



**República Federativa do Brasil**  
Ministério da Indústria, Comércio Exterior  
e Serviços  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0714329-0 B1**

**(22) Data do Depósito:** 09/07/2007

**(45) Data de Concessão:** 12/09/2017



---

**(54) Título:** COMPOSIÇÃO DETERGENTE DE LAVAGEM DE PRATOS COMPREENDENDO VARIANTES DE PROTEASE ATIVAS SOBRE UMA AMPLA FAIXA DE TEMPERATURAS E PROCESSO DE LAVAGEM DE PRATOS

**(51) Int.Cl.:** C12N 9/54; C12N 15/57; C11D 3/386

**(30) Prioridade Unionista:** 18/07/2006 US 60831,732

**(73) Titular(es):** DANISCO US INC., GENENCOR DIVISION

**(72) Inventor(es):** PIETER AUGUSTINUS; FRITS GOEDEGEBUUR; AYROOKARAN J. POULOSE; JOHANNES CORNELIS VAN DER LAAN

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para  
**"COMPOSIÇÃO DETERGENTE DE LAVAGEM DE PRATOS  
COMPREENDENDO VARIANTES DE PROTEASE ATIVAS SOBRE  
UMA AMPLA FAIXA DE TEMPERATURAS E PROCESSO DE  
LAVAGEM DE PRATOS".**

[001] O presente pedido de patente reivindica prioridade para pedido de patente provisório U.S. pendente série N° 60/831 732.

Campo da Invenção

[002] A presente invenção provê composições de protease particularmente apropriadas para aplicações de lavagem de pratos.

Antecedentes da Invenção

[003] Tipicamente, composições de lavagem de pratos industriais e domésticas tradicionais baseiam-se em uma combinação de lavagens detergentes de alta alcalinidade e alvejamento com cloro para limpeza e sanitização de louça. Tais sistemas geralmente tem um bom desempenho sobre manchas que podem ser alvejadas. Entretanto, eles podem ser deficientes na remoção de sujeiras contendo proteína que são frequentemente presentes sobre louças em lares, hospitais, cafeterias, indústrias de serviço de bufê, etc. Em adição, composições contendo cloro e muito altamente alcalinas não são consideradas serem amistosas para o consumidor nem para o ambiente.

[004] Várias tentativas foram feitas para produção de composições de lavagem de pratos que sejam efetivas na remoção de sujeiras de proteínas. Estas composições tipicamente incluem proteases ativas sob condições alcalinas (por exemplo, pH de pelo menos 9,5). Entretanto, tais composições têm significantes desvantagens em que elas são de difícil formulação nas formas líquida ou gel, comumente preferidas por consumidores para detergentes de lavagem de pratos. Em adição, composições de lavagem de pratos

alcalinas frequentemente são consideradas serem irritantes.

[005] Algumas tentativas foram feitas para produzir composições de lavagem de pratos de baixo pH (por exemplo, pH de menos que 9,5). Estas composições são mais seguras, mais ambientalmente amistosas e capazes de formulação em géis e formas líquidas. Entretanto, correntes composições de lavagem de pratos com baixos pHs provaram ser muito ineficazes na remoção de sujeiras de proteínas, mesmo quando altas concentrações de enzimas (por exemplo, proteases) são formuladas nas composições de lavagem de pratos.

[006] Assim, permanece uma necessidade na técnica de composições de lavagem de pratos que sejam altamente efetivas na remoção de sujeiras protéicas de louça. Em adição, permanece uma necessidade de composições de lavagem de pratos que sejam mais amistosa ambientalmente e para o consumidor e estejam em uma forma que seja fácil de usar e de custo efetivo.

#### Sumário da Invenção

[007] A presente invenção provê proteases mutantes que exibem propriedades aperfeiçoadas para aplicação em detergentes de lavagem de pratos. Em algumas concretizações preferidas, as proteases mutantes têm pelo menos 70% de homologia com a sequência de aminoácidos de PB92 serina protease tendo a seguinte sequência de aminoácidos: H<sub>2</sub>N-

AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPTQDG  
 NGHGTIVAGTIAALNNSIGVLGVAPNAELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNGM  
 HVANLSLGSPSPSATLEQAVNSATSRGVLVVAASGNSGAGSISYPARYANAMAVGATD  
 QNNNRASFQYGAGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKN  
 PSWSNVQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSLVNAEAAATR-COOH (SEQ ID NO:2).

[008] Ainda em concretizações, as proteases mutantes têm pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 99% de homologia com SEQ ID NO:

2. Em cada realização preferida aqui, a protease mutante provê desempenho aperfeiçoado de lavagem e/ou aperfeiçoada estabilidade comparada a protease PB92 tipo selvagem.

[009] Em algumas concretizações preferidas, a presente invenção provê proteases variantes tendo desempenho aperfeiçoado de lavagem de pratos, comparadas à protease de partida. Em algumas concretizações particularmente preferidas, as enzimas incluem aquelas designadas como 049, 045, 046, 047/048, 050, 051/052, 053, 054, 055/056, 057, 058, 059, e 060, tendo as substituições como mostrado na Tabela 1, aqui. Em concretizações adicionais, a presente invenção provê estas enzimas tendo mutações adicionais (por exemplo, substituições, inserções e/ou supressões).

[0010] Em algumas concretizações particularmente preferidas, a presente invenção provê a enzima designada como 049, tendo a sequência de aminoácidos abaixo:

**AQSVPWGISR VQAPAAHNRG LTGSGVKVAV LDTGISTHPD  
LNIRGGASFV PGEPSTQDGN GHGTHVAGTI AALNNSIGVL  
GVAPNAELYA VKVLGASGSG SVSSIAQGLE WAGNNVMHVA  
NLSLGLQAPS ATLEQAVNSA TSRGVLVVAA SGNSGAGSIS  
YPARYANAMA VGATDQNNNR ASFSQYGAGL DIVAPGVNVQ  
STYPGSTYAS LNGTSMATPH VAGAAALVKQ KNPSWSNVQI  
RNHLKNTATS LGSTNLYGSG LVNAEAATR (SEQ ID NO:3)**

[0011] A presente invenção também provê novos detergentes de lavagem de pratos enzimáticos, compreendendo um produto enzima proteolítica que contem pelo menos uma das proteases mutantes providas aqui.

[0012] Em concretizações adicionais, a presente invenção provê composições de lavagem de pratos compreendendo uma subtilisina modificada, onde a dita subtilisina compreende pelo menos uma substituição na sequência mostrada em SEQ ID NO: 2, onde cada posição corresponde a uma posição da sequência de aminoácidos da sequência de aminoácidos de subtilisina BPN', e onde as substituições são selecionadas das seguintes posições: G118, S128, P129, S130, e

S166.

[0013] Em algumas concretizações, a subtilisina modificada compreende substituições feitas nas seguintes posições: G118, S128, P129, e S130. Em algumas concretizações preferidas, a subtilisina modificada compreende a mutação G118V e pelo menos uma mutação adicional. Em algumas concretizações particularmente preferidas, as mutações adicionais são selecionadas do grupo consistindo em S128F, S128L, S128N, S128R, S128V, P129E, P129L, P129M, P129N, P129Q, P129S, S130A, S130K, S130P, S130T, S130V, e S166D. Ainda em concretizações preferidas, a subtilisina modificada compreende substituições feitas nas seguintes posições S128, P129, e S130. Ainda em concretizações preferidas, as substituições são selecionadas do grupo consistindo em S128C, S128R, P129Q, P129R, S130D, e S130G. Em algumas concretizações particularmente preferidas, a sequência de aminoácidos da dita subtilisina modificada é mostrada em SEQ ID NO: 3.

[0014] A presente invenção também provê concretizações compreendendo composições lavagem de pratos compreendendo uma subtilisina modificada, onde adita subtilisina compreende uma substituição na sequência mostrada em SEQ ID NO: 2, onde cada posição corresponde a uma posição da sequência de aminoácidos da sequência de aminoácidos de subtilisina BPN', e onde a substituição é S130T.

[0015] A presente invenção também provê ácido nucléico isolado codificando uma subtilisina modificada, onde a dita subtilisina compreende pelo menos duas substituições na sequência mostrada em SEQ ID NO: 2, onde cada posição corresponde a uma posição da sequência de aminoácidos da sequência de aminoácidos de subtilisina BPN', e onde as substituições são selecionadas das seguintes posições: G118, S128, P129, S130, e S166. Em algumas

concretizações, o ácido nucléico codifica subtilisinas modificadas compreendendo substituições feitas nas seguintes posições: G118, S128, P129, e S130. Em algumas concretizações preferidas, o ácido nucléico codifica subtilisinas modificadas compreendendo a mutação G118V e pelo menos uma mutação adicional. Em algumas concretizações particularmente preferidas, o ácido nucléico ainda compreende mutações adicionais selecionadas do grupo consistindo em S128F, S128L, S128N, S128R, S128V, P129E, P129L, P129M, P129N, P129Q, P129S, S130A, S130K, S130P, S130T, S130V e S166D.

[0016] Ainda em concretizações preferidas, o ácido nucléico codifica subtilisina modificada compreendendo substituições feitas nas seguintes posições S128, P129, e S130. Ainda em concretizações preferidas, o ácido nucléico compreende substituições selecionadas do grupo consistindo em S128C, S128R, P129Q, P129R, S130D, e S130G.

[0017] Em algumas concretizações particularmente preferidas, a sequência de aminoácidos da subtilisina modificada é mostrada em SEQ ID NO: 3. Em algumas concretizações adicionais, a presente invenção provê ácido nucléico isolado codificando a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO: 3.

[0018] Ainda em concretizações adicionais, a presente invenção provê vetores compreendendo pelo menos um ácido nucléico isolado como descrito acima. Ainda em concretizações, a presente invenção provê vetores compreendendo pelo menos um do ácido nucléico isolado como mostrado acima. Ainda em concretizações, a presente invenção provê células hospedeiras compreendendo pelo menos um dos vetores descritos acima.

[0019] A presente invenção também provê processos de lavagem de pratos, compreendendo as etapas de: provimento de pelo menos

uma subtilisina modificada como descrito acima e louça em necessidade de limpeza; e contato de louça com pelo menos uma subtilisina modificada sob condições efetivas para provimento de limpeza da louça.

#### Descrição das Figuras

[0020] A figura 1A mostra a construção do vetor mutação contendo o gene PB92 protease.

[0021] A figura 1B provê um esquema mostrando o procedimento de mutação usado em algumas concretizações da presente invenção.

[0022] A figura 1C mostra a construção de um vetor de expressão contendo um gene PB92 protease mutante.

[0023] A figura 2 provê a sequência de nucleotídeos do gene PB92 protease (SEQ ID NO: 1) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) da pré-proteína codificada, pró-proteína e proteína madura.

#### Descrição da Invenção

[0024] A presente invenção provê processos e composições compreendendo pelo menos uma protease mutante para aplicações de lavagem de pratos.

[0025] A menos que de outro modo indicado, a prática da presente invenção envolve técnicas convencionais comumente usadas em biologia molecular, microbiologia, purificação de proteína, engenharia de proteína, sequenciamento de proteína e ADN, campos de ADN recombinante, e uso e desenvolvimento de enzima industrial, todos os quais estão dentro do conhecimento da técnica. Todas as patentes, pedidos de patentes, artigos e publicações aqui mencionados, ambos supra e infra, são pelo que expressamente aqui incorporados por referência.

[0026] Além disso, os títulos aqui providos não são limitações para os vários aspectos ou concretizações da invenção os quais podem ter sido por referência ao relatório descritivo como um todo.

Da mesma maneira, os termos definidos imediatamente abaixo são mais inteiramente definidos por referência ao relatório descritivo como um todo. Não obstante, de modo a facilitar entendimento da invenção, definições para um número de termos são providas abaixo.

[0027] A menos que de outro modo aqui definido, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm os mesmos significados como comumente entendidos por aqueles versados na técnica à qual esta invenção pertence. Por exemplo, Singleton and Sainsbury, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2d Ed., John Wiley and Sons, NY (1994); e Hale and Markham, The Harper Collins Dictionary of Biology, Harper Perennial, NY (1991) provêm aqueles versados na técnica com dicionários gerais de muitos dos termos usados na invenção. Embora quaisquer processos e materiais similares ou equivalentes àqueles aqui descritos encontrem uso na prática da presente invenção, processos e materiais preferidos são aqui descritos. Da mesma maneira, os termos definidos imediatamente abaixo são mais inteiramente descritos por referência ao relatório descritivo como um todo. Também, como aqui usados, os termos singulares, "um", "uma", e "o" incluem a referência plural a menos que o contexto claramente indique de outro modo. A menos que de outro modo indicado, ácidos nucleicos são escritos da esquerda para direita em orientação 5' para 3'; seqüências de aminoácidos são escritas da esquerda para direita em orientação amino para carboxi, respectivamente. É para ser entendido que esta invenção não é limitada à particular metodologia, protocolos, e reagentes descritos, na medida em que estes podem variar, dependendo do contexto em que são usados por aqueles versados na técnica.

[0028] É pretendido que toda limitação numérica máxima dada por todo este relatório descritivo inclua toda limitação numérica inferior, com se tais limitações numéricas inferiores fossem expressamente



aqui escritas. Toda limitação numérica mínima dada por todo este relatório descritivo incluirá toda limitação numérica superior, como se tais limitações numéricas superiores fossem expressamente aqui escritas. Toda faixa numérica dada por todo este relatório descritivo incluirá toda faixa numérica mais estreita que cai dentro de tal faixa numérica mais ampla, como se tais faixas numéricas mais estreitas fossem todas aqui expressamente escritas.

[0029] Como aqui usado, o termo "compatível", significa que os materiais de composição de limpeza não reduzem a atividade enzimática da enzima(s) protease aqui provida em uma extensão tal que a protease(s) não é/são efetiva como desejado durante situações de uso normal. Específicos materiais de composição de limpeza são exemplificados em detalhes a seguir.

[0030] Como aqui usado, "quantidade efetiva de enzima" refere-se à quantidade de enzima necessária para obter a atividade enzimática requerida na específica aplicação. Tais quantidades efetivas são facilmente determinadas por aqueles versados na técnica e são baseadas em muitos fatores, como a particular variante de enzima usada, a aplicação de limpeza, a específica composição da composição de limpeza, e se uma composição líquida ou seca (por exemplo, granular) é requerida, e similares.

[0031] Como aqui usado, "tendo propriedades aperfeiçoadas" usado em conexão com "enzimas proteolíticas mutantes", refere-se a enzimas proteolíticas com desempenho aperfeiçoado e/ou aperfeiçoada estabilidade com desempenho retida, em relação à correspondente protease tipo selvagem. Em algumas concretizações particularmente preferidas, as propriedades aperfeiçoadas são selecionadas do grupo consistindo em desempenho de lavagem de pratos aperfeiçoada e aperfeiçoada estabilidade, assim como a combinação de aperfeiçoada estabilidade de lavagem de pratos e

aperfeiçoada estabilidade.

[0032] Como aqui usada, a frase "estabilidade detergente" refere-se à estabilidade de uma composição detergente. Em algumas concretizações, a estabilidade é avaliada durante o uso do detergente, enquanto em outras concretizações, o termo refere-se à estabilidade de uma composição detergente durante estocagem.

[0033] O termo "estabilidade aperfeiçoada" é usado para indicar melhor estabilidade de protease(s) mutante em composições durante estocagem e/ou melhor estabilidade na espuma. Em concretizações preferidas, a protease(s) mutante exibe aperfeiçoada estabilidade em detergentes de cuidados de pratos durante estocagem e/ou aperfeiçoada estabilidade na espuma, que inclui estabilidade contra agentes oxidantes, agentes seqüestrantes, autólise, tensoativos e alta alcalinidade, em relação à correspondente enzima tipo selvagem.

[0034] Como aqui usada, a frase, "estabilidade a proteólise" refere-se à habilidade de uma proteína (por exemplo, uma enzima) a suportar proteólise. Não é pretendido que o termo seja limitado ao uso de qualquer particular protease para avaliar a estabilidade de uma proteína.

[0035] Como aqui usado, "estabilidade oxidativa" refere-se à habilidade de uma proteína funcionar sob condições oxidativas. Em particular, o termo refere-se à habilidade de uma proteína funcionar na presença de várias concentrações de  $H_2O_2$ , perácidos e outros oxidantes. Estabilidade sob várias condições oxidantes pode ser medida tanto através de procedimentos-padrão conhecidos por aqueles versados na técnica e/ou através de processos aqui descritos. Uma substancial mudança em estabilidade oxidante é evidenciada por pelo menos cerca de 5% ou maior aumento ou diminuição (na maioria de concretizações, é preferivelmente um aumento) na meia-vida da atividade enzimática, comparada à atividade enzimática presente na

ausência de compostos oxidantes.

