As seguintes composições detergentes em tabletes da presente invenção são preparadas pela compactação de uma composição detergente para lavar louças granular a uma pressão de 13 KN/cm² usando uma prensa giratória de 12 cabeças padrão. Em cada uma destas formulações, pelo menos uma variante de protease aqui fornecida está incluída a uma concentração de cerca de 0,0001 até cerca de 10 por cento, em peso. Em alguns aspectos alternativos, outras concentrações poderão ser usadas, conforme determinado pelo formulador, com base nas suas necessidades.

Tabela 15-1: Composições detergentes em tabletes								
Composto	Formulações							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
STPP	-	48,8	44,7	38,2	-	42,4	46,1	46,0
Citrato de 3Na 2H ₂ O	20,0	-	-	-	35,9	-	-	-
Carbonato de Na	20,0	5,0	14,0	15,4	8,0	23,0	20,0	-
Silicato	15,0	14,8	15,0	12,6	23,4	2,9	4,3	4,2
Lipase	0,00 1	-	0,01	-	0,02	-	-	-
Protease B (opcional)	0,01	-	-	-	-	-	-	-
Protease C (opcional)	-	-	-	-	-	0,01	-	-
nprE (opcional)	0,01	0,08	-	0,04	-	0,02 3	-	0,05
PMN	-	-	0,05	-	0,05 2	-	0,02 3	-
amilase	0,01 2	0,01 2	0,01 2	-	0,01 5	-	0,01 7	0,00 2

Tabela 15-1: Composições detergentes em tabletes								
Composto	Formulações							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Pectina liase	0,005	-	-	0,002	-	-	-	-
Aldose Oxidase	-	0,03	-	0,02	0,02	-	0,03	-
PB1	-	-	3,8	-	7,8	-	-	4,5
percarbonato	6,0	-	-	6,0	-	5,0	-	-
BB1	0,2	-	0,5	-	0,3	0,2	-	-
BB2	-	0,2	-	0,5	-	-	0,1	0,2
Não iônico	1,5	2,0	2,0	2,2	1,0	4,2	4,0	6,5
PAAC	0,01	0,01	0,02	-	-	-	-	-
DETBCHD	-	-	-	0,02	0,02	-	-	-
TAED	-	-	-	-	-	2,1	-	1,6
HEDP	1,0	-	-	0,9	-	0,4	0,2	-
DETPMP	0,7	-	-	-	-	-	-	-
parafina	0,4	0,5	0,5	0,5	-	-	0,5	-
BTA	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	-
policarboxilato	4,0	-	-	-	4,9	0,6	0,8	-
PEG 400 a 30.000	-	-	-	-	-	2,0	-	2,0
Glicerol	-	-	-	-	-	0,4	-	0,5
Perfume	-	-	-	0,05	0,2	0,2	0,2	0,2
qsp 100% umidade e/ou substâncias secundárias*								

* alvejante/SRP1/carbóxi metilcelulose de Na/fotobranqueador/MgSO₄/ PVPVI/ supressor de espuma /PEG de alto peso molecular /argila.

[00671] O pH dos exemplos 14(I) a 14(VII) é de cerca de 10 a cerca de 11,5; o pH de 14(VIII) é de 8 a 10. O peso do tablete dos exemplos 14(I) a 14(VIII) é de cerca de 20 gramas a cerca de 30 gramas.

Exemplo 16

Composições detergentes líquidas para lavagem de roupas

[00672] Neste exemplo, são fornecidas várias formulações para composições detergentes líquidas para lavagem de roupas. As seguintes composições detergentes líquidas para lavagem de roupas

da presente invenção são preparadas conforme mostrado abaixo. Em cada uma destas formulações, pelo menos uma variante de protease aqui fornecida está incluída a uma concentração de cerca de 0,0001 até cerca de 10 por cento, em peso. Em alguns aspectos alternativos, outras concentrações poderão ser usadas, conforme determinado pelo formulador, com base nas suas necessidades.

Tabela 16-1: Composições detergentes líquidas para lavagem de roupas					
Composto	Formulações				
	I	II	III	IV	V
LAS	24,0	32,0	6,0	3,0	6,0
NaC ₁₆ -C ₁₇ HSAS	-	-	-	5,0	-
C ₁₂ -C ₁₅ AE _{1,8} S	-	-	8,0	7,0	5,0
C ₈ -C ₁₀ propil dimetilamina	2,0	2,0	2,0	2,0	1,0
Óxido de C ₁₂ -C ₁₄ alquil dimetilamina	-	-	-	-	2,0
C ₁₂ -C ₁₅ AS	-	-	17,0	-	8,0
CFAA	-	5,0	4,0	4,0	3,0
Etóxilato de álcool graxo C ₁₂ -C ₁₄	12,0	6,0	1,0	1,0	1,0
Ácido graxo C ₁₂ -C ₁₈	3,0	-	4,0	2,0	3,0
Ácido cítrico (anidro)	4,5	5,0	3,0	2,0	1,0
DETPMP	-	-	1,0	1,0	0,5
Monoetanolamina	5,0	5,0	5,0	5,0	2,0
Hidróxido de sódio	-	-	2,5	1,0	1,5
Solução aquosa de HCl a 1N	No.1	No.1	-	-	-
Propanodiol	12,7	14,5	13,1	10.	8,0
Etanol	1,8	2,4	4,7	5,4	1,0
DTPA	0,5	0,4	0,3	0,4	0,5
Pectina liase	-	-	-	0,00 5	-
amilase	0,001	0,00 2	-	-	-

