

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0611932-8 A2**

(22) Data de Depósito: 16/06/2006
(43) Data da Publicação: 04/01/2011
(RPI 2087)



★ B R P I O 6 1 1 9 3 2 A 2 ★

(51) *Int.Cl.:*
A61K 38/47
C12N 9/28
A61K 38/54

(54) Título: **AMILASE, USO DA MESMA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE UMA DOENÇA**

(30) Prioridade Unionista: 24/06/2005 DK PA 2005 00931

(73) Titular(es): Novozymes A/S, Solvay Pharmaceuticals GMBH

(72) Inventor(es): Allan Svendsen, Peter Colin Gregory

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT DK2006000354 de 16/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/136161 de 28/12/2006

(57) Resumo: AMILASE, USO DA MESMA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, METODO PARA O TRATAMENTO DE UMA DOENÇA O uso farmacêutico das amilases relacionadas às alfa-amilases de Bacillus da SEQ ID NOS: 1 a 3, opcionalmente em combinação com uma lipase e/ou uma protease. Exemplos de indicações médicas são: tratamento dos distúrbios digestivos, insuficiência exócrina pancreática (PEI), pancreatite, fibrose cística, diabetes tipo 1, e/ou diabetes tipo II. As amilases da SEQ ID NOS: 1 a 3 são variantes das amilases de Bacillus steatothermophilus, Bacillus licheniformis e Bacillus sp. As amilases da invenção têm uma eficácia melhorada in vivo, um perfil de pH melhorado, uma alta atividade específica, e/ou um perfil de degradação do amido melhorado.



PI0611932-8

“AMILASE, USO DA MESMA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E,
MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE UMA DOENÇA”

CAMPO TÉCNICO

A presente invenção diz respeito ao uso farmacêutico das
5 amilases relacionadas a certas alfa-amilases de *Bacillus* (SEQ ID NOs: 1 a 3),
opcionalmente em combinação com uma lipase e/ou uma protease. Exemplos
de indicações médicas são: tratamento dos distúrbios digestivos, insuficiência
exócrina pancreática (PEI), pancreatite, fibrose cística, diabetes tipo I, e/ou
diabetes tipo II.

10 FUNDAMENTOS DA TÉCNICA

Vários medicamentos comerciais na forma de suplementos de
enzimas pancreáticas são conhecidos para o tratamento da insuficiência
exócrina pancreática. Os ingredientes ativos destes produtos são enzimas
digestivas, principalmente a amilase, a lipase e a protease, as quais são
15 normalmente produzidas no pâncreas e excretadas para a parte superior do
intestino delgado (o duodeno). As enzimas usadas em tais medicamentos
derivam do pâncreas bovino ou suíno, porém existem também produtos no
mercado com enzimas microbianas, por exemplo o produto Nortase[®], o qual
contém uma lipase de *Rhizopus oryzae*, uma protease de *Aspergillus oryzae*, e
20 uma amilase de *Aspergillus oryzae*.

A U.S. 5.614.189 (EP 600868) descreve o uso de, *inter alia*,
uma lipase derivada da *Humicola lanuginosa* na terapia de substituição da
enzima pancreática, por exemplo no tratamento de pacientes que estejam
sofrendo de fibrose cística. Esta lipase é da *Humicola lanuginosa* DSM4109 e
25 tem a seqüência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 269 da presente SEQ ID
NO:9.

A WO 00/54799 descreve o uso de misturas de enzimas
fisiologicamente aceitas tendo atividade lipolítica, proteolítica e amilolítica no
tratamento do diabetes melito tipos I e II.

A WO 02/060474 descreve o uso de uma lipase concentrada de *Rhizopus delemar*, uma protease neutra do *Aspergillus melieus*, e uma amilase do *Aspergillus oryzae* no tratamento da má digestão.

5 A WO 01/62280 descreve o uso de um cristal de lipase não fúngica reticulado com um agente multifuncional de reticulação, uma protease e uma amilase, em que o cristal de lipase é ativo em uma faixa de pH de cerca de 2,0 a 9,0, para tratar ou prevenir um distúrbio gastrointestinal em um mamífero. Uma lipase preferida é de *Pseudomonas*, amilases preferidas são de *Aspergillus* e *Bacillus*, proteases preferidas são a bromelaína, a papaína ou
10 a ficina.