[0036] Como aqui usado, "estabilidade de pH" refere-se à habilidade de uma proteína funcionar em um particular pH. Em geral, maioria de enzimas tem uma faixa de pH finita na qual elas funcionarão. Em adição para enzimas que funcionam em pHs de faixa média (isto é, ao redor de pH 7), existem enzimas que são capazes de funcionar sob condições com pHs muito altos ou muito baixos. Estabilidade em vários pHs pode ser medida através de procedimentos-padrão conhecidos por aqueles versados na técnica e/ou através dos processos aqui descritos. Uma substancial mudança em estabilidade de pH é evidenciada por pelo menos cerca de 5% maior aumento ou diminuição (na maioria de realização, é preferivelmente um aumento) na meia-vida da atividade enzimática, comparada à atividade enzimática no pH ótimo de enzima. Entretanto, não é pretendido que a presente invenção seja limitada a qualquer nível de estabilidade pH nem faixa de pH.

[0037] Como aqui usado, "estabilidade térmica" refere-se à habilidade de uma proteína funcionar em uma particular temperatura. Em geral, maioria das enzimas tem uma finita faixa de temperaturas na qual elas funcionarão. Em adição a enzimas que funcionam em temperaturas de faixa – média (por exemplo, temperatura ambiente), existem enzimas que são capazes de funcionarem em temperaturas muito altas ou muito baixas. Estabilidade térmica pode ser medida através de procedimentos conhecidos ou através de processos aqui descritos. Uma substancial mudança em estabilidade térmica é evidenciada por pelo menos cerca de 5% ou maior aumento ou diminuição (na maioria de reivindicações, é preferivelmente um aumento) na meia-vida da atividade catalítica de um mutante quando exposto a dada temperatura. Entretanto, não é pretendido que a presente invenção seja limitada a qualquer nível de estabilidade de

temperatura nem faixa de temperatura.

[0038] Como aqui usado, o termo "estabilidade química" refere-se à estabilidade de uma proteína (por exemplo, uma enzima) na direção de compostos químicos que podem afetar adversamente sua atividade. Em algumas concretizações, tais compostos químicos incluem, mas não são limitados a peróxido de hidrogênio, perácidos, detergentes aniônicos, detergentes catiônicos, detergentes não-iônicos, quelantes, etc. Entretanto, não é pretendido que a presente invenção seja limitada a qualquer particular nível de estabilidade química nem faixa de estabilidade química.

[0039] Como aqui usados, os termos "purificado" e "isolado" referem-se à remoção de contaminantes de uma amostra. Por exemplo, uma enzima de interesse é purificada por remoção de proteínas contaminantes e outros compostos dentro de uma solução ou preparação que não são a enzima de interesse. Em algumas concretizações, enzimas recombinantes de interesse são expressas em células hospedeiras bacterianas ou de fungos e estas enzimas recombinantes de interesse são purificadas pela remoção de outros constituintes de célula hospedeira; a porcentagem de enzima recombinante de polipeptídeos de interesse é pelo que aumentada na amostra.

[0040] Como aqui usado, "proteína de interesse", refere-se a uma proteína (por exemplo, uma enzima ou "enzima de interesse") que está sendo analisada, identificada e/ou modificada. Proteínas ocorrendo naturalmente, assim como recombinantes (por exemplo, mutantes) encontram uso na presente invenção.

[0041] Como aqui usado, "proteína" refere-se a qualquer composição compreendida por aminoácidos e reconhecida como uma proteína por aqueles versados na técnica. Os termos "proteína", "peptídeo" e polipeptídeo são aqui usados intercambiavelmente. Onde

um peptídeo é uma porção de uma proteína, aqueles versados na técnica entendem o uso do termo no contexto.

[0042] Como aqui usado, proteínas funcionalmente e/ou estruturalmente similares são consideradas serem "proteínas relacionadas". Em algumas concretizações, estas proteínas são derivadas de um diferente gênero e/ou espécies, incluindo diferenças entre classes de organismos (por exemplo, uma proteína bacteriana e uma proteína de fungo). Em algumas concretizações, estas proteínas são derivadas de um diferente gênero e/ou espécie, incluindo diferenças entre classes de organismos (por exemplo, uma enzima bacteriana e uma enzima de fungo). Em concretizações adicionais, proteínas relacionadas são providas das mesmas espécies. Realmente, não é pretendido que a presente invenção seja limitada a proteínas de qualquer fonte particular. Em adição, o termo "proteínas relacionadas" abrange homólogos estruturais terciários e homólogos de sequência primária (por exemplo, as enzimas da presente invenção). Ainda em concretizações, o termo abrange proteínas que são imunologicamente reativas-transversas.

[0043] Como aqui usado, o termo "derivado" refere-se a uma proteína que é derivada de uma proteína por adição (isto é, inserção) de um ou mais aminoácidos para qualquer ou ambas as extremidades terminais-C e N, substituição de um ou mais aminoácidos em um ou um número de diferentes sítios na sequência de aminoácidos, e/ou supressão de um ou mais aminoácidos em qualquer ou ambas extremidades da proteína ou em um ou mais sítios na sequência de aminoácidos, e/ou inserção de um ou mais aminoácidos em um ou mais sítios na sequência de aminoácidos. A preparação de um derivado de proteína é preferivelmente obtida por modificação de uma sequência de ADN que codifica a proteína nativa, transformação daquela sequência de ADN em um hospedeiro apropriado, e expressão da sequência de

ADN modificada para formar a proteína derivada.

[0044] Proteínas relacionadas (e derivadas) compreendem "proteínas variantes". Em algumas concretizações preferidas, proteínas variantes diferem de uma proteína parente e umas das outras por um pequeno número de resíduos de aminoácidos. O número de resíduos de aminoácidos diferentes pode ser um ou mais, preferivelmente 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, ou mais resíduos de aminoácidos. Em algumas concretizações preferidas, o número de aminoácidos diferentes entre variantes está entre 1 e 10. Em algumas concretizações particularmente preferidas, proteínas relacionadas e particularmente proteínas variantes compreende pelo menos cerca de 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% de identidade de seqüências de aminoácidos. Adicionalmente, uma proteína relacionada ou uma proteína variante como aqui usada, refere-se a uma proteína que difere de uma outra proteína relacionada ou uma proteína variante no número de regiões proeminentes. Por exemplo, em algumas concretizações, proteínas variantes têm 1, 2, 3, 4, 5, ou 10 correspondentes regiões proeminentes que diferem da proteína parente.

[0045] Vários processos são conhecidos na técnica que são apropriados para geração de variantes das enzimas protease da presente invenção, incluindo mas não limitado a mutagênese de saturação de sítio, mutagênese de exploração, mutagênese de inserção, mutagênese randômica, mutagênese de sítio direcionado, e evolução direcionada, assim como várias outras abordagens recombinatoriais.

[0046] Como aqui usado, "vetor de expressão" refere-se a uma construção de ADN contendo uma seqüência de ADN que é operavelmente ligada a uma apropriada seqüência controle capaz de efetuar a expressão do ADN em um hospedeiro apropriado. Tais

seqüências controles incluem um promotor para efetuar transcrição, uma sequência operadora opcional para controlar tal transcrição, uma sequência codificando apropriados sítios de ligação de ribossoma RNAm e seqüências que controlam término de transcrição e tradução. O vetor pode ser um plasmídeo, uma partícula fago, ou simplesmente uma potencial inserção genômica. Uma vez transformado em um hospedeiro apropriado, o vetor pode replicar e funcionar independentemente do genoma hospedeiro, ou pode, em alguns exemplos, integrar ele próprio no genoma. No presente relatório descritivo, "plasmídeo", "plasmídeo de expressão", e "vetor" são frequentemente usados intercambiavelmente, quando o plasmídeo é a forma mais comumente usada de vetor no presente. Entretanto, a invenção é pretendida incluir tais outras formas de vetores de expressão que servem funções equivalentes e que são, ou se tornam, conhecidos na técnica.

[0047] Em algumas concretizações preferidas, o gene protease é ligado em um apropriado plasmídeo de expressão. O gene protease clonado é então usado para transformar ou transfectar uma célula hospedeira de modo a expressar o gene protease. Este plasmídeo pode replicar em hospedeiros no sentido em que ele contem os elementos bem conhecidos necessários para replicação de plasmídeo ou o plasmídeo pode ser desenhado para integrar no cromossoma hospedeiro. Os elementos necessários são providos para eficiente expressão de gene (por exemplo, um promotor operavelmente ligado ao gene de interesse). Em algumas concretizações, estes elementos necessários são supridos como o promotor homólogo de próprio gene se ele é reconhecido (isto é, transcrito pelo hospedeiro), e um terminador de transcrição que é exógeno ou é suprido pela região terminadora endógena do gene protease. Em algumas concretizações, um gene de seleção tal como um gene de resistência a antibiótico que

permite contínua manutenção de cultura de células hospedeiras infectadas com plasmídeo através de crescimento em meios contendo antimicrobiais também é incluído.

[0048] O seguinte processo de mutagênese de cassete pode ser usado para facilitar a construção das variantes proteases da presente invenção, embora outros processos possam ser usados.

[0049] Primeiro, como aqui descrito, um gene ocorrendo naturalmente codificando a protease é obtido e seqüenciado no todo ou em parte. Então, a sequência é explorada para um ponto no qual é desejado fazer uma mutação (supressão, inserção ou substituição) de um ou mais aminoácidos na protease codificada. As seqüências flanqueando este ponto são avaliadas para a presença de sítios de restrição para substituição de um pequeno segmento do gene com uma reunião de oligonucleotídeos que quando expressos codificarão vários mutantes. Tais sítios de restrição são preferivelmente sítios únicos dentro de gene de proteína de modo a facilitar a substituição do segmento de gene. Entretanto, qualquer sítio de restrição conveniente que não seja demasiadamente redundante no gene protease pode ser usado, contanto que os fragmentos de gene gerados por digestão de restrição possam ser remontados em própria sequência. Se sítios de restrição não estão presentes em localizações dentro de uma conveniente distância a partir do ponto selecionado (de 10 a 15 nucleotídeos), tais sítios são gerados através de substituição de nucleotídeos no gene em uma maneira tal que nem o quadro de leitura nem os aminoácidos codificados são alterados na construção final. Mutação do gene de modo a alterar sua sequência para conformar à desejada sequência é realizada através de extensão de iniciador M13 de acordo com processos geralmente conhecidos. A tarefa de localização de apropriadas regiões flanqueantes e avaliação de alterações necessárias para chegar-se a duas seqüências de sítio de



restrição convenientes é feita rotina através de redundância do código genético, um mapa de enzima de restrição do gene e o grande número de diferentes enzimas de restrição. Notar que se um conveniente sítio de restrição flanqueante é disponível, o processo acima precisa ser usado somente em conexão com a região flanqueante que não contém um sítio.

[0050] Uma vez o ADN ocorrendo naturalmente e/ou ADN sintético seja clonado, os sítios de restrição flanqueando as posições a sofrerem mutação são digeridos com as enzimas de restrição cognatas e uma pluralidade de cassetes de oligonucleotídeos complementares – termini extremidades são ligados no gene. A mutagênese é simplificada através deste processo porque todos os oligonucleotídeos podem ser sintetizados de modo a terem os mesmos sítios de restrição, e nenhum ligador sintético é necessário para criação de sítios de restrição.

[0051] Como aqui usado, "correspondendo a", refere-se a um resíduo na posição enumerada em uma proteína ou peptídeo, ou um resíduo que é análogo, homólogo, ou equivalente a um resíduo enumerado em uma proteína ou peptídeo.

[0052] Como aqui usado, "região correspondendo", geralmente refere-se a uma posição análoga ao longo de proteínas relacionadas ou uma proteína parente.

[0053] Os termos "molécula de ácido nucléico codificando", "sequência de ácido nucléico codificando", "sequência de ADN codificando", e "ADN codificando" referem-se à ordem ou sequência de desoxirribonucleotídeos ao longo de uma fita de ácido desoxirribonucléico. A ordem destes desoxirribonucleotídeos determina a ordem de aminoácidos ao longo de cadeia de polipeptídeo (proteína). A sequência de ADN assim codifica a sequência de aminoácido.

[0054] Como aqui usado, o termo "sequência análoga" refere-se a uma sequência dentro de uma proteína que provê função similar, estrutura terciária e/ou resíduos conservados como a proteína de interesse (isto é, tipicamente a proteína original de interesse). Por exemplo, em regiões de epítopo que contêm uma hélice alfa ou uma estrutura de folha beta, os aminoácidos de substituição na sequência análoga preferivelmente mantêm a mesma estrutura específica. O termo também refere-se a seqüências de nucleotídeos, assim como seqüências de aminoácidos. Em algumas concretizações, seqüências análogas são desenvolvidas de modo que os aminoácidos de substituição resultam em uma enzima variante mostrando uma função similar ou aperfeiçoada. Em algumas concretizações preferidas, a estrutura terciária e/ou resíduos conservados dos aminoácidos na proteína de interesse estão localizados no ou próximos do segmento ou fragmento de interesse. Assim, onde o segmento ou fragmento de interesse contem, por exemplo, uma hélice alfa ou uma estrutura de folha beta, os aminoácidos de substituição preferivelmente mantêm aquela específica estrutura.

[0055] Como aqui usado, "proteína homóloga" refere-se a uma proteína (por exemplo, protease) que tem ação similar e/ou estrutura, como uma proteína de interesse (por exemplo, uma protease de uma outra fonte). Não é pretendido que homólogos sejam necessariamente evolucionariamente relacionados. Assim, é pretendido que o termo abrange a mesma enzima(s) ou similar (isto é, em termos de estrutura e função) obtida de diferentes espécies. Em algumas concretizações preferidas, é desejável identificar um homólogo que tem uma estrutura quaternária, terciária e/ou primária similar à proteína de interesse, na medida em que substituição para o segmento ou fragmento na proteína de interesse com um segmento análogo a partir do homólogo reduzirá a capacidade de interrupção da alteração. Em algumas

concretizações, proteínas homólogas induziram similar resposta(s) imunológica como uma proteína de interesse.

[0056] Como aqui usado, "genes homólogos" refere-se a pelo menos um par de genes de diferentes espécies, cujos genes correspondem um ao outro e que são idênticos ou muito similares um ao outro. O termo abrange genes que são separados por processo evolutivo (isto é, o desenvolvimento de novas espécies) (por exemplo, genes ortólogos), assim como genes que foram separados por duplicação genética (por exemplo, genes paralogos). Estes genes codificam "proteínas homólogas".

[0057] Como aqui usado, "ortólogo" ou "genes ortólogos" refere-se a genes em diferentes espécies que evoluíram de um gene ancestral comum (isto é, um gene homólogo) através de processo evolutivo. Tipicamente, ortólogos retêm a mesma função durante o curso de evolução. Identificação de ortólogos encontra uso na previsão confiável de função de gene em genomas recentemente seqüenciados.

[0058] Como aqui usado, "paralogo" e "genes paralogos" refere-se a genes que são relacionados por duplicação dentro de um genoma. Enquanto ortólogos retêm a mesma função através do curso de evolução, parálogos evoluem novas funções, embora algumas funções sejam frequentemente relacionadas ao original. Exemplos de genes paralogos incluem, mas não são limitados a genes codificando tripsina, quimiotripsina, elastase e trombina, que são todos serina proteinases e ocorrem juntos dentro das mesmas espécies.

[0059] Como aqui usado, proteínas "tipo selvagem" e "nativa" são aquelas encontradas em natureza. Os termos "sequência tipo selvagem" e "gene tipo selvagem" são aqui usados intercambiavelmente, para referirem-se a uma sequência que é nativa ou ocorrendo naturalmente em uma célula hospedeira. Em algumas

concretizações, a sequência tipo selvagem refere-se a uma sequência de interesse que é o ponto de partida de um projeto de engenharia de proteína. Os genes codificando a proteína ocorrendo naturalmente podem ser obtidos de acordo com os processos gerais conhecidos por aqueles versados na técnica. Os processos geralmente compreendem síntese de sondas rotuladas tendo seqüências putativas codificando regiões da proteína de interesse, preparação de bibliotecas genômicas a partir de organismos expressando a proteína, e seleção de bibliotecas para o gene de interesse através de hibridização às sondas. Clones hibridizando positivamente são então mapeados e seqüenciados.