Tabela 16-1: Composições detergentes líquidas para lavagem de roupas					
Celulase	-	-	0,000 2	-	0,000 1
Lipase	0,1	-	0,1	-	0,1
NprE (opcional)	0,05	0,3	-	0,5	0,2
PMN	-	-	0,08	-	-
Protease A (opcional)	-	-	-	-	0,1
Aldose Oxidase	-	-	0,3	-	0,003
ZnCl ₂	0,1	0,05	0,05	0,05	0,02
Formiato de Ca	0,05	0,07	0,05	0,06	0,07
DETBCHD	-	-	0,02	0,01	-
SRP1	0,5	0,5	-	0,3	0,3
Ácido bórico	-	-	-	-	2,4
Xileno sulfonato de sódio	-	-	3,0	-	-
Cumeno sulfonato de sódio	-	-	-	0,3	0,5
DC 3225C	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
2-butil-octanol	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03
Alvejante 1	0,12	0,10	0,18	0,08	0,10
qsp 100% perfume/corante e/ou água					

n° 1: Adicionar uma solução aquosa de HCl a 1N para ajustar o pH puro da fórmula na faixa de cerca de 3 a cerca de 5.

[00673] O pH dos exemplos acima 15 (I)-(II) é de cerca de 5 a cerca de 7 e de 15 (III)-(V) é de cerca de 7,5 a cerca de 8,5.

Tabela 16-2: Detergentes líquidos para lavagem de roupas						
Composto	Formulações					
	I	II	III	IV	V	VI
LAS	11,5	11,5	9,0	-	4,0	-
C ₁₂ -C ₁₅ AE _{2,85} S	-	-	3,0	18,0	-	16,0
C ₁₄ -C ₁₅ E _{2,5} S	11,5	11,5	3,0	-	16,0	-
C ₁₂ -C ₁₃ E ₉	-	-	3,0	2,0	2,0	1,0
C ₁₂ -C ₁₃ E ₇	3,2	3,2	-	-	-	-

Tabela 16-2: Detergentes líquidos para lavagem de roupas						
Composto	Formulações					
	I	II	III	IV	V	VI
CFAA	-	-	-	5,0	-	3,0
TPKFA	2,0	2,0	-	2,0	0,5	2,0
Ácido cítrico (anidro)	3,2	3,2	0,5	1,2	2,0	1,2
Formiato de Ca	0,1	0,1	0,06	0,1	-	-
Formiato de Na	0,5	0,5	0,06	0,1	0,05	0,05
ZnCl ₂	0,1	0,05	0,06	0,03	0,05	0,05
Cumeno sulfonato de Na	4,0	4,0	1,0	3,0	1,2	-
Borato	0,6	0,6	1,5	-	-	-
Hidróxido de Na	6,0	6,0	2,0	3,5	4,0	3,0
Etanol	2,0	2,0	1,0	4,0	4,0	3,0
1,2 propanodiol	3,0	3,0	2,0	8,0	8,0	5,0
Monoetanolamina	3,0	3,0	1,5	1,0	2,5	1,0
TEPAE	2,0	2,0	-	1,0	1,0	1,0
nprE (opcional)	0,03	0,05	-	0,03	-	0,02
PMN	-	-	0,01	-	0,08	-
Protease A (opcional)	-	-	0,01	-	-	-
Lipase	-	-	-	0,002	-	-
amilase	-	-	-	-	0,002	-
Celulase	-	-	-	-	-	0,0001
Pectina liase	0,005	0,005	-	-	-	-
Aldose Oxidase	0,05	-	-	0,05	-	0,02
Galactose oxidase	-	0,04	-	-	-	-
PAAC	0,03	0,03	0,02	-	-	-
DETBCHD	-	-	-	0,02	0,01	-
SRP 1	0,2	0,2	-	0,1	-	-

Tabela 16-2: Detergentes líquidos para lavagem de roupas						
Composto	Formulações					
	I	II	III	IV	V	VI
DTPA	-	-	-	0,3	-	-
PVNO	-	-	-	0,3	-	0,2
Alvejante 1	0,2	0,2	0,07	0,1	-	-
Antiespumante de silicone	0,04	0,04	0,02	0,1	0,1	0,1
qsp 100% perfume/corante e/ou água						

Exemplo 17

Composições detergentes líquidas para lavagem de louças à mão

[00674] Neste exemplo, são fornecidas várias formulações detergentes líquidas para lavagem de louças à mão. As composições detergentes líquidas para lavagem de louças à mão da invenção são fornecidas abaixo. Em cada uma destas formulações, pelo menos uma variante de protease aqui fornecida está incluída a uma concentração de cerca de 0,0001 até cerca de 10 por cento, em peso. Em alguns aspectos alternativos, outras concentrações poderão ser usadas, conforme determinado pelo formulador, com base nas suas necessidades.

Tabela 17-1: Composições detergentes líquidas para lavagem de louças à mão						
Composto	Formulações					
	I	II	III	IV	V	VI
C ₁₂ -C ₁₅ AE _{1,8} S	30,0	28,0	25,0	-	15,0	10,0
LAS	-	-	-	5,0	15,0	12,0
sulfonato de parafina	-	-	-	20,0	-	-
Óxido de C ₁₀ -C ₁₈ alquil dimetilamina	5,0	3,0	7,0	-	-	-
Betaína	3,0	-	1,0	3,0	1,0	-

Tabela 17-1: Composições detergentes líquidas para lavagem de louças à mão						
Composto	Formulações					
	I	II	III	IV	V	VI
Amida de ácido graxo C ₁₂ poli-OH	-	-	-	3,0	-	1,0
Amida de ácido graxo C ₁₄ poli-OH	-	1,5	-	-	-	-
C ₁₁ E ₉	2,0	-	4,0	-	-	20,0
DTPA	-	-	-	-	0,2	-
Citrato trissódico desidratado	0,25	-	-	0,7	-	-
Diamina	1,0	5,0	7,0	1,0	5,0	7,0
MgCl ₂	0,25	-	-	1,0	-	-
nprE (opcional)	0,02	0,01	-	0,01	-	0,05
PMN	-	-	0,03	-	0,02	-
Protease A (opcional)	-	0,01	-	-	-	-
amilase	0,001	-	-	0,002	-	0,001
Aldose Oxidase	0,03	-	0,02	-	0,05	-
Cumenossulfonato de sódio	-	-	-	2,0	1,5	3,0
PAAC	0,01	0,01	0,02	-	-	-
DETBCHD	-	-	-	0,01	0,02	0,01
qsp 100% perfume/corante e/ou água						

[00675] O pH dos exemplos 16(I)-(VI) é de cerca de 8 a cerca de 11.

Exemplo 18

Composições detergentes líquidas para lavagem de louças automática

[00676] Neste exemplo, são fornecidas várias formulações detergentes líquidas para lavagem de louças automática. As composições detergentes líquidas para lavagem de louças à mão da

invenção são fornecidas abaixo. Em cada uma destas formulações, pelo menos uma variante de protease aqui fornecida está incluída a uma concentração de cerca de 0,0001 até cerca de 10 por cento, em peso. Em alguns aspectos, outras concentrações poderão ser usadas, conforme determinado pelo formulador, com base nas suas necessidades.

Tabela 18-1: Composições detergentes líquidas para lavagem de louças automática					
Composto	Formulações				
	I	II	III	IV	V
STPP	16	16	18	16	16
Sulfato de potássio	-	10	8	-	10
1,2 propanodiol	6,0	0,5	2,0	6,0	0,5
Ácido bórico	-	-	-	4,0	3,0
Di-hidrato de CaCl ₂	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Não iônico	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
nprE (opcional)	0,1	0,03	-	0,03	-
PMN	-	-	0,05	-	0,06
Protease B (opcional)	-	-	-	0,01	-
amilase	0,02	-	0,02	0,02	-
Aldose Oxidase	-	0,15	0,02	-	0,01
Galactose oxidase	-	-	0,01	-	0,01
PAAC	0,01	-	-	0,01	-
DETBCHD	-	0,01	-	-	0,01
qsp 100% perfume/corante e/ou água					

Exemplo 19

Detergentes para lavagem de pratos de alta densidade

[00677] Este exemplo fornece várias formulações para detergentes para lavagem de pratos de alta densidade. Os detergentes de alta densidade e compactos para lavagem de pratos da presente invenção são fornecidos abaixo. Em cada formulação, pelo menos uma variante

de protease aqui fornecida está incluída a uma concentração de cerca de 0,0001 até cerca de 10 por cento, em peso. Em alguns aspectos, outras concentrações poderão ser usadas, conforme determinado pelo formulador, com base nas suas necessidades.

Tabela 19-1: Detergentes de alta densidade para lavagem de pratos						
Composto	Formulações					
	I	II	III	IV	V	VI
STPP	-	45,0	45,0	-	-	40,0
Citrato de 3Na 2H ₂ O	17,0	-	-	50,0	40,2	-
Carbonato de Na	17,5	14,0	20,0	-	8,0	33,6
Bicarbonato	-	-	-	26,0	-	-
Silicato	15,0	15,0	8,0	-	25,0	3,6
Metassilicato	2,5	4,5	4,5	-	-	-
PB1	-	-	4,5	-	-	-
PB4	-	-	-	5,0	-	-
percarbonato	-	-	-	-	-	4,8
BB1	-	0,1	0,1	-	0,5	-
BB2	0,2	0,05	-	0,1	-	0,6
Não iônico	2,0	1,5	1,5	3,0	1,9	5,9
HEDP	1,0	-	-	-	-	-
DETPMP	0,6	-	-	-	-	-
PAAC	0,03	0,05	0,02	-	-	-
parafina	0,5	0,4	0,4	0,6	-	-
nprE (opcional)	0,072	0,053	-	0,026	-	0,01
PMN	-	-	0,053	-	0,059	-
Protease B (opcional)	-	-	-	-	-	0,01
amilase	0,012	-	0,012	-	0,021	0,006
Lipase	-	0,001	-	0,005	-	-
Pectina liase	0,001	0,001	0,001	-	-	-
Aldose Oxidase	0,05	0,05	0,03	0,01	0,02	0,01
BTA	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3

Tabela 19-1: Detergentes de alta densidade para lavagem de pratos						
Composto	Formulações					
	I	II	III	IV	V	VI
policarboxilato	6,0	-	-	-	4,0	0,9
Perfume	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
qsp 100% umidade e/ou substâncias secundárias*						

* alvejante/corante/SRP1/carbóxi metilcelulose de Na/fotobranqueador/ MgSO₄/PVPVI/ supressor de espuma /PEG de alto peso molecular /argila.