[0060] O termo "molécula de ADN recombinante" como aqui usado refere-se a uma molécula de ADN que é compreendida por segmentos de ADN ligados por meio de técnicas de biologia molecular.

[0061] O termo "oligonucleotídeo recombinante" refere-se a um oligonucleotídeo criado usando manipulações de biologia molecular, incluindo mas não limitado a, ligação de duas ou mais seqüências de oligonucleotídeos geradas por digestão com enzima de restrição de uma sequência de polinucleotídeo, a síntese de oligonucleotídeos (por exemplo, a síntese de iniciadores ou oligonucleotídeos) e similares.

[0062] O grau de homologia entre seqüências pode ser determinado usando qualquer processo apropriado conhecido na técnica (vide, por exemplo, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math., 2:482 [1981]; Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol., 48:443 [1970]; Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 [1988]; programas tais como GAP, BESTFIT, FASTA, e TFASTA no Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group, Madison, WI); e Devereux et al., Nucl. Acid Res., 12:387-395 [1984]).

[0063] Por exemplo, PILEUP é um programa útil para determinar níveis de homologia de seqüências. PILEUP cria um múltiplo alinhamento de seqüências a partir de um grupo de seqüências

relacionadas usando alinhamentos em pares, progressivos. Ele também pode obter um gráfico de uma árvore mostrando as relações de formação de cacho usadas para criar o alinhamento. PILEUP usa uma simplificação do processo de alinhamento progressivo de Feng e Doolittle, (Feng and Doolittle, J. Mol. Evol., 35:351-360 [1987]). O processo é similar àquele descrito por Higgins and Sharp (Higgins and Sharp, CABIOS 5:151-153 [1989]). Parâmetros úteis PILEUP incluem um peso folga default de 3,00, um peso de comprimento de folga default de 0,10, e folgas de extremidade pesadas. Um outro exemplo de um algoritmo útil é o algoritmo BLAST, descrito por Altschul et al., (Altschul et al., J. Mol. Biol., 215:403-410, [1990]; e Karlin et al., 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]. Parâmetros "W", "T" e "X" determinam a sensibilidade e velocidade do alinhamento. O programa BLAST usa como descuido um comprimento de palavra (W) de 11, a matriz de escore BLOSUM62 (vide, Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 [1989]) alinhamento (B) de 50, expectativa (E) de 10, M'5, N'-4, e uma comparação de ambas fitas.

[0064] Como aqui usado, "porcentagem (%)" de identidade de sequência de ácido nucléico" é definida como a porcentagem de resíduos de nucleotídeos em uma sequência candidata que é idêntica com os resíduos de nucleotídeos da sequência.

[0065] Como aqui usado, o "hibridização" refere-se ao processo através do qual uma fita de ácido nucléico junta-se com uma fita complementar através de emparelhamento de bases, como conhecido na técnica.

[0066] Como aqui usada, a frase "condições de hibridização" refere-se às condições sob as quais reações de hibridização são conduzidas. Estas condições são tipicamente classificadas por grau de

"rigorosidade" das condições sob as quais hibridização é medida. O grau de rigorosidade pode ser baseado, por exemplo, na temperatura de fusão  $T_m$  do complexo ou sonda de ligação de ácido nucléico. Por exemplo, "rigorosidade máxima" tipicamente ocorre em cerca de  $T_m - 5^\circ\text{C}$  ( $5^\circ$  abaixo de  $T_m$  da sonda); "alta rigorosidade" em cerca de  $5-10^\circ$  abaixo de  $T_m$ ; "rigorosidade intermediária" em cerca de  $10-20^\circ$  abaixo de  $T_m$  da sonda; e "baixa rigorosidade" em cerca de  $20-25^\circ$  abaixo de  $T_m$ . Alternativamente, ou em adição, condições de hibridização podem ser baseadas nas condições de resistência iônica ou sal de hibridização e/ou uma ou mais lavagens rigorosas. Por exemplo,  $6\times\text{SSC}$  = rigorosidade muito baixa;  $3\times\text{SSC}$  = rigorosidade baixa a média;  $1\times\text{SSC}$  = rigorosidade média; e  $0,5\times\text{SSC}$  = alta rigorosidade. Funcionalmente, condições de rigorosidade máxima podem ser usadas para identificar seqüências de ácidos nucléicos tendo estrita identidade ou identidade próxima de estrita com a sonda de hibridização; enquanto condições de alta rigorosidade são usadas para identificar seqüências de ácidos nucléicos tendo cerca de 80% ou mais de identidade de seqüência com a sonda.

[0067] Para aplicações requerendo alta seletividade, é tipicamente desejável usar-se condições relativamente rigorosas para formação de híbridos (por exemplo, são usadas condições de sal relativamente baixo e/ou alta temperatura).

[0068] As frases "substancialmente similar" e "substancialmente idêntico" no contexto de pelo menos dois ácidos nucléicos ou polipeptídeos tipicamente significam que um polinucleotídeo ou polipeptídeo compreende uma seqüência que tem pelo menos cerca de 50% de identidade, mais preferivelmente pelo menos cerca de 60% de identidade, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 75% de identidade, mais preferivelmente pelo menos cerca de 80% de identidade, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 90%,

ainda mais preferivelmente cerca de 95%, mais preferivelmente cerca de 97% de identidade, algumas vezes tanto quanto cerca de 98% e cerca de 99% de identidade de sequência, comparada à sequência referência (isto é, tipo selvagem). Identidade de sequência pode ser determinada usando-se programas conhecidos como BLAST, ALIGN, e CLUSTAL usando parâmetros padrões (vide, por exemplo, Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 [1990]; Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 [1989]; Karin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873 [1993]; e Higgins et al., Gene 73:237-244 [1988]). Software para realização de análises BLASDT é publicamente disponível através de National Center for Biotechnology Information. Também, bases de dados podem ser exploradas usando FASTA (Pearson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448 [1988]). Uma indicação de que dois polipeptídeos são substancialmente idênticos é que o primeiro polipeptídeo seja imunologicamente reativo-cruzado com o segundo polipeptídeo. Tipicamente, polipeptídeos que diferem por substituições conservativas de aminoácidos são imunologicamente reativos-cruzados. Assim, um polipeptídeo é substancialmente idêntico a um segundo polipeptídeo, por exemplo, onde os dois peptídeos diferem somente por uma substituição conservativa. Uma outra indicação de que duas seqüências de ácidos nucléicos são substancialmente idênticas é que as duas moléculas hibridizam uma à outra sob condições rigorosas (por exemplo, dentro de uma faixa de rigorosidade média para alta).

[0069] Como aqui usado, "resíduos equivalentes" refere-se a proteínas que compartilham particulares resíduos de aminoácidos. Por exemplo, resíduos equivalentes podem ser identificados através de determinação de homologia no nível de estrutura terciária para uma proteína (por exemplo, protease) cuja estrutura terciária foi determinada por cristalografia de raios-x. Resíduos equivalentes são

definidos como aqueles para os quais as coordenadas atômicas de dois ou mais átomos de cadeia principal de um particular resíduo de aminoácido da proteína tendo resíduos equivalentes putativos e a proteína de interesse estão dentro de 0,13 nm e preferivelmente 0,1 nm após alinhamento. Alinhamento é obtido após o melhor modelo ter sido orientado e posicionado para render a máxima sobreposição de coordenadas atômicas de átomos de proteína não-hidrogênio das proteínas analisadas. O modelo preferido é o modelo cristalográfico rendendo o mais baixo fator R para dados de difração experimental na mais alta resolução disponível, determinado usando processos conhecidos por aqueles versados na técnica de cristalografia e caracterização/análise de proteína.

[0070] O termo "elemento regulador" como aqui usado refere-se a um elemento genético que controla algum aspecto da expressão de seqüências de ácido nucléico. Por exemplo, um promotor é um elemento regulador que facilita a iniciação de transcrição de uma região codificante ligada operavelmente. Adicionais elementos reguladores incluem sinais de ligação, sinais de poliadenilação e sinais de término.

[0071] Como aqui usado, "células hospedeiras" são geralmente hospedeiros procarióticos ou eucarióticos que são transformados ou transfectados com vetores construídos usando técnicas de ADN recombinante conhecidas. Células hospedeiras transformadas são capazes de replicarem vetores codificando as variantes de proteínas ou expressarem a desejada variante de proteína. No caso de vetores que codificam a pré- ou pré-pró-forma da variante de proteína, tais variantes, quando expressas, são tipicamente secretadas a partir de célula hospedeira no meio de célula hospedeira.

[0072] O termo "introduzida" no contexto de inserção de uma seqüência de ácidos nucléicos em uma célula, significa transformação,



transdução ou transfecção. Meios de transformação incluem, mas não são limitados a, quaisquer processos apropriados conhecidos na técnica, como transformação de protoplasto, precipitação com cloreto de cálcio, eletroporação, ADN nu, e similares, como conhecidos na técnica. (Vide, Chang and Cohen, *Mol. Gen. Genet.*, 168:111-115 [1979]; Smith et al., *Appl. Env. Microbiol.*, 51:634 [1986]; e o artigo revisão por Ferrari et al., em Harwood, *Bacillus*, Plenum Publishing Corporation, pp. 57-72 [1989]).

[0073] O termo "promotor / aperfeiçoador" representa um segmento de ADN que contem seqüências capazes de proverem ambas funções de promotor e aperfeiçoador. O aperfeiçoador / promotor pode ser "endógeno" ou "exógeno" ou "heterólogo". Um aperfeiçoador / promotor endógeno é um que é naturalmente ligado com um dado gene no genoma. Um aperfeiçoador / promotor exógeno (heterólogo) é um que é colocado em justaposição a um gene por meio de manipulação genética (isto é, técnicas de biologia molecular).

[0074] A presença de "sinais de união" sobre um vetor de expressão frequentemente resulta em maiores níveis de expressão do transcrito recombinante. Sinais de união mediam a remoção de introns do transcrito de ARN primário e consistem em um doador de união e um sítio receptor (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York [1989], pp. 16.7-16.8).

[0075] O termo "transfecção estável" ou "estavelmente transfectado" refere-se à introdução e integração de ADN estranho no genoma da célula transfectada. O termo "transfectante estável" refere-se a uma célula que integrou estavelmente ADN estranho ou exógeno no ADN genômico da célula transfectada.

[0076] Os termos "marcador selecionável" ou "produto gene selecionável" como aqui usados referem-se ao uso de um gene que

codifica uma atividade enzimática que confere resistência a um antibiótico ou droga para uma célula na qual o marcador selecionável é expresso.

[0077] Como aqui usado, o termo "amplificação" e "amplificação de gene" refere-se a um processo através do qual específicas seqüências de ADN são desproporcionalmente replicadas de modo que o gene amplificado torna-se presente em um maior número de cópias do que estava inicialmente presente no genoma. Em algumas concretizações, seleção de células através de crescimento na presença de uma droga (por exemplo, um inibidor de uma enzima que pode ser inibida) resulta na amplificação de tanto o gene endógeno codificando o produto gene requerido para crescimento na presença de droga como através de amplificação de seqüências exógenas (isto é, entrada) codificando este produto gene, ou ambas. Seleção de células através de crescimento na presença de uma droga (por exemplo, um inibidor de uma enzima que pode ser inibida) pode resultar na amplificação de tanto o gene endógeno codificando o produto gene requerido para crescimento na presença da droga ou através de amplificação de seqüências exógenas (isto é, entrada) codificando este produto gene, ou ambas.

[0078] "Amplificação" é um caso especial de replicação de ácido nucléico envolvendo especificidade de molde. É para ser contrastada com replicação de molde não-específica (isto é, replicação que é dependente de molde mas não dependente de um específico molde). Especificidade de molde é aqui distinguida de fidelidade de replicação (isto é, síntese da própria seqüência de polinucleotídeos) e especificidade de nucleotídeo (ribo- ou desoxirribo-). Especificidade de molde é frequentemente descrita em termos de especificidade de "alvo". Seqüências alvos são "alvos" no sentido de que elas são buscadas serem classificadas fora de outro ácido nucléico. Técnicas

de amplificação foram projetadas primariamente para esta classificação.

[0079] Como aqui usado, o termo "coamplificação" refere-se à introdução em uma célula simples de um marcador amplificável em conjunção com outras seqüências de genes (isto é, compreendendo um ou mais genes não-selecionáveis tais como aqueles contidos em um vetor de expressão) e a aplicação de apropriada pressão seletiva de modo que a célula amplifique ambos, o marcador amplificável e as outras seqüências de gene não-selecionável. O marcador amplificável pode estar fisicamente ligado às outras seqüências gene ou alternativamente duas peças separadas de ADN, uma contendo o marcador amplificável e a outra contendo o marcador não-selecionável, podem ser introduzidas na mesma célula.

[0080] Como aqui usados, os termos "marcador amplificável", "gene amplificável", e "vetor de amplificação" referem-se a um marcador, gene ou um vetor codificando um gene que permite a amplificação deste gene sob apropriadas condições de crescimento.

[0081] Como aqui usado, o termo "ácido nucléico amplificável" refere-se a ácidos nucléicos que podem ser amplificados através de qualquer processo de amplificação. É contemplado que "ácido nucléico amplificável" usualmente compreenderá "molde amostra".

[0082] Como aqui usado, o termo "molde amostra" refere-se a ácido nucléico originando-se de uma amostra que é analisada para a presença de "alvo" (definido abaixo). Em contraste, "molde de fundo" é usado em referência a ácido nucléico outro que não molde amostra que pode ou não estar presente em uma amostra. Molde de fundo é mais frequentemente negligente. Ele pode ser o resultado de sobras de estoque anterior, ou pode ser devido à presença de contaminantes de ácidos nucléicos buscados serem purificados fora da amostra. Por exemplo, ácidos nucléicos de organismos outros que não aqueles a

serem detectados podem estar presentes como fundo em uma amostra teste.

[0083] "Especificidade de molde" é obtida na maioria de técnicas de amplificação através de escolha de enzima. Enzimas de amplificação são enzimas que, sob condições em que elas são usadas, processarão somente seqüências específicas de ácido nucléico em uma mistura heterogênea de ácidos nucléicos. Por exemplo, no caso de Q $\beta$  replicase, ARN MDV-1 é o molde específico para a replicase (vide, por exemplo, Kacian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:3038 [1972]). Outros ácidos nucléicos não são replicados por esta enzima de amplificação. Similarmente, no caso de T7 RNA polimerase, esta enzima de amplificação tem uma especificidade rigorosa para seus próprios promotores (vide, Chamberlin et al., Nature 228:227 [1970]). No caso de T4 DNA ligase, a enzima não ligará os dois oligonucleotídeos ou polinucleotídeos, onde existe um desemparelhamento entre o substrato oligonucleotídeo ou polinucleotídeo e o molde na junção de ligação (vide, Wu and Wallace, Genomics 4:560 [1989]). Finalmente, Taq e Pfu polimerases, em virtude de sua habilidade para funcionar em alta temperatura, são verificadas mostrarem alta especificidade para as seqüências ligadas e assim definidas pelos iniciadores; a alta temperatura resulta em condições termodinâmicas que favorecem hibridização de iniciador com as seqüências alvos e não hibridização com seqüências não-alvos.

[0084] Como aqui usado, o termo "iniciador" refere-se a um oligonucleotídeo, se ocorrendo naturalmente como em uma digestão de restrição purificada ou produzido sinteticamente, que é capaz de atuar como um ponto de iniciação de síntese quando colocado sob condições nas quais síntese de um produto de extensão de iniciador que é complementar a uma fita de ácido nucléico é induzida (isto é, na

presença de nucleotídeos e um agente de indução tal como ADN polimerase e em uma temperatura e pH apropriados). O iniciador é preferivelmente de fita simples para máxima eficiência em amplificação, mas alternativamente pode ser de fita dupla. Se de fita dupla, o iniciador é primeiro tratado para separação de suas fitas antes de ser usado para preparação de produtos de extensão. Preferivelmente, o iniciador é um oligodesoxirribonucleotídeo. O iniciador tem de ser suficientemente longo para iniciar a síntese de produtos de extensão na presença do agente de indução. Os exatos comprimentos dos iniciadores dependem de muitos fatores, incluindo temperatura, fonte de iniciador e o uso do processo.