[00678] O pH dos exemplos 18(I) a (VI) é de cerca de 9,6 a cerca de 11,3;

Exemplo 20

Detergentes líquidos para limpeza de superfícies duras

[00679] Este exemplo fornece várias formulações para detergentes líquidos para limpeza de superfícies duras. As composições detergentes líquidas para limpeza de superfícies duras da invenção são fornecidas abaixo. Em cada uma destas formulações, pelo menos uma variante de protease aqui fornecida está incluída a uma concentração de cerca de 0,0001 até cerca de 10 por cento, em peso. Em alguns aspectos, outras concentrações poderão ser usadas, conforme determinado pelo formulador, com base nas suas necessidades.

Tabela 20-1: Detergentes líquidos para limpeza de superfícies duras							
Composto	Formulações						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
C ₉ -C ₁₁ E ₅	2,4	1,9	2,5	2,5	2,5	2,4	2,5
C ₁₂ -C ₁₄ E ₅	3,6	2,9	2,5	2,5	2,5	3,6	2,5
C ₇ -C ₉ E ₆	-	-	-	-	8,0	-	-
C ₁₂ -C ₁₄ E ₂₁	1,0	0,8	4,0	2,0	2,0	1,0	2,0
LAS	-	-	-	0,8	0,8	-	0,8

Tabela 20-1: Detergentes líquidos para limpeza de superfícies duras							
Composto	Formulações						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
Cumeno sulfonato de sódio	1,5	2,6	-	1,5	1,5	1,5	1,5
Isachem® AS	0,6	0,6	-	-	-	0,6	-
Na ₂ CO ₃	0,6	0,13	0,6	0,1	0,2	0,6	0,2
Citrato de 3Na · 2H ₂ O	0,5	0,56	0,5	0,6	0,75	0,5	0,75
NaOH	0,3	0,33	0,3	0,3	0,5	0,3	0,5
Ácido graxo	0,6	0,13	0,6	0,1	0,4	0,6	0,4
2-butil-octanol	0,3	0,3	-	0,3	0,3	0,3	0,3
PEG DME-2000®	0,4	-	0,3	0,35	0,5	-	-
PVP	0,3	0,4	0,6	0,3	0,5	-	-
MME PEG (2000)®	-	-	-	-	-	0,5	0,5
Jeffamine® ED-2001	-	0,4	-	-	0,5	-	-
PAAC	-	-	-	0,03	0,03	0,03	-
DETBCHD	0,03	0,05	0,05	-	-	-	-
nprE (opcional)	0,07	-	0,08	0,03	-	0,01	0,04
PMN	-	0,05	-	-	0,06	-	-
Protease B (opcional)	-	-	-	-	-	0,01	-
amilase	0,12	0,01	0,01	-	0,02	-	0,01
Lipase	-	0,001	-	0,005	-	0,005	-
Pectina liase	0,001	-	0,001	-	-	-	0,002
ZnCl ₂	0,02	0,01	0,03	0,05	0,1	0,05	0,02
Formiato de cálcio	0,03	0,03	0,01	-	-	-	-
PB1	-	4,6	-	3,8	-	-	-
Aldose Oxidase	0,05	-	0,03	-	0,02	0,02	0,05
qsp 100% perfume/corante e/ou água							

[00680] O pH dos exemplos 19(I) a (VII) é de cerca de 7,4 a cerca

de 9,5.

[00681] Todas as publicações, pedidos de patente e patentes citados neste relatório descritivo estão aqui incorporados, a título de referência da mesma forma que estariam se cada publicação, pedido de patente ou patente individual fosse individualmente e especificamente indicada como estando incorporada por referência. Em particular, todas as publicações aqui citadas estão expressamente incorporadas, a título de referência com o propósito de descrever e revelar composições e metodologias que podem ser usadas com relação à invenção. Embora a invenção anteriormente mencionada tenha sido descrita em algum detalhe à título de ilustração e exemplo, para fins de clareza de entendimento, será facilmente evidente para os versados na técnica em vista dos ensinamentos desta invenção, que certas alterações e modificações podem ser praticadas a ela sem se desviar do espírito e escopo das reivindicações em anexo.