[0085] Como aqui usado, o termo "sonda" refere-se a um oligonucleotídeo (isto é, uma sequência de nucleotídeos), se ocorrendo naturalmente como em uma digestão de restrição purificada ou produzida sinteticamente, recombinantemente ou através de amplificação de PCR, que é capaz de hibridização a um outro oligonucleotídeo de interesse. Uma sonda pode ser de fita simples ou fita dupla. Sondas são úteis na detecção, identificação e isolamento de particulares seqüências de gene. É contemplado que qualquer sonda usada na presente invenção será rotulada com qualquer "molécula repórter", de modo que seja detectável em qualquer sistema de detecção, incluindo, mas não limitado a enzima (por exemplo, ELISA, assim como ensaios histoquímicos baseados em enzima), sistemas fluorescentes, radioativos e luminescentes. Não é pretendido que a presente invenção seja limitada a qualquer particular sistema de detecção ou rótulo.

[0086] Como aqui usado, o termo "alvo", quando usado em referência a processos de amplificação (por exemplo, a reação de cadeia polimerase), refere-se à região de ácido nucléico ligada pelos iniciadores usados para reação de cadeia polimerase. Assim, o "alvo"

é buscado ser classificado a partir de outras seqüências de ácidos nucléicos. Um "segmento" é definido como uma região de ácido nucléico dentro de sequência-alvo.

[0087] Como aqui usado, o termo "reação de cadeia polimerase" ("PCR") refere-se aos processos de patentes US 4 683 195, 4 683 202 e 4 965 188, aqui incorporadas por referência, que incluem processos para aumento de concentração de um segmento de uma sequência-alvo em uma mistura de ADN genômico sem clonagem ou purificação. Este processo para amplificação de sequência-alvo consiste na introdução de um grande excesso de dois iniciadores oligonucleotídeos para a mistura de ADN contendo a desejada sequência-alvo, seguida por uma precisa sequência de ciclicização térmica na presença de uma ADN polimerase. Os dois iniciadores são complementares para suas respectivas fitas da sequência-alvo de fita dupla. Para efetuar amplificação, a mistura é desnaturada e os iniciadores então anelados a suas seqüências complementares dentro da molécula alvo. Seguindo anelamento, os iniciadores são estendidos com uma polimerase de modo a formarem um novo par de fitas complementares. As etapas de desnaturação, anelamento de iniciador e extensão de polimerase podem ser repetidas muitas vezes (isto é, desnaturação, anelamento e extensão constituem um "ciclo"; podem existir numerosos "ciclos") para obter uma alta concentração de um segmento amplificado da desejada sequência-alvo. O comprimento do segmento amplificado da desejada sequência-alvo é determinado pelas relativas posições dos iniciadores com relação uns aos outros, e por isso, este comprimento é um parâmetro controlável. Em virtude do aspecto de repetição do processo, o método é referido como a "reação de cadeia polimerase" (daqui por diante "PCR"). Devido os desejados segmentos amplificados da sequência-alvo tornarem-se as seqüências predominantes (em termos de concentração) na mistura, eles são ditos

serem "amplificados por PCR".

[0088] Como aqui usado, o termo "reagentes de amplificação" refere-se àqueles reagentes (desoxirribonucleotídeos trifosfatos, tampão, etc.), necessários para amplificação exceto para iniciadores, molde ácido nucléico e a enzima de amplificação. Tipicamente, reagentes de amplificação juntos com outros componentes de reação são colocados e contidos em um vaso de reação (tubo de ensaio, micro-cavidade, etc.).

[0089] Com PCR, é possível amplificar uma cópia simples de uma específica sequência-alvo em ADN genômico para um nível detectável através de várias diferentes metodologias (por exemplo, hibridização com uma sonda rotulada; incorporação de iniciadores biotinilados seguida por detecção de conjugado de avidina – enzima; incorporação de trifosfatos de desoxinucleotídeos marcados com  $^{32}\text{P}$ , tais como dCTP ou dATP, no segmento amplificado). Em adição a ADN genômico, qualquer sequência de oligonucleotídeo ou polinucleotídeo pode ser amplificada com o apropriado conjunto de moléculas iniciadoras. Em particular, os segmentos amplificados criados pelo próprio processo de PCR são, eles próprios, moldes eficientes para subseqüentes amplificações PCR.

[0090] Como aqui usados, os termos "produto de PCR", "fragmento de PCR", e "produto de amplificação" referem-se à resultante mistura de compostos após dois ou mais ciclos das etapas de PCR de desnaturação, anelamento e extensão serem completas. Estes termos abrangem o caso onde houve amplificação de um ou mais segmentos de uma ou mais seqüências alvos.

[0091] Como aqui usados, os termos "endonucleases de restrição" e "enzimas de restrição" referem-se a enzimas bacteriais, cada uma das quais corta ADN de fita dupla na ou próximo de uma específica sequência de nucleotídeos.

[0092] Como aqui usado, "propriedade de superfície" é usada em referência a uma carga eletrostática, assim como propriedades tais como hidrofobicidade e/ou hidrofiliabilidade exibida pela superfície de uma proteína.

[0093] Como aqui usados, os termos "composição detergente" e "formulação detergente" são usados em referência a misturas que são pretendidas para uso em um meio de lavagem para a limpeza de objetos sujos. Em concretizações preferidas, o termo é usado em referência a detergentes usados para limpar pratos, cutelaria, etc. (por exemplo, "detergentes de lavagem de pratos"). Não é pretendido que a presente invenção seja limitada a qualquer particular formulação ou composição detergente. Realmente, é pretendido que em adição a detergentes que contêm pelo menos uma protease da invenção, o termo relacione detergentes que contêm tensoativos, transferase(s), enzimas hidrolíticas, óxido redutases, builders, agentes alvejantes, ativadores alvejantes, agentes azulantes e corantes fluorescentes, inibidores de formação de torta, agentes de mascaramento, ativadores de enzima, antioxidantes, e solubilizantes.

[0094] Como aqui usado, "composição de lavagem de pratos" refere-se a todas as formas de composições para limpeza de louças, incluindo cutelaria, incluindo mas não limitado a formas granulares e líquidas. Não é pretendido que a presente invenção seja limitada a qualquer particular tipo ou composição de lavagem de pratos. Realmente, a presente invenção encontra uso em limpeza de louça (por exemplo, pratos, incluindo, mas não limitado a bandejas, copos, taças, tigelas, etc) e cutelaria (por exemplo, utensílios, incluindo mas não limitado a colheres, facas, garfos, utensílios de refeição, etc.) de qualquer material, incluindo mas não limitado a cerâmicas, plásticos, metais, china, vidro, acrílicos, etc. O termo "louça" é aqui usado com referência a ambos, pratos e cutelaria.



[0095] Como aqui usado, "desempenho de lavagem" de protease mutante refere-se à contribuição de uma enzima protease mutante para lavagem de pratos que provê adicional desempenho de limpeza ao detergente sem a adição da protease mutante à composição. Desempenho de lavagem é comparada sob relevantes condições de lavagem.

[0096] O termo "relevantes condições de lavagem" é aqui usado para indicar as condições, particularmente temperatura de lavagem, tempo, mecânicas de lavagem, concentração de espuma, tipo de detergente e dureza de água, realmente usados em lares em um segmento de mercado de detergente de prato.

[0097] O termo "desempenho aperfeiçoado de lavagem" é usado para indicar que um melhor resultado final é obtido em remoção de mancha de louça e/ou cutelaria sob relevantes condições de lavagem, ou que menos protease mutante, em uma base em peso, é necessária para obter o mesmo resultado final em relação à correspondente enzima tipo selvagem.

[0098] O termo "desempenho de lavagem retida" é usado para indicar que o desempenho de lavagem de uma enzima protease mutante, em uma base em peso, é pelo menos 80% em relação à correspondente enzima protease tipo selvagem sob relevantes condições de lavagem.

[0099] Desempenho de lavagem de proteases é convenientemente medido através de sua habilidade para remover certas manchas representativas sob apropriadas condições de testes. Nestes sistemas de teste, outros fatores relevantes, tais como composição detergente, concentração de espuma, dureza de água, mecânicas de lavagem, tempo, pH, e/ou temperatura, podem ser controlados de modo que condições típicas para aplicação doméstica em um certo segmento de mercado sejam imitadas. O sistema de

teste de aplicação de laboratório aqui descrito é representativo para aplicação doméstica quando usado sobre enzimas proteolíticas modificadas através de mutagênese de ADN. Assim, os processos aqui providos facilitam o teste de grandes quantidades de diferentes enzimas e a seleção daquelas enzimas que são particularmente apropriadas para um específico tipo de aplicação detergente. Desta maneira, enzimas "fabricadas talhadas" para específicas condições de aplicação são facilmente selecionadas.

[00100] Como aqui usado, o termo "desinfetante" refere-se à remoção de contaminantes a partir de superfícies, assim como a inibição ou morte de micróbios sobre as superfícies de itens. Não é pretendido que a presente invenção seja limitada a qualquer superfície particular, item, ou contaminante(s) ou micróbios a serem removidos.

[00101] Algumas serina proteases bacterianas são referidas como "subtilisinas". Subtilisinas compreendem as serina proteases de *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* ("subtilisina BPN"), e *Bacillus licheniformis* ("subtilisina Carlsberg") (Vide, por exemplo, Markalnd and Smith, em Boyer (ed.), *Enzymes, The* (Boyer, ed.) vol. 3, pp. 561-608, Academic Press, New York, [1971]). Cepas de *Bacillus* como cepas *Bacillus* alcalofílicas produzem outras proteases. Exemplos da última categoria incluem serinas proteases tais como MAXACAL protease (também aqui referida como "PB92 protease", isolada de *Bacillus* nov. spec. PB92), SAVINASE<sup>®</sup> protease. Adicional protease, inclui mas não é limitada a PROPERASE<sup>®</sup> protease.

[00102] As seqüências de aminoácidos (SEQ ID NO:2) e ADN (SEQ ID NO: 1) da protease PB92 são mostradas na figura 2. A protease madura consiste em 269 aminoácidos, com um peso molecular de cerca de 27 000 Dáltons, e um ponto isoelétrico na faixa altamente alcalina. A atividade de PB92 protease sobre substrato proteína é expressa em Unidades Delft Alcalina (ADU). A atividade em ADU é

determinada de acordo com o processo descrito no relatório descritivo de patente Britânica N<sup>o</sup> 1 353 317 exceto que o pH foi alterado de 8,5 para 10,0. PB92 protease purificada tem uma atividade de 21 000 ADU por mg. O número de quantidade metabolizada (\*cat) medido sobre caseína é  $90 \text{ s}^{-1}\text{mol}^{-1}$ .

[00103] A atividade específica de preparações purificadas de subtilisina Carlsberg (Vide, Delange and Smith, J. Biol. Chem., 243:2184 [1968]), totaliza 10 000 ADU/mg e de subtilisina BPN' (Matsubara et al., J. Biol. Chem., 240:1125 [1965]) a 7000 ADU/mg. Além dos parâmetros mencionados acima tais como atividade específica e número de quantidade metabolizada <sub>(kcat)</sub> PB92 se distingue de proteases como subtilisina Carlsberg, subtilisan BPN' e outras proteases formuladas em detergentes (por exemplo, MAXATASE<sup>®</sup> e ALCALASE) tendo uma carga positiva alta, que pode ser visualizada por eletroforse em gel da proteína nativa.

[00104] Uma vez que a PB92 protease é ativa em remoção de mancha em valores de pH alcalinos, ela é comumente usada como um aditivo detergente, junto com ingredientes detergentes tais como tensoativos, builders e agentes oxidantes. Os últimos agentes são principalmente usados em forma pulverizada. PB92 protease tem uma alta eficiência de remoção de mancha comparada a outras proteases, tais como as subtilisinas mencionadas anteriormente. Isto significa que menos PB92 protease é necessária para obter o mesmo desempenho de lavagem. Sensitividade a oxidação é uma importante desvantagem da PB92 protease e todas as outras serina proteases usadas para aplicação em detergentes (vide, por exemplo, Stauffer et al., J. Biol. Chem., 244:5333-5338 [1969]; e Estell et al., J. Biol. Chem., 263:6518-6521 [1985]). Oxidação de PB92 protease por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou perácidos gerados pelo sistema ativador, contendo perborato-tetraidrato e TAED, cria uma enzima com uma específica atividade de 50% e 10%,

respectivamente, sobre ADU/mg, comparada a PB92 protease não-oxidada.

[00105] A presente invenção provê processos e composições para a produção, separação e seleção de enzimas proteolíticas mutantes derivadas de serina proteases bacterianas produzidas naturalmente. Tais mutantes são, por exemplo, aqueles codificados por um gene derivado de um gene tipo selvagem de uma cepa *Bacillus alcalofílica*. Em concretizações mais preferidas, a cepa é PB92.

[00106] Entretanto, mutantes derivados da serina protease de *Bacillus alcalofílica* SAVINASE<sup>®</sup> são apropriados. A presente invenção também encontra uso na seleção de proteases modificadas derivadas de proteases outras que não as serina proteases de cepas de *Bacillus alcalofílicas* PB92. Por exemplo, os genes codificando as serina proteases de *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, e *Bacillus licheniformis* são conhecidas e podem ser usadas como alvos para mutagênese. Entretanto, não é pretendido que a presente invenção seja limitada a quaisquer processos particulares, quando qualquer processo de mutagênese apropriado encontra uso na presente invenção, incluindo mas não limitado a mutagênese direcionada a sítio auxiliada por oligonucleotídeo, ou mutagênese randômica direciona a sítio.

[00107] Em algumas concretizações preferidas, os processos para seleção de enzimas proteolíticas mutantes providos pela presente invenção, incluindo produção e seleção, compreendem as seguintes etapas: mutagênese de um gene clonado codificando uma enzima proteolítica de interesse ou um seu fragmento; isolamento de gene ou genes protease mutante obtido; introdução do dito gene ou genes de protease mutantes, preferivelmente sobre um apropriado vetor, em uma apropriada cepa hospedeira para expressão e produção; recuperação de protease mutante produzida; e identificação daquelas

proteases mutantes tendo aperfeiçoadas propriedades para aplicação em detergentes.

[00108] Apropriadas cepas hospedeiras para produção de proteases mutantes incluem microorganismos transformáveis nos quais expressão da protease pode ser obtida. Especificamente cepas hospedeiras das mesmas espécies ou gêneros das quais a protease é derivada, são apropriadas, tais como uma cepa *Bacillus*, preferivelmente uma cepa *Bacillus* alcalofílica e mais preferivelmente *Bacillus* nov. spec. PB92 ou seu mutante, tendo substancialmente as mesmas propriedades. Também, cepas *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. amyloliquefaciens* estão entre as cepas preferidas. Outras apropriadas e preferidas cepas hospedeiras incluem aquelas cepas que são substancialmente incapazes de produzirem enzimas proteolíticas extracelulares antes da transformação com um gene mutante. De particular interesse são cepas hospedeiras *Bacillus* deficientes de protease, tal como um derivado deficiente de protease de *Bacillus* nov. spec. PB92. Expressão das proteases é obtida usando sinais de expressão que funcionam no organismo hospedeiro selecionado. Sinais de expressão incluem seqüências de ADN regulando transcrição e tradução dos genes protease. Vetores próprios são capazes de replicação em números de cópias suficientemente altos na cepa hospedeira de escolha ou permitirem estável manutenção do gene protease na cepa hospedeira através de integração cromossômica.

[00109] As enzimas proteolíticas mutantes de acordo com a invenção são preparadas através de cultura, sob apropriadas condições de fermentação, de uma cepa hospedeira transformada compreendendo o desejado gene ou genes proteolíticos mutantes, e recuperando as enzimas produzidas.

[00110] Preferivelmente, as proteases sendo expressas são

selecionadas no meio de cultura, o que facilita sua recuperação, ou no caso de cepa hospedeiras bacterianas gram negativas no espaço periplásmico. Para secreção uma apropriada sequência sinal terminal amino é empregada, preferivelmente a sequência sinal codificada pelo gene original se este é funcional na cepa hospedeira de escolha.

[00111] Em algumas concretizações, as propriedades das proteases detergentes ocorrendo naturalmente ou de mutação natural são aperfeiçoadas através de introdução de uma variedade de mutações na enzima. Para a maior parte, as mutações são substituições, tanto conservativas como não-conservativas, embora supressões e inserções também encontrem uso em algumas concretizações.