REIVINDICAÇÕES

1. Variante de protease isolada, caracterizada pelo fato de que tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 ou a sequência de:

- ai) BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128S-Y217Q;
- a) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+A088T+N109G+ A116T+G131H+N243V+L257G;
- b) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+S033T+N076D;
- c) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128S+Y217Q+S009T+N109G+ K141R+N243V;
- d) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+S162G+K256R;
- e) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+N109G+A116T;
- f) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+N109G+L257G;
- g) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+S162G+L257G;
- h) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+N061G+N109G+ N243V;
- i) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128S+Y217Q+N109G+N243V+ S248A;
- j) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128S+Y217Q+S033T+N076D+ N109G+ N218S+N243V+S248N+K256R;
- k) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+N109G+A116T+ N243V+K256R;
- l) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+A088T+N109G+ A116T+G131H+N243V;
- m) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+

A088T+N109G;

n) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+N109G+N243V;

o) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+T158S+L257G;

p) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+N061S+N109G+ N243V;

q) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128S+Y217Q+P040A+N109G+ N243V+S248N+K256R;

r) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128S+Y217Q+S009T+S018T+ Y021N+N109G+K141R;

s) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+A088T+N109G+ A116T+T158S+N243V+K256R;

t) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+A088T+N109G+ A116T+T158S+N218S+L257G;

u) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+N109G+K256R;

v) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128S+Y217Q+N109G+N243V+ K256R;

w) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+S063G+K256R;

x) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+S063G+N109G;

y) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128S+Y217Q+S063G;

z) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+S063G+N076D;

aa) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128S+Y217Q+S033T+N076D+ N218S;

bb) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q+

N076D+N218S; ou

cc) BPN'-S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q,

em que a variante tem atividade proteolítica e/ou de limpeza melhorada em comparação com a atividade proteolítica e/ou de limpeza da protease BNP' possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, e cada posição de aminoácido da variante é numerada por correspondência a uma posição de aminoácido na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, conforme determinado pelo alinhamento de sequência de aminoácidos da variante com a SEQ ID NO: 2.

2. Ácido nucleico isolado, caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência de polinucleotídeos de SEQ ID NO: 5 que codifica a variante, como definida na reivindicação 1.

3. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos um ácido nucleico, como definido na reivindicação 2, opcionalmente em que o pelo menos um ácido nucleico está ligado de maneira operacional a um promotor.

4. Célula hospedeira recombinante, caracterizada pelo fato de que compreende: (a) um ácido nucleico, como definido na reivindicação 2, ou (b) um vetor de expressão, como definido na reivindicação 3,

em que a célula hospedeira recombinante é uma célula bacteriana, tal como uma célula de *Bacillus*, tal como uma célula de *Bacillus subtilis*.

5. Método para produzir uma variante de protease, caracterizado pelo fato de que compreende o cultivo de uma célula hospedeira recombinante, como definida na reivindicação 4, sob condições propícias para a produção da variante, e opcionalmente a recuperação da variante a partir da cultura celular.

6. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende

a variante, como definida na reivindicação 1, em que a composição não é um tecido e produto para cuidados do lar, por exemplo, em que a composição é uma composição detergente para limpeza de uma lente de contato ou uma uma composição de limpeza útil em uma aplicação de cuidados pessoais.

7. Composição, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que a composição compreende uma enzima adicional, por exemplo, em que a enzima adicional é selecionada do grupo que consiste em uma hemicelulase, celulase, amilase, peroxidase, protease, xilanase, lipase, fosfolipase, esterase, cutinase, pectinase, pectato liase, mananase, queratinase, redutase, oxidase, fenoxidase, lipoxigenase, ligninase, pululanase, tanase, pentosanase, malanase, β -glucanase, arabinosidase, hialuronidase, condroitinase e lacase.

8. Composição, de acordo com a reivindicação 6 ou 7, caracterizada pelo fato de que compreende, ainda, pelo menos um builder e/ou pelo menos um tensoativo.

9. Método para limpeza de um item ou de uma superfície em necessidade de limpeza, caracterizado pelo fato de que compreende o contato do item ou da superfície com uma variante, como definida na reivindicação 1, ou com uma composição, como definida em qualquer uma das reivindicações 6 a 8, e opcionalmente o enxágue do item ou da superfície com água.

FIG. 1

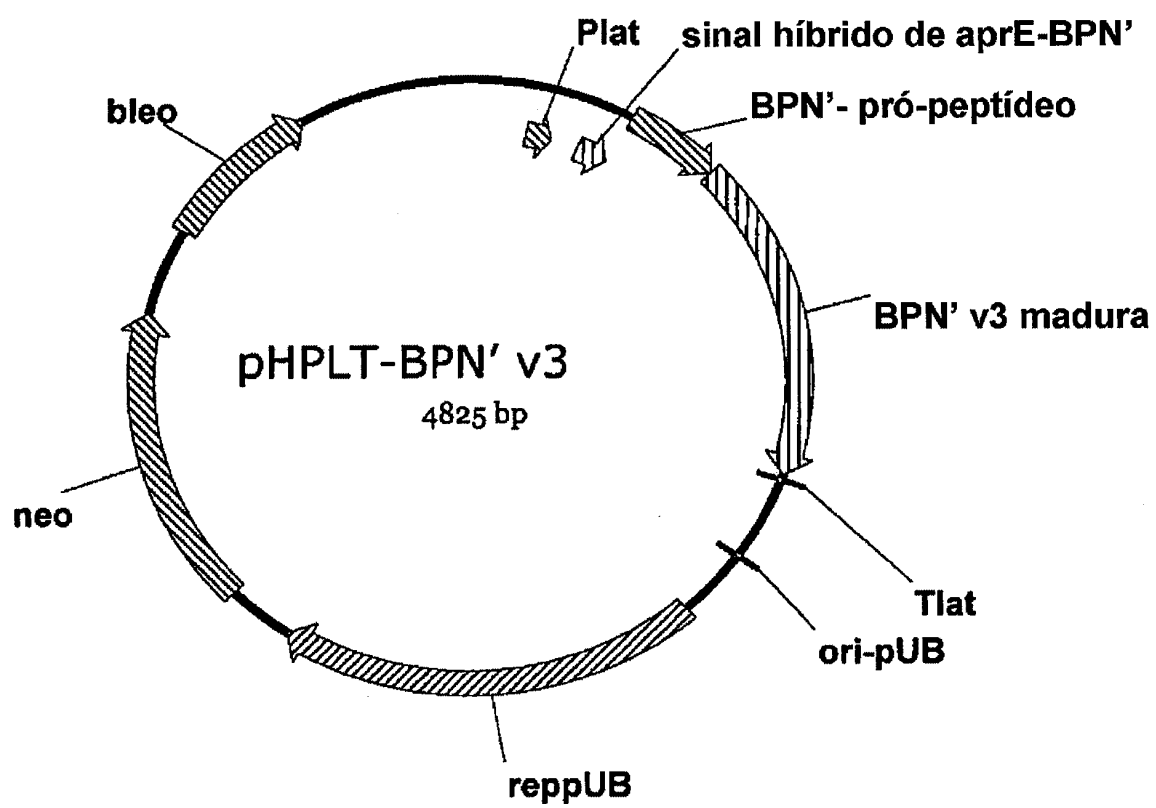


FIG. 2

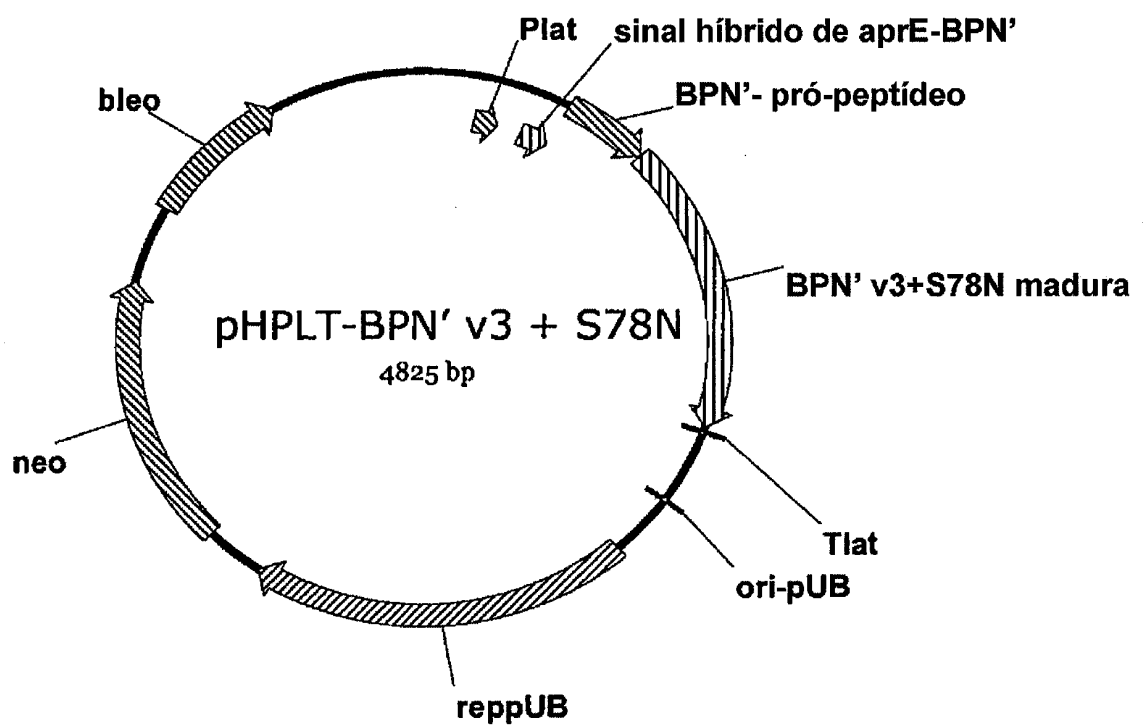


FIG. 3

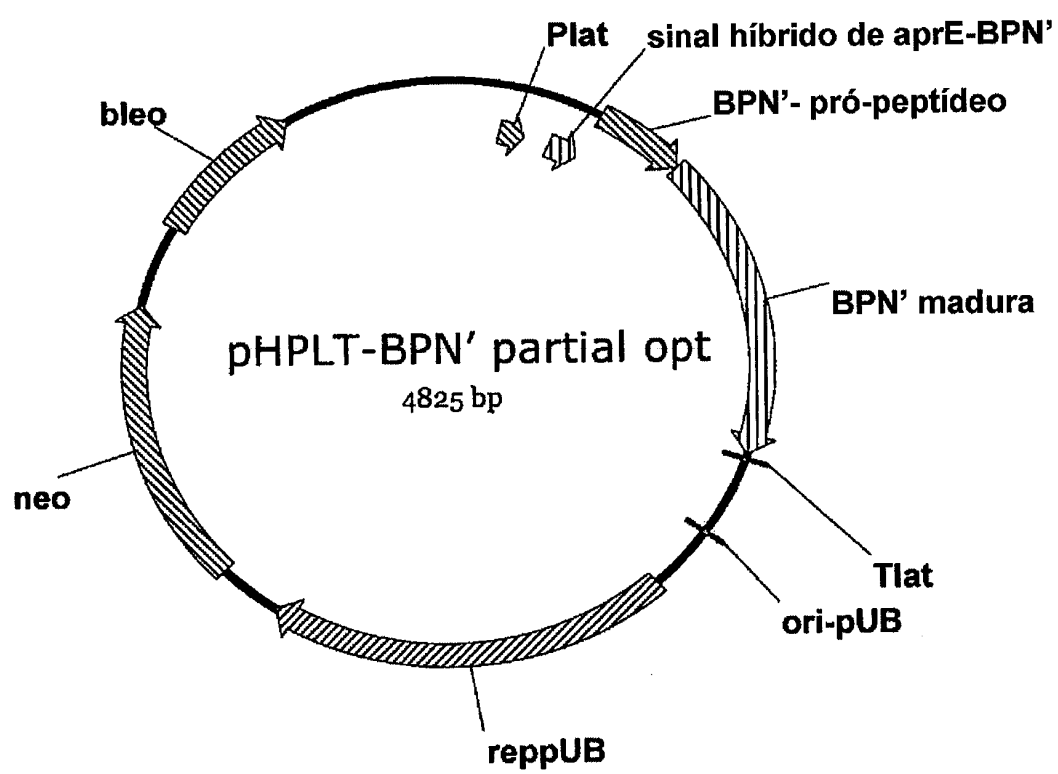


FIG. 4

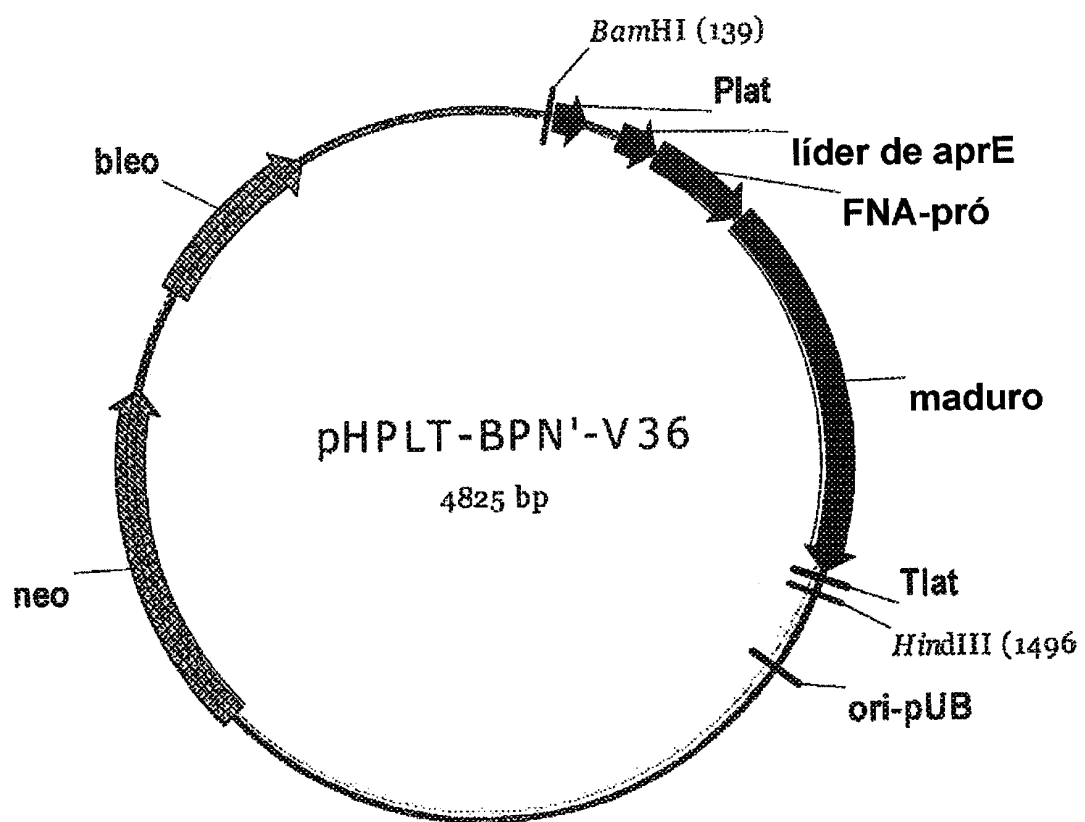


FIG. 5

BPN'	1	AQSVPYGVSQ	IKAPALHSQG	YTGSNVKVAV	IDSGIDSSHP	DLKVAGGASM	VPSETNPFQD
GG36	1	AQSVPWGISR	VQAPAAHNRG	LTGSGVKVAV	LDTGIS-THP	DLNIRGGASF	VPGEPT-QD