[00112] Para substituições conservativas a seguinte tabela encontra uso:

Alifático

Neutro

Não-polar (G,A,P,L I, V)

Polar (C, M, S, T, N, Q)

Carregado

Aniônico (D, E)

Catiônico (K, R)

Aromático(F, H, W, Y)

onde qualquer aminoácido pode estar substituído com outro amino ácido na mesma categoria, particularmente na mesma linhagem. Em adição, os aminoácidos polares N, Q podem substituir ou serem substituídos pelos aminoácidos carregados. Para os propósitos da presente invenção, substituições resultando em aumentado caráter aniônico da protease, particularmente em sítios não diretamente envolvidos com o sítio ativo são de particular interesse.

[00113] Regiões de particular interesse para mutação são aqueles aminoácidos dentro de uma distância de 4 angstroms a partir da molécula inibidora Eglin C, quando Eglin C está ligada ao sítio ativo.

[00114] A seguinte numeração é baseada em PB92 protease, mas as considerações são relevantes para outras serinas proteases tendo uma estrutura substancialmente homóloga, particularmente aquelas tendo mais que cerca de 70% de homologia, mais particularmente tendo mais que cerca de 90% de homologia. Posições de particular interesse incluem 32, 33, 48-54, 58-62, 94-107, 116, 123-133, 150, 152-156, 158-161, 164, 169, 175-186, 197, 198, 203-216 (numeração PB92), quando maior parte destas posições são disponíveis para direta interação com um substrato protéico. Usualmente, os aminoácidos em posições 32, 62, 153 e 215 não são substituídos, uma vez que mutações nestes sítios tendem a degradar desempenho de lavagem. Em algumas concretizações particularmente preferidas, mutações são feitas em posições 116, 126, 127, e 128 (numeração PB92). Em concretizações alternativas, uma adicional mutação é feita na posição 160.

[00115] Ainda em concretizações, posições para substituição de particular interesse incluem 60, 94, 97-102, 105, 116, 123-128, 150, 152, 160, 183, 203, 211, 212, 213, 214 e 216 (numeração PB92). Em algumas posições, a substituição altera um aminoácido instável (por exemplo, metionina) para um amino ácido mais estável oxidantemente (por exemplo, treonina), enquanto mantendo a conformação genérica e volume do aminoácido naquele sítio. Em algumas outras concretizações, substituição de aminoácido natural com quase qualquer outro aminoácido, resultados aperfeiçoados são obtidos, particularmente em substituições nas quais os aminoácidos hidroxilados E e/ou T, são substituídos com um aminoácido polar ou não-polar, ou mesmo um aminoácido aromático.

[00116] Em algumas concretizações mais preferidas, substituições incluem (numeração PB92):

G116I, V, L

S126 qualquer aminoácido P127 qualquer aminoácido

S128 qualquer aminoácido

S160 aniônico ou neutro alifático ou R

A166 carregado, particularmente aniônico

M169 neutro alifático, preferivelmente não-polar

N212 aniônico

M216 alifático polar, particularmente S, T, N, Q

[00117] Surpreendentemente, embora muitas das mutações tenham resultado em menor atividade específica da protease com substratos comuns, desempenho de lavagem foi comparável a ou aperfeiçoada em relação à enzima natural e em muitos casos estabilidade de estocagem foi aperfeiçoada. Em adição, o desempenho de lavagem de algumas das proteases mutantes PB92 como comparadas à protease PB92 nativa foi verificada ser de cerca de 120 a cerca de 180 por cento. Assim, a presente invenção provê proteases variantes com desempenho muito aperfeiçoada, comparadas à protease nativa.

[00118] Em algumas concretizações, várias mutações são combinadas, de modo a aumentar a estabilidade de uma protease em composições detergentes. Várias mutações que influenciam positivamente a lavagem da mesma protease podem ser combinadas em um único gene protease mutante permitindo produção de proteases possivelmente ainda mesmo aperfeiçoadas (por exemplo, S126M, P127A, S128G, S160D, e G116V, S126N, P127S, S128A,S160D; numeração PB92). Adicionais mutantes protease são providos através de combinação de boas propriedades de desempenho de lavagem de, por exemplo, G116V e S160D com as propriedades de estabilidade de outras mutações (numeração PB92).



[00119] Mutantes úteis também são providos por combinação de quaisquer das mutações ou conjuntos de mutações aqui descritos. Em adicionais concretizações, mutações úteis especificamente providas são combinadas com mutações em outros sítios. Em algumas concretizações, estas combinações resultam em substanciais mudanças nas propriedades das enzimas, enquanto em outras concretizações, as alterações são menos substanciais.

[00120] A invenção também compreende o uso de uma ou mais enzimas proteolíticas mutantes, como aqui definidas, em composição(ões) detergente e/ou processo(s) de lavagem. Finalmente, será claro que supressões ou inserções dos aminoácidos na cadeia de polipeptídeo protease, tanto criado artificialmente por mutagênese como ocorrendo naturalmente em proteases homólogas a protease PB92, a numeração dos aminoácidos pode mudar. Entretanto, é para ser entendido que posições homólogas a posições de aminoácidos de PB92 protease cairão sob o escopo das reivindicações.

#### Experimental

[00121] Os seguintes exemplos são providos de modo a demonstrarem e ainda ilustrarem certas concretizações preferidas e aspectos da presente invenção e não são para serem construídos como limitantes de seu escopo.

[00122] Na exposição experimental que segue, são aplicadas as seguintes abreviaturas: °C (graus Celsius); rpm (rotações por minuto); H<sub>2</sub>O (água); HCl (ácido clorídrico); aa (aminoácido); bp (par de bases); kb (par de kilobase); kD (quiloDalton); gm (gramas); µg e ug (micrograma); mg (miligrama); ng (nanograma); µL e uL (microlitro); mL (mililitro); mm (milímetro); nm (nanômetro); µm e um (micrometro); M (molar); mM (milimolar); µM e uM (micromolar); U (unidade); V (volt); MW (peso molecular); sec (segundo); min (minuto); hr (hora); MgCl<sub>2</sub>

(cloreto de magnésio); NaCl (cloreto de sódio); OD<sub>280</sub> (densidade ótica em 280 nM); OD<sub>600</sub> (densidade ótica em 600 nM); PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida); EtOH (etanol); PBS (solução salina tamponada com fosfato [NaCl 150 mM, tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,2]); SDS (dodecil sulfato de sódio); Tris ((tris(hidroximetil) amino metano); TAED (N,N,N',N'-tetraacetil etileno diamina); w/v (peso por volume); v/v (volume por volume); MS (espectroscopia de massa); TIGR (The Institute for Genomic Research, Rockville, MD); AATCC (American Association of Textile and Coloring Chemists); SR (soil or stain removal); (wfk Testgewebe GmbH, Bruggen-Bracht, Germany); Amersham (American Life Science, Inc. Arlington Heights, IL); ICN (ICN Pharmaceuticals, Inc.; Costa Meas, CA); Pierce (Pierce Biotechnology, Rockford, IL); Amicon (Amicon, Inc., Beverly, MA); ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA); Amersham (Amersham Biosciences, Inc., Picataway, NJ); Becton Dickinson (Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ); BioRad, Richmond, CA); Clontech (CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA); Difco Laboratories, Detroit, MI); GIBCO BRL or Gibco BRL (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD); Novagen (Novagen, Inc., Madison, WI); Qiagen, Inc., Valencia, CA); Invitrogen (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA); Finnzymes (Finnzymes Ou, Espoo, Finland); Espoo, Finland); Macherey-Nagel (Macherey-Nagel, Easton, PA); Merieux (Institut Merieux, Codex, FR); Kelco, Atlanta, GA); Genaissance (Genaissance Pharmaceuticals, Inc., New Haven, CT); DNA 2.0 (DNA 2.0, Menlo Park, CA); MIDI (MIDI Labs, Newark, DE) InvivoGen (InvivoGen, SanDiego, CA); Sigma Chemical Co., St Louis, MO) Sorvall Instruments, a subsidiary of DuPont Co., Biotechnology Systems, Wilmington, DE); Stratagene (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA); Roche (Hoffmann La Roche, Inc., Nutley, NJ); Agilent (Agilent Technologies, Palo Alto, CA); Minolta (Konica Minolta,

Ramsey, NJ); Zeiss (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY); Henkel (Henkel, GmbH, Düsseldorf, Germany); Cognis (Cognis Corp, USA, Cincinnati, OH); Finnzymes Ou, Espoo, Finland); Reckitt Benckiser, Berks, United Kingdom); BASF (BASF Corp., Florham Park, NJ); IKW (Industrieverband Körperpflege und Waschmittel, Frankfurt, Germany); and WFK (Testgewebe GmbH, Brüggen-Bracht, Germany).

[00123] A água sintética com 3,00 mmols de Ca+Mg (16,8<sup>o</sup>d) usada em alguns experimentos de lavagem de pratos foi preparada como se segue. Primeiro, três soluções estoques foram preparadas. Solução 1 foi 800 mmols/L NaHCO<sub>3</sub> (67,2 g/L); solução 2 foi 154,2 mmols/L MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub><sup>o</sup> (38,0 g/L); e solução 3 foi 446,1 mmols/L CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub><sup>o</sup> (65,6 g/L). Após as soluções serem preparadas, 50 mL de cada uma das soluções estoques 1, 2 e 3 foram colocados em um vaso com 7 L de água desmineralizada e então o vaso enchido com adicional água desmineralizada até 10 L. Antes de uso, o valor de pH da água sintética foi ajustado para 7,5 com HCl ou NaOH.

[00124] A seguinte tabela (Tabela 1) provê os mutantes produzidos e testados durante o desenvolvimento da presente invenção. Nesta tabela, numeração de BPN' e PB92 são ambas providas por conveniência.

Tabela 1

Tabela 1 - Mutantes PB92		
Designação de Cepa	Numeração BPN'	Numeração PB92
049*	G118V, S128L, P129Q, S130A	G116V, S126L, P127Q, S128A
045*	G118V, S128N, P129S, S130A	G116V, S126N, P127S, S128A, S160D
046*	G118V, S128L, P129Q, S130A, S166D	G116V, S126L, P127Q, S128A, S160D
047/048*	G118V, S128V, P129E, S130K	G116V, S126V, P127E, S128K
050*	G118V, S128V, P129M, S166D	G116V, S126V, P127M, S160D
051/052*	S130T	S128T

053	G118V, S128F, P129L, S130T	G116V, S126F, P127L, S128T
054	G118V, S128L, P129N, S130V	G116V, S126L, P127N, S128V
055/056	G118V, S128F, P129Q	G116V, S126V, P127E, S128K, S160D
057	G118V, S128V, P129E, S130K, S166D	G116V, S126R, P127E, S128K, S160D
058	G118V, S128R, P129S, S130P	G116V, S126R, P127S, S128P
059	S128R, P129Q, S130D	S126R, P127Q, S128D
060	S128C, P129R, S130G	S126C, P127R, S128D

[00125] Na Tabela 1, todas as cepas foram produzidas e caracterizadas usando-se os processos descritos nos Exemplos. Cepas indicadas com um asterisco (\*) foram preparadas como descrito em EP 0 571 049 B1 (vide, exemplo 1A-C). Todas as outras variantes foram preparadas como descrito no Exemplo 1D.

[00126] Na Tabela 1, todas as cepas foram produzidas e caracterizadas usando os processos descritos nos Exemplos. Cepas indicadas com um asterisco (\*) foram preparadas como descrito em EP 0 571 049 B1 (vide, Exemplo 1A-C). Todas as outras variantes foram preparadas como descrito no Exemplo 1D.

#### Exemplo 1

##### Construção de Mutantes de Protease PB92

[00127] Neste exemplo, processos usados para construir alguns dos mutantes PB92 aqui providos são descritos. A construção básica a partir da qual o trabalho de mutagênese foi iniciado, é referida como "pM58", que é descrita 0283075 e em EP 571049. A estratégia seguida compreendeu três fases:

A.Construção de vetor de mutagênese 13M1

B.Procedimento de mutação

C.Construção de pM58Eco e subclonagem do fragmento de ADN de mutação no vetor

[00128] Em adição, parte D ("Produção de variantes PB92") inclui uma descrição da construção de várias variantes PB92 que foram verificadas serem úteis na presente invenção.

##### A.Construção de vetor de mutagênese M13M1

[00129] A construção básica pM58 foi digerida com enzimas de restrição HpaI e Ball. O fragmento de 1400 bp contendo o gene protease PB92 foi purificado sobre agarose de baixo ponto de fusão como conhecido na técnica. O vetor M13MP11 (vide, Messing et al., Nucl. Acids Res., 9:303-321 [1981]) foi digerido com SmaI. O fragmento de ADN de 1400 pb de interesse foi ligado neste vetor e transfectado em *E.coli* JM101, usando processos conhecidos na técnica (vide, Cohen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110-2114 [1972]).

[00130] Após propagação de fago em *E. coli* JM101, ssDNA foi isolado usando processos conhecidos na técnica (vide, Heidecker et al., Gene 10:69-73 [1980], e a inserção e sua orientação foram verificadas usando sequenciamento de ADN Sanger (vide, Sanger, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:6463 [1977]). Um vetor apropriado para mutagênese foi obtido e nomeado "M13M1". O procedimento descrito acima é esquematicamente mostrado na figura 1A.

#### B.Procedimentos de Mutação

[00131] Mutagênese foi realizada sobre M13M1 usando ssDNA deste vetor e dsDNA de M13mp19 (Messing et al., Nucl. Acids Res., 9:303-321 [1988]), cujo último vetor foi digerido com as enzimas de restrição EcoRI e HindIII, seguido por purificação do fragmento grande sobre agarose de baixo ponto de fusão.

[00132] Mutagênese foi realizada como conhecido na técnica (vide, Kramer et al., Nucl. Acids Res., 12:9441-9456 [1984]) com uma modificação sendo que *E. coli* JM105, antes que *E. coli* WK30-3 foi usado para selecionar mutantes.

[00133] O comprimento dos oligonucleotídeos usados para criar as específicas mutações foi de 22 nucleotídeos. Mutação específica de região usada para criar várias mutações no tempo em uma específica sequência de ADN, foi realizada usando uma preparação de

oligonucleotídeo com um comprimento de 40 nucleotídeos com todos os quatro nucleotídeos randomicamente incorporados nos sítios correspondendo aos aminoácido(s) a sofrer mutação.

[00134] Após mutagênese, potenciais mutantes foram verificados para a relevante mutação através de análise de sequência usando o processo dideoxi de Sanger (vide, Sanger, *supra*). A inteira folga de fita simples (vide figura 1B) foi seqüenciada para confirmar a ausência de mutações secundárias. O procedimento é esquematicamente mostrado na figura 1B.

[00135] O procedimento descrito foi útil para geração de fragmentos de ADN com mutações na parte 3' do gene protease (aminoácidos 154-269).

[00136] Entretanto, não é pretendido que a presente invenção seja limitada a estes específicos processos, na medida em que qualquer processo apropriado conhecido na técnica encontrará uso. Realmente, aqueles versados na técnica reconhecerão que de modo a gerar fragmentos de ADN com mutações na parte 5' do gene protease em um vetor *Bacillus*, alternativas enzimas de restrição e genes protease PB92 modificados encontram uso em construção em processos que são análogos ao processo ilustrado na figura 1A.

#### C.Construção de pM58Eco e subclonagem de fragmentos de ADN contendo as mutações no vetor

[00137] Para construir pM58Eco, pM58 foi digerida com enzima de restrição *EcoRI* e ligada com T4 ligase sob condições diluídas, como conhecido na técnica. A mistura de ligação foi usada para transformar *B.subtilis* 1-A40 (Bacillus Genetic Stock Centre , Ohio) usando processos conhecidos na técnica (vide, Spizizen et al., J. Bacteriol., 81:741-746 [1961]).

[00138] Células da mistura de transformação foram revestidas sobre placas mínimas contendo 20 g/mL de neomicina como

conhecido na técnica (vide, Exemplo 1 de EP 0283075).

[00139] ADN plasmídeo de transformantes foi isolado usando processos conhecidos na técnica (vide, Birnboim and Doly, Nucl. Acids Res., 7:1513-1523 [1979]), e caracterizado usando análise de enzima de restrição. Assim, desta maneira, pM58Eco foi isolado (vide, figura 1c).

[00140] Para produzir enzima mutante, os fragmentos de ADN de M13M1 contendo as desejadas mutações geradas como descrito na parte B acima, foram subclonadas em pM58Eco. Então, ADN de fita dupla (dsDNA) de M13M1 (descrito acima) foi digerido com EcoRI e ligado no sítio EcoRI de pM58Eco. A mistura de ligação foi usada para transformar *B. subtilis* DB104 (vide, Doi, J. Bacteriol., 160:442-444 [1984]) usando processo conhecidos na técnica (vide, Spizizen et al., supra).