BPN'	61	NNSHGTHVAG	TVAALNNSIG	VLGVAPSASL	YAVKVLGADG	SGQYSWIING	IEWAIANNMD
GG36	59	GNGHGTHVAG	TIAALNNSIG	VLGVAPSAEL	YAVKVLGASG	SGSVSSIAQG	LEWAGNNGMH
BPN'	121	VINMSLGGPS	GSAALKAADV	KAVASGVVVV	AAAGNEGTSG	SSSTVGYPGK	YPSVIAVGAV
GG36	119	VANLSLGGPS	PSATLEQAVN	SATSRGVLVV	AASGNSGAGS	161 ----ISYPAR	YANAMAVGAT
BPN'	181	DSSNQRASFS	QYGPELDVMA	PGVSIQSTLP	GNKYGAYNGT	SMASPHVAGA	AALILSKHPN
GG36	175	DQNNNRASFS	QYGAGLDIVA	PGVNVQSTYP	GSTYASLNGT	SMATPHVAGA	AALVKQKNPS
BPN'	241	WINTQVRSSL	ENTTTKLGDS	FYVGKGLINV	QAAAQ		
GG36	235	WSNVQIRNHL	KNTATSLGST	NLYGSGLVNA	EAATR		

FIG. 6

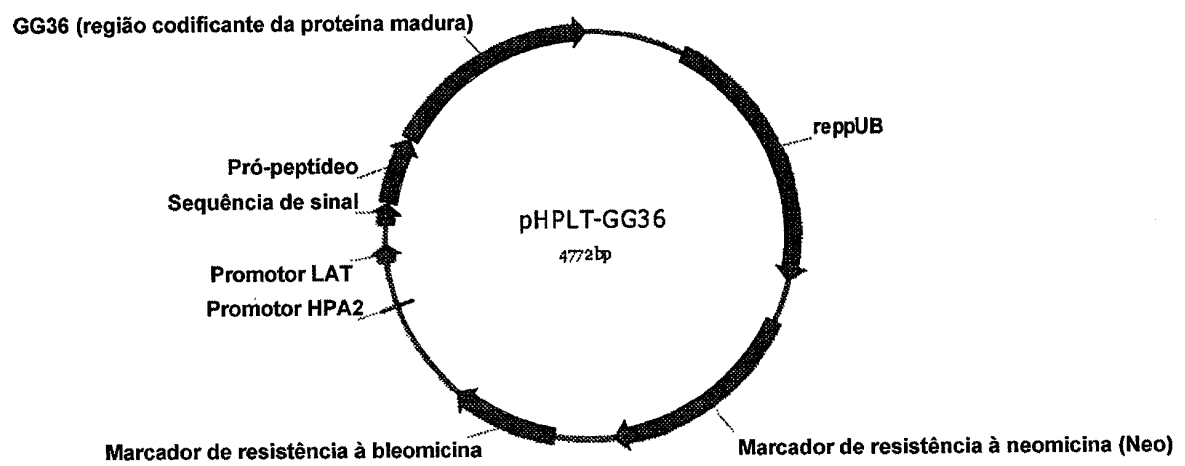


FIG. 7

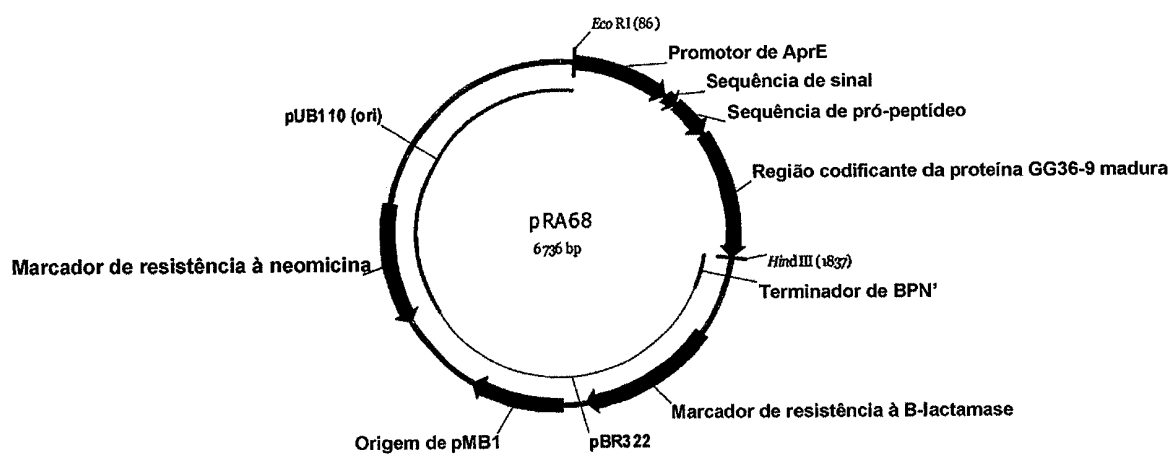


FIG. 8