[00141] Células da mistura de transformação foram revestidas sobre placas mínimas contendo 20 g/mL de neomicina e 0,4% caseína como conhecido na técnica (vide, EP 0283075). ADN de transformantes produzindo protease foi isolado como conhecido na técnica (vide, Birnboim and Doly, supra) e caracterizado por análise de enzima de restrição.

#### D.Produção de Variantes PB982

[00142] Variantes PB92 designadas 0,53 até 060 foram preparadas por PCR de fusão como descrito conhecido na técnica (vide, por exemplo, pedido de patente US 10/541 737, aqui incorporado por referência em sua totalidade). A tabela que se segue provê as seqüências dos primers usados para PCR de fusão como aqui descrito.

Tabela 2

Tabela 2 - Iniciadores usados em PCR de fusão	
Sequência iniciadora	Nome de iniciador
TCCTAAACTCAAATTAGCAACGTGCATGACATTGTTCCCT (SEQ ID NO: 4)	118V-Rv
ATGCACGTTGCTAATTTGAGTTTAAGGATTCCTTACGCCAAGTGCCACA (SEQ ID N: 5)	128F-129L-130T-Fw
ATGCACGTTGCTAATTTGAGTTTAGCACTCAATGTGCCAAGTGCCACA (SEQ ID N: 6)	128L-129N-130V-Fw
ATGCACGTTGCTAATTTGAGTTTAGGATTCCAGTCGCCAAGTGCCACA (SEQ ID N: 7)	128F-129Q-Fw
ATGCACGTTGCTAATTTGAGTTTAGCACGCTCTCCGCCAAGTGCCACA (SEQ ID N: 8)	128R-129S-130P-Fw
ATGCACGTTGCTAATTTGAGTTTAGCACGCCAGGATCCAAGTGCCACA (SEQ ID N: 9)	128R-129Q-130D-Fw
ATGCACGTTGCTAATTTGAGTTTAGGATGCCGTGGGCCAAGTGCCACA (SEQ ID N: 10)	128C-129R-130G-Fw
TGCAGGCTCAATCGACTATCCGGCCCGT (SEQ ID N: 11)	S166D-Fw
ACGGGCCGCATAGTCGATTGAGCCTGCA (SEQ ID N: 12)	S166D-Rv
GCAATTCAGATCTTCCTTCAGGTTATGACC (SEQ ID N: 13)	pHPLT-BgIII-Fw
GCATCGAAGATCTGATTGCTTAAGTCTTC (SEQ ID N: 14)	pHPLT-BgIII-Rv
CCTAAACTCAAATTAGCAACGTGCATG (SEQ ID N: 15)	128-up-Rv

[00143] Phusion™ polimerase (Finnzymes) foi usada nestas reações de polimerase. Nestes experimentos, 2 µL de iniciador dianteiro e reverso 10 mM, 1 µL dNTP's 10 mM, 5 µL 10xHF tampão Phusion®, 1,5 µL DMSO e 1 µL de molde foram adicionados para um volume de 50 µL. O seguinte programa foi usado: 3 minutos de desnaturação a 95°C, anelamento por 1 minuto a 95°C, anelamento por 1 minuto a 65°C, e elongação por 1 minuto e 15 segundos a 72°C, por 30 ciclos, seguido por 7 minutos a 72°C. Seguindo término, os produtos de reação foram estocados em temperatura ambiente.

[00144] O mutante designado como "047/048" foi usado como



molde para desenvolvimento de mutantes 053 até 058. O iniciador BgIII-Fw foi combinado com 118V-Rv, e o segundo fragmento foi preparado através de combinação de iniciador BgIII-Rv com os iniciadores 128-130-Fw. No caso de 057, BgIII-Fw/S166D-Rv e BgIII-Rv/S166D-Fw foram combinados.

[00145] Em adição, mutante "051/052" foi usado como molde para criar mutantes 059 e 060. Iniciador 126-up-Rv foi combinado com BgIII-Fw, enquanto BgIII-Rv foi combinado com iniciadores 128-130Fw.

[00146] Fragmentos dos tamanhos esperados foram purificados de géis de agarose usando colunas de purificação de PCR de Macherey-Nagel. Os corretos fragmentos foram fundidos e amplificados com os iniciadores BgIII usando Phusion polimerase, e o seguinte programa: 3 minutos de tempo de desnaturação a 95°C, anelamento por 1 minuto a 65°C, e elongação por 2 minutos a 72°C por 25 ciclos, seguido por 7 minutos a 72°C. Seguindo término, os produtos de reação foram estocados em temperatura ambiente.

[00147] Fragmentos foram digeridos com BgIII, purificados a partir de géis de agarose e ligados por toda noite a 14°C com 1 µL de T4 DNA ligase, 8 µL 5x tampão de ligação T4 em um volume de 40 µL, usando processos conhecidos na técnica.

[00148] *B. subtilis* cepa altamente transformável BG3594 comK foi usado para obter transformantes positivos protease. Os vetores de expressão obtidos como descrito acima foram transformados com 10 µL do produto de ligação. Células de *Bacillus subtilis* competentes, BG3594 com K, foram transformadas com os plasmídeos de expressão, descritos no Exemplo 1. As bactérias foram feitas competentes através de indução do gene comK sob controle de promotor induzível axilose (vide, por exemplo, Hahn et al., Mol. Microbiol., 21:763-775 [1996]). Clones positivos protease foram selecionados, isolados, seqüenciados e transformados para *B. clausii*

PBT125 como descrito no exemplo 2.

### Exemplo 2

#### Mutantes expressos em *B. clausii*

[00149] Neste exemplo, processos usados para desenvolver proteases mutantes expressas em *B. clausii* PBT125 transformada usando os vetores de expressão descritos no exemplo 1 são providos. Esta cepa é um derivado negativo protease de PBT110, que foi obtida de cepa PB92 usando clássicos processos de aperfeiçoamento de cepa, seguidos por seleção para asporogenidade e aperfeiçoada produção de protease.

[00150] Procedimento de transformação de derivado negativo-protease PB92: PBT125

[00151] O processo de transformação de protoplasto induzido por polietileno glicol de Chang e Cohen conhecido na técnica (vide, por exemplo, Chang e Cohen, Mol. Gen. Genet., 168:111-115[1979]), com as seguintes modificações, foi usado para transformar *B. clausii* PBT125 com os vetores de expressão descritos no Exemplo 1. Primeiro, protoplastos foram preparados em meio de retenção alcalino contendo sucrose 0,5 M,  $MgCl_2$  0,02 M, e tampão Tris-maleato 0,02 M (pH 8,0) ao qual 0,4 mg de lisozima por mL foi adicionado. Então, os protoplastos foram peletizados e suspensos em 5 mL de meio de retenção alcalino ao qual 3,5% (peso/volume) de caldo Bacto – Penassay (Difco) e albumina 0,04% (Merieux) foram adicionados. Os protoplastos transformados foram regenerados sobre placas (5) DM3 modificadas contendo 8,0 g de goma GELRITE® gellam (Kelco), 0,3 g de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 4,06 g de  $MgCl_2 \cdot H_2O$ , 5,0 g de tampão ácido N-tris(hidroximetil) metil-2-amino etano sulfônico (Sigma), 5,0 g de ácidos casamino, 5 g de extrato de levedura, 1,5 mL de NaOH 4 M dissolvidos em 750 mL de  $H_2O$ , e misturado após esterilização com 250 mL de sacarose 2M e 10 mL de glicose 50% (peso/volume), 1 mL de

albumina (Merieux), 10 mg de tiamina, 5 mg de biotina, e 50 mg de neomicina. Placas foram colocadas em aproximadamente 70°C. Transformação de células *B. clausii* competentes foi realizada como conhecido na técnica (vide, por exemplo, Tanaka, "Construction of *Bacillus subtilis* Plasmid and Molecular Cloning in *Bacillus subtilis*", em D. Schlesinger (ed.), Microbiology, American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 15-18, [1982]).

#### Condições de fermentação e produção de protease

[00152] *B. clausii* PBT125 foi fermentado em fermentadores de 6 ou 3 litros em um meio contendo 22 g (baseado em matéria seca) de levedura por litro, 5 g de  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  por litro, 0,05 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  por litro, 0,05 g de  $CaCl_2$  por litro, 0,005 g de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  por litro, e 0,05 g de  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  por litro. Os componentes de meio foram dissolvidos em 90% do volume final e esterilizados em pH 7,0 em uma temperatura de 120°C por 1 hora. A cultura de inoculação foi obtida através de inoculação de *B. clausii* PBT125 em 100 mL de TSB; após esterilização, 4 mL de solução 1 M de carbonato de sódio foram adicionados a partir de um tubo inclinado. A cultura de inoculação foi incubada a 37°C por 24 horas sobre um aparelho de agitação. O meio foi inoculado a 37°C e um pH de 8,0 com 1 volume da cultura de inoculação por 100 volumes de meio. A fermentação principal foi realizada a 37°C em fermentadores agitados equipados com dispositivos para controlar pH, temperatura, e formação de espuma e um dispositivo para medição contínua da concentração de oxigênio dissolvido e a taxa de tomada de oxigênio. EM 17 horas após inoculação, uma solução de glicose 30% esterilizada a 120°C por 1 hora foi adicionada para uma concentração final de 30 g de glicose por litro de meio.

[00153] Os caldos foram girados por 30 minutos em 11800 xg. O sobrenadante foi filtrado através de um filtro de fibra de vidro Whatman

e um filtro de 0,8 um em um funil de Buchner, seguido por filtração usando almofadas de celulose. O resultante material foi estocado a 4°C, até usado. A seguir, o material foi concentrado usando uma unidade de filtração Pall UF, com um corte de filtro de 10 kDa. O resultante concentrado UF foi formulado pela adição de propileno glicol e formato de sódio. Ácido fórmico foi usado para levar o pH para 6,0.

### Exemplo 3

#### Técnicas analíticas para determinar a pureza de proteases purificadas

[00154] Neste exemplo, processos usados para determinar a pureza das proteases purificadas são descritas. Proteases foram consideradas puras quando uma banda simples ou pico foi verificada por eletroforese e eletroforese em gel de alto desempenho (HPLC), respectivamente.

[00155] Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) foi conduzida como conhecido na técnica (vide, Laemmli, Nature, 227:680-685 [1970]). Entretanto, antes de desnaturação das amostras de proteína por SDS a 100°C, inativação da atividade protease foi requerida, de modo a prevenir auto-degradação. Isto foi realizado por incubação com fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF) (1 mM, 30 minutos, temperatura ambiente) ou precipitação com ácido tricloro acético (TCA, 8%, sobre gelo). PAGE nativa foi realizada em pH 7,45 (tampão de gel consistindo em histidina 20 mM (His) e ácido 3-[N-morfolino] propano sulfônico (MOPS) 50 mM em géis de poliacrilamida 5% (razão de acrilamida : biacrilamida 20:1). Amostras de proteína foram carregadas na parte de cima de géis em chapas e sofreram eletroforese na direção de catodo. O mesmo tampão 5 His/MOPS foi usado como tampão de eletroforese (tanque), mas em pH 6,3. Após eletroforese (1-2 horas em 350 V), o gel foi encharcado em ácido acético 8% para fixar as proteínas no gel e subsequentemente manchado com Coomassie Brilliant Blue R250 e

retirada mancha como conhecido na técnica.

[00156] A pureza verificada por HPLC fez uso de uma coluna de troca de cátions (MonoS; Pharmacia) e uma coluna de filtração com gel (TSK 2000; SW-LKB). A anterior foi corrida em um tampão de fosfato de sódio 10 mM pH 5,5. Eluição da protease ligada foi obtida usando um gradiente linear de fosfato de sódio 10-300 mM, pH 5,5. A coluna de filtração de gel foi corrida em acetato de sódio 0,25 M pH 5,5.

#### Exemplo 4

##### Determinação da concentração de protease

[00157] Neste exemplo, processos usados para determinar as concentrações de protease são descritos. Em alguns experimentos medições de extinção foram feitas em 280 nm usando o coeficiente de extinção calculado (M), e titulação de sítio ativo foi usada para determinar a concentração de proteína em uma solução de protease purificada, como descrito abaixo. Em experimentos adicionais, os processos mostrados em pedido de patente US 11/011 666, aqui incorporado por referência, foram usados.

[00158] O coeficiente de extinção em 280 nm foi calculado a partir do número de triptofanos ( $M = 5600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) e tirosinas ( $M = 1330 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) por molécula de enzima. Para PB92 protease, o M foi  $26100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (3 Trp, 7 Tyr resíduos) equivalente a  $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ , medido em 280 nm = 9,7 ( $M_r = 26729 \text{ Da}$ ), foi usado. No caso de mutantes com um número alterado de resíduos Trp e resíduos Tyr, correções foram feitas da mesma maneira.

[00159] Uma estimativa do número de moléculas de enzima ativas foi obtida com uma titulação de sítio ativo. Uma vez que o processo amplamente usado com N-transcinnamoil imidazol (vide, Bender et al., J. Am. Chem. Soc., 88:5890-5931 [1966]) provou não funcionar satisfatoriamente para PB92 protease, um processo usando PMSF foi

ao invés desenvolvido.

[00160] Neste processo, uma solução de protease com uma concentração de enzima estimada (de absorção de 280 nm) foi misturada com 0,25, 0,50, 0,75, 1,00 e 1,25 equivalentes de PMSF, respectivamente, e deixada reagir por uma hora em temperatura ambiente em fosfato de sódio 10 mM pH 6,5. A concentração de enzima tem de ser pelo menos 50 M.

[00161] Atividade residual foi medida eletroforicamente usando succinil-L-alanil-L-alanil-L-prolil-L-fenil alanila-para-nitro anilida (sAAPFpNA) como um substrato. A pureza (e portanto concentração) de PMSF foi determinada por espectroscopia de RNM e soluções estoques foram feitas em isopropanol. Os resultados da titulação de sítio ativo foram verificados estarem em concordância com os resultados da pureza verificada com HPLC.

#### Exemplo 5

##### Determinação de parâmetros cinéticos de proteases tipo selvagem e mutante

[00162] Neste exemplo, processos usados para determinar os parâmetros cinéticos de proteases tipo selvagem e mutante são descritos.

[00163] Atividade sobre substratos de proteína (caseína) foi medida em pH 10,0 como descrito no pedido de patente GB 1 353 317 (expresso em ADU's = unidades Delft alcalinas).

[00164] O número de quantidade metabolizada com caseína como substrato foi medido em um pH-stat. A câmara de reação do pH-stat (Radiometer, Copenhagen) conteve 10 mL de KCl 0,1 M com 50 mg de caseína. (Hammerstein, Merck). Prótons, liberados com hidrólise de caseína por PB92 protease foram titulados com NaOH 10 mM, enquanto o pH foi mantido em 10,0 (a 40°C e sob um fluxo de gás nitrogênio).

[00165] Atividade sobre peptídeos sintéticos foi medida usando sAAPF<sub>p</sub>NA. A para nitroanilida (amarela) (pNA) formada foi medida espectrofotometricamente em 410 nm:  $M=8480 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  usando processos conhecidos na técnica (vide, Delmar et al., Anal. Biochem., 94:316-320 [1979]) com um espectrofotômetro UVIKON 860 (KONTRON) equipado com um trocador de célula de seis posições controlado com termostato. Os parâmetros cinéticos  $K_{cat}$  e  $K_m$  foram obtidos de medições de taxa inicial em várias concentrações de substrato (para PB92 protease de 0,1 – 6,0 mM) e adaptando os dados para uma função hiperbólica através de regressão não-linear usando o processo iterativo de secante multivariada. A constante de especificidade  $K_{cat}/K_m$  foi então calculada. Medições foram realizadas a 25°C, em um volume final de 1 mL contendo 0,1 M Tris-HCl + 0,1 M NaCl pH 8,6. O cloreto de sódio foi necessário, quando na sua ausência, PB92 mostrou gráficos Lineweaver-Burk não-lineares, que podem ter sido causados por inibição de substrato. O substrato foi primeiro dissolvido em DMSO para uma concentração de 200 mM e subsequentemente diluído com 0,1 M pH 8,6, para render uma solução estoque de 20 mM (determinada espectrofotometricamente em 315 nm;  $M = 14000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Nenhuma correção foi feita para as concentrações variáveis de DMSO (0,05-3,0% v/v).

#### Exemplo 6

##### Testes de desempenho de lavagem

[00166] Neste exemplo, processos usados para determinar o desempenho de lavagem de PB92 protease mutantes e comercialmente disponível PROPERASE® serina protease em aplicações de lavagem de pratos usando detergentes de pratos comercialmente disponíveis são descritos.

[00167] Neste exemplo, variantes de PB92 (049: G116V, S126L, P127Q, S128A; e 046: G116V, S126I, P127Q, S160D; numeração

PB92) foram testadas sob várias condições. As composições dos detergentes de pratos são providas abaixo. Estes detergentes são comercialmente disponíveis de WFK e são referidos pelas designações providas abaixo. Os protocolos para cada um dos tipos de mancha (carne moída, gema de ovo, e gema de ovo com leite) são providos abaixo. Antes de tipos de sujeira individuais poderem ser aplicados aos pratos testes, os pratos têm de ser inteiramente lavados. Isto é particularmente necessário, quando resíduos de certas manchas persistentes ainda podem estar presentes sobre os pratos a partir de testes anteriores. Novos pratos também foram submetidos a três lavagens totais antes de serem usados pela primeira vez em um teste.

Manchas de gema de ovo sobre aço inoxidável

[00168] As folhas de aço inoxidável (10x15 cm; escovadas sobre um lado) usadas nestes experimentos foram inteiramente lavadas a 95°C em um lavador de pratos de laboratório com um detergente comercial de alta alcalinidade (por exemplo, detergente ECOLAB®; Henkel) para prover folhas que foram limpas e livre de graxa. Estas folhas foram secadas por 30 minutos a 80°C em um gabinete térmico antes de serem manchadas com gema de ovo. As superfícies a serem escovadas não foram tocadas antes de serem sujas. Também, nenhuma mancha de água sobre as superfícies foram permitidas. As folhas resfriadas foram pesadas antes de serem sujas.

[00169] As gemas de ovo foram preparadas através de separação de gemas de aproximadamente 10-11 ovos (2000 g de gema de ovo) das claras. As gemas foram agitadas com um garfo em um becher de vidro para homogeneizar a suspensão de gemas. As gemas foram então coadas (aproximadamente 0,55 mm tela) para remoção de partículas grossas e quaisquer fragmentos de casca de ovo.

[00170] Uma escova plana 0,0635 m (2,5") foi usada para aplicar 1,0+/-0,1 g de suspensão de gema de ovo tão uniformemente quanto



possível sobre uma área de  $140 \text{ cm}^2$  sobre os lados escovados de cada uma das folhas de aço inoxidável, deixando um aro não-sujo de aproximadamente 1 cm de largura (fita adesiva foi usada se necessário). As folhas sujas foram secadas horizontalmente (para prevenir formação de gotículas sobre as bordas das folhas), em temperatura ambiente por 4 horas (max. 24 h).

[00171] Para desnaturação, as folhas foram imersas por 30 segundos em água desmineralizada, em ebulição (usando um dispositivo de retenção se necessário). Então, as folhas foram secadas novamente por 30 minutos em  $80^\circ\text{C}$ . Após pesagem, as folhas foram deixadas por pelo menos 24 horas ( $20^\circ\text{C}$ , 40-60% de umidade relativa) antes de submeter as mesmas ao teste de lavagem. De modo a satisfazer os requisitos de teste, somente folhas com  $500 \pm 100 \text{ mg}/140 \text{ cm}^2$  (gema de ovo após desnaturação), foram usadas nos testes. Após os testes de lavagem serem conduzidos, as folhas foram secadas por 30 minutos a  $80^\circ\text{C}$ , na gabinete térmico, e novamente pesadas após resfriamento. A porcentagem de desempenho de limpeza foi determinada por divisão de (mg de gema de ovo liberada por lavagem x 100) pelo (mg de gema de ovo desnaturada aplicada).

#### Carne moída sobre pratos de porcelana

[00172] Para estes experimentos, pratos de sobremesa (Arzberg, branco, porcelana vitrificada) conformando-se a EM 50242, forma 1495, Nº 0219, diâmetro de 19 cm foram usados. Um total de 225 g de porco magro e carne de vaca (meio a meio) foram e resfriados, após remoção de gordura visível. A mistura foi corrida duas vezes através de um moedor. Temperaturas acima de  $35^\circ\text{C}$  foram evitadas. Então, 225 g da carne moída foram misturados com 75 g de ovo (gema e clara misturadas). A preparação foi então congelada por três meses a  $-18^\circ\text{C}$ , antes de uso. Se porco não foi disponível, carne de vaca foi usada, quando estas são intercambiáveis.

[00173] A mistura de ovo e carne moída (300 g) foi levada para temperatura ambiente e misturada com 80 mL de água sintética. A mistura foi então homogeneizada usando um misturador manual de cozinha por 2 minutos. Então, um garfo foi usado para espalhar 3 g da mistura de carne moída/ovo/água sobre cada prato de porcelana branco, deixando uma margem limpa de aproximadamente 2 cm de largura ao redor do aro. A quantidade aplicada foi  $11,8 \pm 0,5 \text{ mg/cm}^2$ . Os pratos foram secados por 2 horas a  $120^\circ\text{C}$  em um gabinete térmico preaquecido. Tão logo os pratos foram resfriados, eles estavam prontos para uso. Os pratos foram empilhados com toalhas de papel entre cada um dos pratos.

[00174] Após lavagem, os pratos foram espargidos com solução de niidrina (1% etanol) para melhor identificação dos resíduos de carne moída. Para promover a reação de cor, os pratos foram aquecidos por 10 minutos a  $80^\circ\text{C}$  no gabinete térmico. Avaliação do desempenho de lavagem foi feita através de inspeção visual de reações de cor dos resíduos de carne moída com referência ao catálogo fotográfico IK W.

#### Manchas de Ovo/Leite Sobre Aço Inoxidável

[00175] As folhas de aço inoxidável (10x15 cm; escovadas sobre um lado) usadas nestes experimentos foram inteiramente lavadas a  $95^\circ\text{C}$  em um lavador de pratos de laboratório com um detergente comercial de alta alcalinidade para remoção de gordura e limpar as folhas. As folhas foram polidas secas com um pano de celulose. As superfícies a serem escovadas não foram tocadas antes de serem sujas. Também, nenhuma mancha de água ou penugem sobre as superfícies foram permitidas. Antes de sujar, as folhas foram colocadas em um gabinete térmico a  $80^\circ\text{C}$ , por 30 minutos. As folhas resfriadas foram pesadas antes de serem sujas.

[00176] As gemas e claras de ovos de ovos crus integrais (3-4 ovos; 160 g/ovo) foram colocadas em uma tigela e batidas com um

batedor de ovos. Então, 50 mL de leite semi-desnatado UHT (1,5% de gordura, temperatura ultra-alta, homogeneizado) foram adicionados. O leite e ovo foram misturados sem formação de espuma. Uma escova plana foi usada 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 foi deixada ao redor de lados curtos das folhas. As folhas sujas foram secadas horizontalmente (para prevenir formação de gotículas sobre as bordas das folhas), em temperatura ambiente por 4 horas (máx. 24 horas).

[00177] As folhas foram então imersas por 30 segundos em água desmineralizada em ebulição (usando um dispositivo pegador se necessário). Então, as folhas foram novamente secadas por 30 minutos a 80°C. Após secagem e resfriamento, as folhas foram pesadas. Após pesagem, as folhas foram deixadas por pelo menos 24 horas (20°C, 40-60% de umidade relativa), antes de submeter-se as mesmas ao teste de lavagem. De modo a satisfazer requisitos de testes, somente folhas com  $190 \pm 10$  mg de gema de ovo foram usadas.

[00178] Após os testes de lavagem serem conduzidos, as folhas foram secadas por 30 minutos a 80°C, no gabinete térmico, e novamente pesadas após resfriamento. A porcentagem de desempenho de limpeza foi determinada através de divisão de (mg de ovo/leite liberada por lavagem x 100) por (mg de ovo/leite aplicado).

#### Equipamento e Condições de Lavagem

[00179] Os testes de lavagem foram realizados em um lavador de pratos automático (Miele: G690SC), equipado com pratos e folhas de aço inoxidável sujos, como descrito acima. Uma definida quantidade do detergente foi usada, como indicado nas tabelas de resultados abaixo. As temperaturas testadas foram 45°C, 55°C e 65°C. A dureza

da água foi de 9° ou 21° GH (dureza Alemã) (374 ppm de Ca).

[00180] Como indicado acima, os pratos sujos com carne moída foram visualmente avaliados usando uma escala de classificação de foto de 0 a 10, onde "0" designou um prato completamente sujo e "10" designou um prato limpo. Estes valores correspondem à capacidade de remoção de mancha ou sujeira (SR) do detergente contendo enzima.

[00181] As placas de aço inoxidável sujas com gema de ovo e/ou gema de ovo leite lavadas foram analisadas gravimetricamente para determinar a quantidade de mancha residual após lavagem. A protease mutante PB92 e protease PROPERASE® e outros mutantes foram testados em um nível de entre 0 e 20,57 mg/proteína ativa por lavagem.

[00182] Os detergentes usados nestes experimentos são descritos abaixo. Estes detergentes foram obtidos da fonte sem a presença de enzimas, para permitir análise das enzimas testadas nestes experimentos.

Detergente isento de fosfato IEC-60436 WFK Tipo B (pH = 10,4 em 3 g/L)	
Componente	% em peso
Citrato de sódio diidratado	30,0
Sal de sódio de copolímero de ácido maléico/ácido acrílico (SOKALAN CP5; BASF)	12,0
Perborato de sódio monoidratado	5,0
TAED	2,0
di-silicato de sódio: Protill A (Cognis)	25,0
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
Tri-polifosfato de sódio	23,0
Citrato de sódio diidratado	22,3
Sal de sódio de copolímero de ácido maléico/ácido acrílico	4,0
Perborato de sódio monoidratado	6,0
TAED	2,0
di-silicato de sódio: Protill A (Cognis)	5,0
Etoxilato de álcool graxo linear	2,0
Carbonato de sódio anidro	Adicionar para 100

[00183] Nas tabelas que se seguem, os resultados para vários experimentos são providos. Em cada um destes experimentos, 20,57 mg de proteína ativa por lavagem foram usados. Nestes resultados, o índice foi 100. assim, os resultados de desempenho para enzima PROPERASE foram assinalados um valor de "100", e os resultados para os mutantes foram comparados a este valor. Por exemplo, se PROPERASE teve um resultado de 45% SR (100 como índice), e um mutante teve um resultado de 52% SR, o resultado para o mutante pode ser  $52/45 \times 100 = 116$  (como índice).

Detergente livre de fosfato, 45°C, 21°GH			
Enzima	Desempenho de lavagem sobre gema de ovo, em relação a PROPERASE®	Desempenho de lavagem sobre carne moída, em relação a PROPERASE®	Desempenho de lavagem sobre gema de ovo e leite, em relação a PROPERASE®
PROPERASE®	100	100	100
PB92 046	71	104	88
PB92 049	123	116	108

Detergente livre de fosfato, 55°C, 21°GH		
Enzima	Desempenho de lavagem sobre gema de ovo, em relação a PROPERASE®	Desempenho de lavagem sobre carne moída, em relação a PROPERASE®
PROPERASE®	100	100
PB92 046	ND	ND
PB92 049	134	128

Detergente livre de fosfato, 45°C, 21°GH			
Enzima	Desempenho de lavagem sobre gema de ovo, em relação a PROPERASE®	Desempenho de lavagem sobre carne moída, em relação a PROPERASE®	Desempenho de lavagem sobre gema de ovo e leite, em relação a PROPERASE®
PROPERASE®	100	100	100
PB92	90	100	100
PB92 046	104	71	88
PB92 049	116	123	108

Detergente contendo fosfato, 55°C, 21°GH			
Enzima	Desempenho de lavagem sobre gema de ovo em relação a PROPERASE®	Desempenho de lavagem sobre carne moída em relação a PROPERASE®	Desempenho de lavagem sobre gema de ovo e leite em relação a PROPERASE®
PROPERASE®	100	100	100
PB92 046	101	84	107
PB92 049	125	114	111

Detergente contendo fosfato, 45°C, 21°GH			
Enzima	Desempenho de lavagem sobre gema de ovo em relação a PROPERASE®	Desempenho de lavagem sobre carne moída em relação a PROPERASE®	Desempenho de lavagem sobre gema de ovo e leite em relação a PROPERASE®
PROPERASE®	100	100	100
PB92 046	94	76	104
PB92 049	116	170	126

Detergente contendo fosfato, 65°C, 21°GH			
Enzima	Desempenho de lavagem sobre gema de ovo em relação a PROPERASE	Desempenho de lavagem sobre carne moída em relação a PROPERASE	Desempenho de lavagem sobre gema de ovo e leite em relação a PROPERASE
PROPERASE®	100	100	100
PB92 046	97	38	104
PB92 049	122	126	112

[00184] Todas as patentes e publicações mencionadas no relatório descritivo são indicativas dos níveis daqueles versados na técnica à qual a invenção pertence. Todas as patentes e publicações são aqui incorporadas por referência na mesma extensão como se cada publicação individual fosse específica e individualmente indicada para ser incorporada por referência.

[00185] Tendo descrito as concretizações preferidas da presente invenção, parecerá àqueles versados na técnica que várias modificações podem ser feitas para as concretizações mostradas, e que tais modificações são pretendidas estarem dentro do escopo da presente invenção.

[00186] Aqueles versados na técnica facilmente apreciarão que a presente invenção é bem adaptada para realizar os objetos e obter os fins e vantagens mencionadas, assim como aqueles ali inerentes. As composições e processos aqui descritos são representativos de concretizações preferidas, são exemplares, e não são pretendidos como limitações sobre o escopo da invenção. É facilmente visível para aqueles versados na técnica que substituições e modificações variáveis podem ser feitas na invenção aqui mostrada sem se fugir de seu escopo e espírito.

[00187] A invenção ilustrativamente aqui descrita pode ser praticada na ausência de qualquer elemento ou elementos, limitação ou limitações que não são especificamente aqui mostradas. Os termos e expressões que foram empregados são usados como termos de descrição e não de limitação, e não há intenção no uso de tais termos e expressões de excluir quaisquer equivalentes das características mostradas e descritas ou suas porções, mas é reconhecido que várias modificações são possíveis dentro do escopo da invenção reivindicada. Assim, deve ser entendido que embora a presente invenção tenha sido especificamente mostrada através de concretizações preferidas e características opcionais, modificação e variação dos conceitos aqui mostrados podem ser recorridas por aqueles versados na técnica, e que tais modificações e variações são consideradas estarem dentro do escopo desta invenção como definido pelas reivindicações apostas.

[00188] A invenção foi ampla e geralmente aqui descrita. Cada uma das espécies mais estreitas e agrupamentos sub-gerais caindo dentro de exposição genérica também formam parte da invenção. Isto inclui a descrição genérica da invenção com a condição ou limitação negativa removendo qualquer matéria do gênero, independente de se ou não o material excisado é especificamente aqui recitado.



## REIVINDICAÇÕES

1. Composição detergente de lavagem de pratos, caracterizada pelo fato de que compreende uma subtilisina modificada, em que a referida subtilisina compreende pelo menos uma substituição na sequência:

AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDTGISTHP  
DLNIRGGASFVPGEPTQDGNGHGHVAGTIAALNNSIGVLGVAPNA  
ELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSPSPSAT  
LEQAVNSATSRGVLVVAASGNSGAGSISYPARYANAMAVGATDQNN  
NRASFSQYGAGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGA  
AALVKQKNPSWSNVQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR

em que cada posição corresponde a uma posição da sequência de aminoácidos de subtilisina BPN', e em que a referida subtilisina compreende as substituições G118V, S128L, P129Q, e S130A.

2. Composição detergente de lavagem de pratos de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de a subtilisina modificada consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

3. Composição detergente de lavagem de pratos de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de apresenta desempenho de lavagem melhorado para gema de ovo, carne moída, e leite com gema de ovo em comparação com uma composição detergente de lavagem de pratos que não contém a referida subtilisina modificada.

4. Processo de lavagem de pratos, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de: provimento de uma composição detergente de lavagem de pratos como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e louça em necessidade de limpeza; e contato da referida louça com a referida composição detergente sob condições efetivas para provimento de limpeza da dita louça.

FIG. 1A

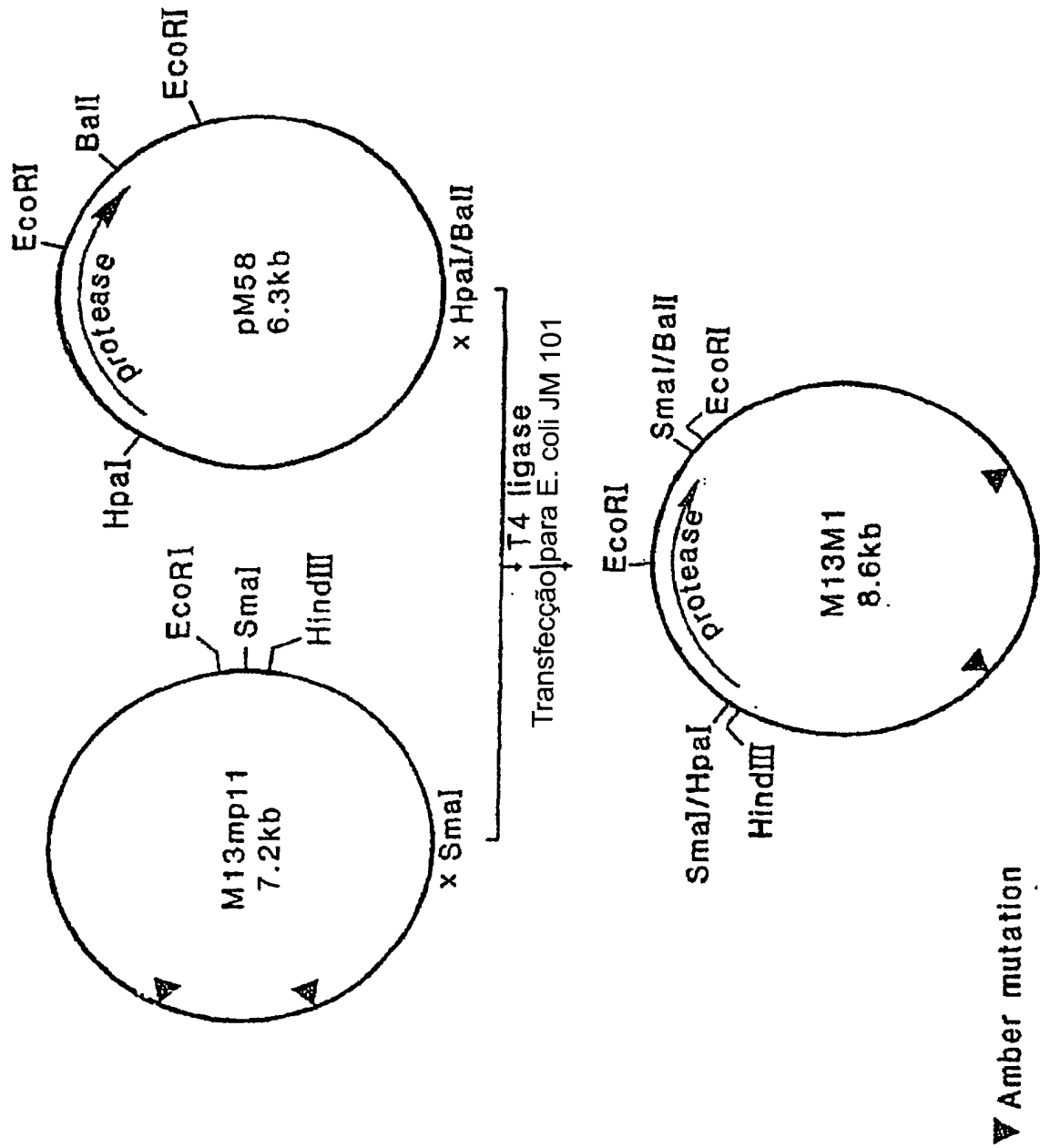


FIG. 1B

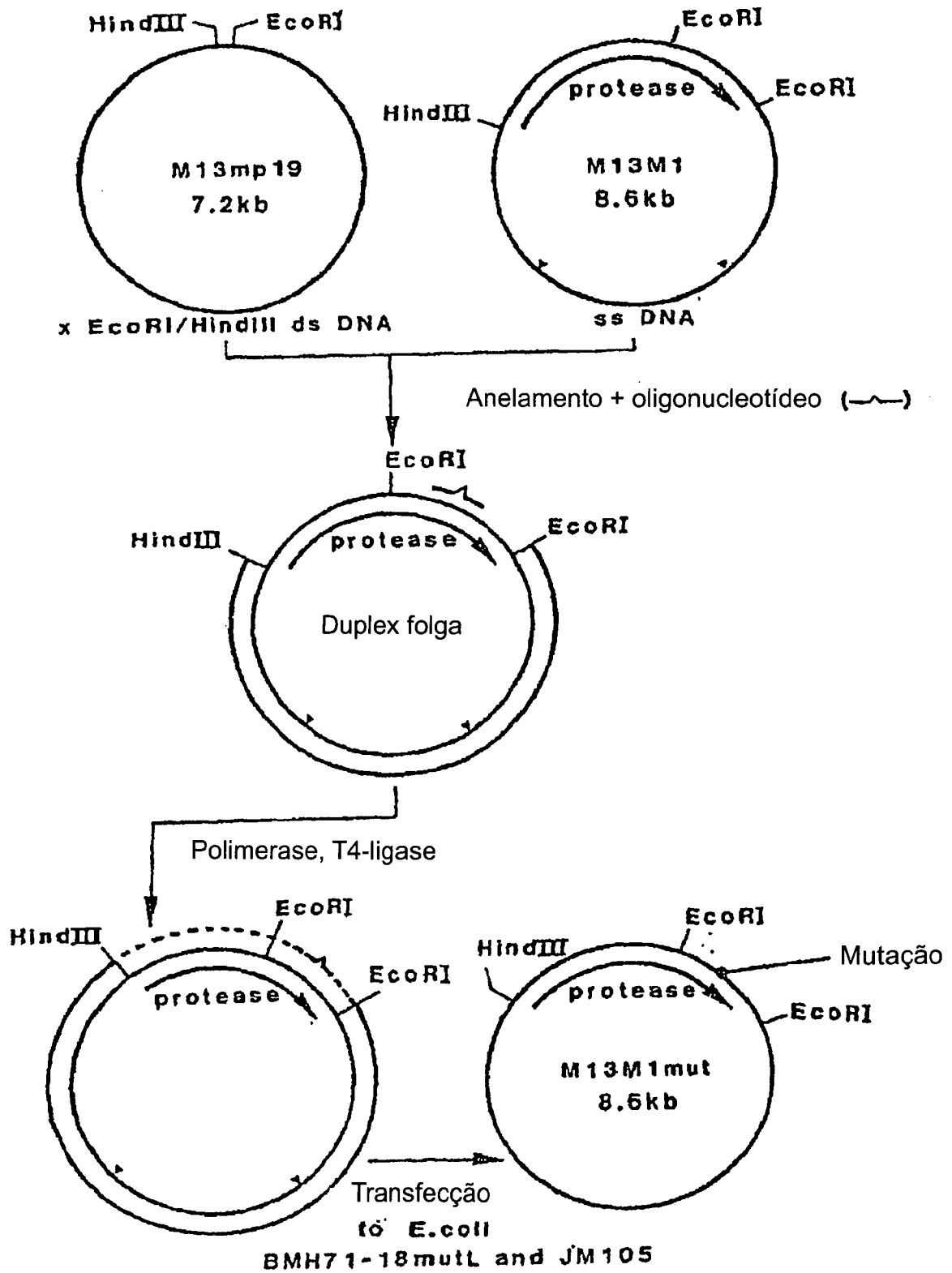


FIG. 1C

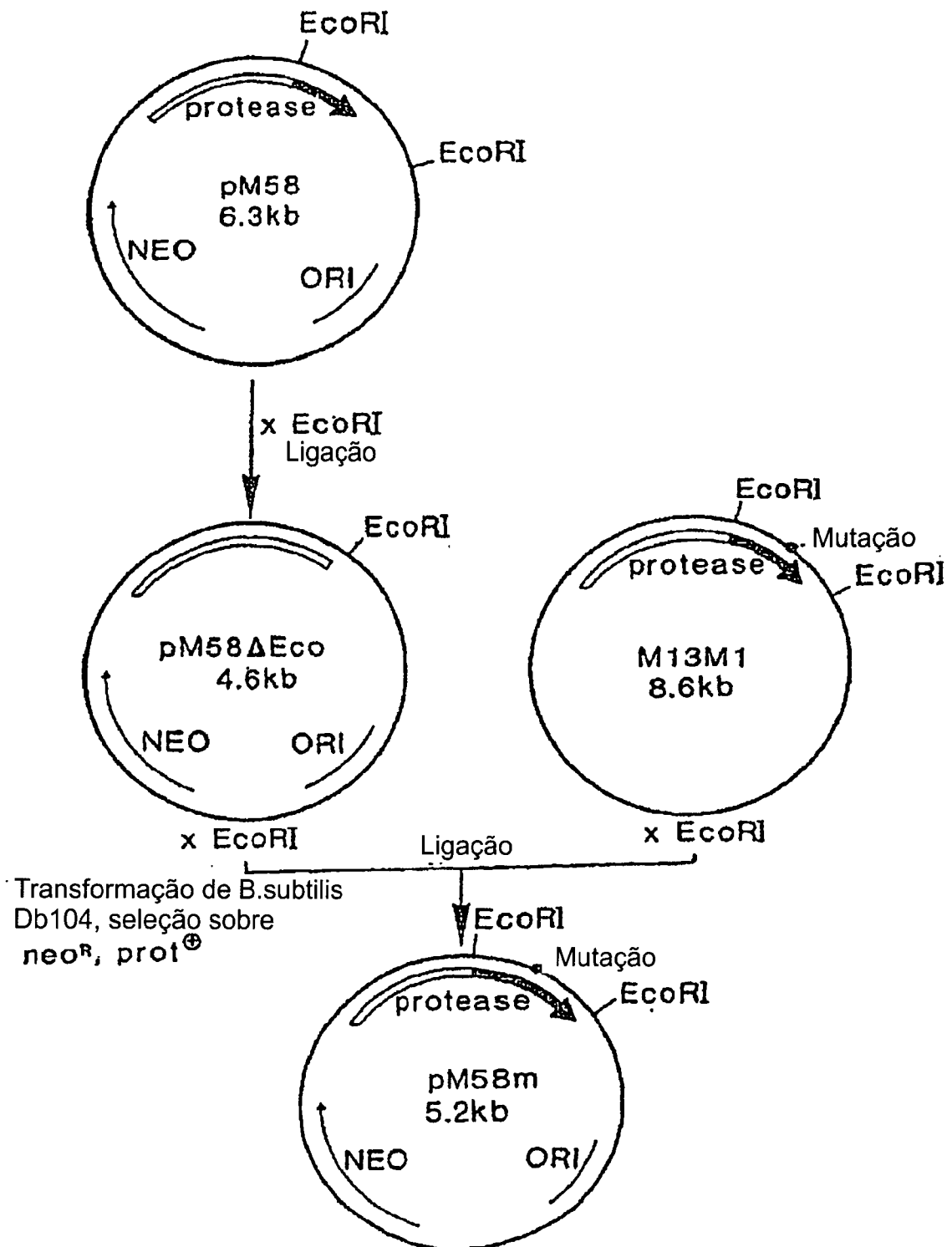
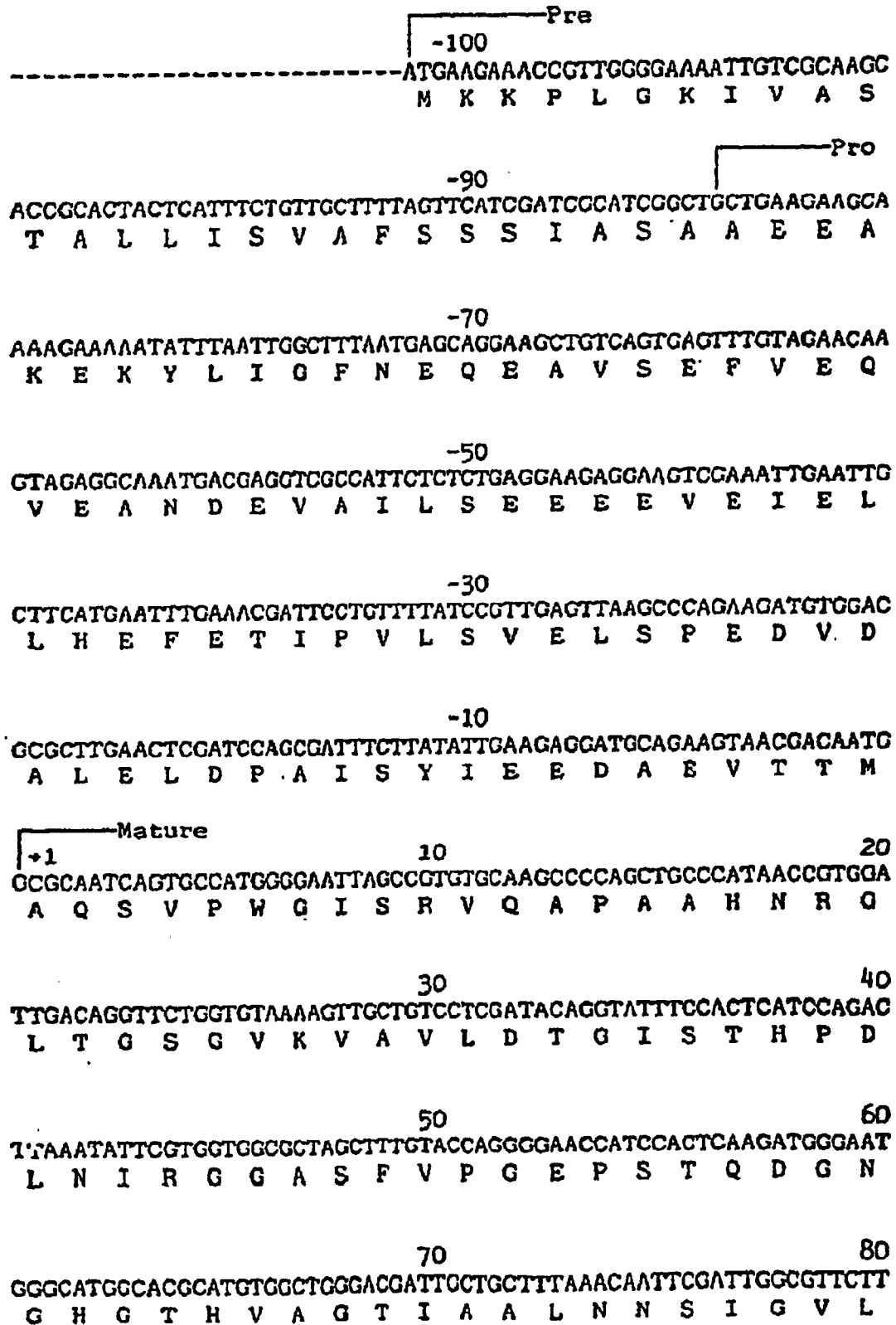


FIG. 2



# FIG. 2

(Continuação)

90 100  
GGCGTAGCACCGAACGCGGAACCTATACGCTGTTAAAGTATTAGGGGCGAGCGGTTTCAGGT  
G V A P N A E L Y A V K V L G A S G S G

110 120  
TCGGTCAGCTCGATTGCCCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTTGCT  
S V S S I A Q G L E W A G N N G M H V A

130 140  
AATTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCAAGTCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGCG  
N L S L G S P S P S A T L E Q A V N S A

150 160  
ACTTCTAGAGCGGTTCTTGTGTAGCGGCATCTGGGAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGG  
T S R G V L V V A A S G N S G A G S I S

170 180  
TATCCGGCCCGTTATCCGAACGCAATGGCAGTCCGAGCTACTGACCAAAACAAACAACCGC  
Y P A R Y A N A M A V G A T D Q N N N R

190 200  
GCCAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGGCTTGACATTGTGCGACCCAGGTGTAAACGTGCAG  
A S F S Q Y G A G L D I V A P G V N V Q

210 220  
AGCACATACCCAGGTTCAACGTATGCCAGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCAT  
S T Y P G S T Y A S L N G T S M A T P H

230 240  
GTTGCAGGTGCAGCAGCCCTTGTTAAACAAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTACAAATC  
V A G A A A L V K Q K N P S W S N V Q I

250 260  
CGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACGAGCTTGGGAAGCACGAACCTTGTATGGAAGCGGA  
R N H L K N T A T S L G S T N L Y G S G

270  
CTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGCTAA  
L V N A E A A T R End