A EP 0828509 descreve o uso de certas amilases estáveis em ácido, opcionalmente em combinação com certas lipases e/ou proteases estáveis em ácido, no tratamento da insuficiência exócrina do pâncreas. Uma amilase preferida é do *Aspergillus niger*, e lipases preferidas são do *Rhizopus arrhizus* ou *Rhizopus javanicus*.
15

A WO 99/19467 descreve certas variantes de alfa-amilases derivadas de *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus amyloliquefaciens*, bem como vários dos seus usos industriais, porém não o uso farmacêutico. As seqüências destas alfa-amilases de *Bacillus* do tipo
20 selvagem designadas SEQ ID NOs: 3 a 5 na WO 99/19467 são aqui incluídas como SEQ ID NOs: 10 a 12, respectivamente.

A EP 0594235 descreve um método para preparar amilase purificada de um caldo de fermentação. Uma composição farmacêutica é também reivindicada, e um uso potencial como auxiliar digestivo é
25 mencionado, junto com outros usos potenciais. Os exemplos ilustram o método de purificação reivindicado para uma alfa-amilase de *Bacillus licheniformis*.

A WO 2004/078960 apresenta um método para identificar pelo menos um epítipo de célula T de uma amilase e amilases variantes

compreendendo pelo menos uma alteração em pelo menos um epítipo. Muitos usos potenciais são enumerados, incluindo o uso farmacêutico. Uma amilase do *Bacillus licheniformis* é mencionada.

A EP 0828509 descreve o uso de certas amilases estáveis em ácido, opcionalmente em combinação com certas lipases e/ou proteases estáveis em ácido, no tratamento da insuficiência exócrina do pâncreas. Uma amilase preferida é de *Aspergillus niger*, e lipases preferidas são as de *Rhizopus arrhizus* ou *Rhizopus javanicus*.

Existe a necessidade na técnica de enzimas alternativas, de preferência melhoradas, para uso farmacêutico.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece enzimas alternativas, preferivelmente melhoradas, para uso farmacêutico, em particular para o tratamento de distúrbios digestivos, insuficiência exócrina pancreática (PEI), pancreatite, fibrose cística, diabetes tipo I e/ou diabetes tipo II. As novas enzimas são proteases, amilases e lipases. Preferivelmente, as enzimas para uso de acordo com a invenção têm uma eficácia melhorada *in vivo* e/ou *in vitro*; um perfil de atividade no pH melhorado; uma atividade específica melhorada; um perfil de degradação melhorado; são ativas na presença de sais biliares; e/ou têm uma alergenicidade reduzida.

A presente invenção diz respeito a uma amilase de pelo menos 50% de identidade aos (i) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1, (ii) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2, e/ou (iii) aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3; para uso como um medicamento, opcionalmente em combinação com uma lipase, e/ou uma protease.

A invenção também diz respeito ao uso de tais amilases para a fabricação de um medicamento para o tratamento de distúrbios digestivos, PEI, pancreatite, fibrose cística, diabetes tipo I e/ou diabetes tipo II, estes usos opcionalmente ainda compreendendo o uso de uma lipase e/ou uma protease.

A invenção além disso diz respeito a uma composição farmacêutica compreendendo tais amilases, junto com pelo menos um material auxiliar farmacêuticamente aceitável, opcionalmente incluindo uma lipase e/ou uma protease.

5 A invenção também diz respeito a um método para o tratamento de distúrbios digestivos, PEI, pancreatite (aguda e/ou crônica), fibrose cística, diabetes tipo I e/ou diabetes tipo II, mediante a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de tais amilases, opcionalmente junto com uma lipase e/ou uma protease.

10 BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra um cromatograma representando o perfil de degradação de uma amilase tendo a sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 486 da SEQ ID NO: 1 (uma variante de amilase de *Bacillus stearothermophilus*);

15 A Figura 2 mostra um cromatograma representando o perfil de degradação de uma amilase de *Aspergillus oryzae*;

A Figura 3 mostra um cromatograma representando o perfil de degradação da Pancreatina;

20 A Figura 4 mostra um cromatograma representando o perfil de degradação de uma amilase tendo a sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3 (uma variante de amilase de *Bacillus sp.*); e

25 A Figura 5 mostra um cromatograma representando o perfil de degradação de uma amilase tendo a sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2 (uma variante de amilase de *Bacillus licheniformis*).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

ENZIMAS

A presente invenção diz respeito ao uso de amilases tendo pelo

menos 50% de identidade aos (i) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1, (ii) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2, e/ou (iii) aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3; para uso como um medicamento. A invenção também diz respeito ao uso de tais amilases para a fabricação de um medicamento para o tratamento de distúrbios digestivos, PEI, pancreatite (aguda e/ou crônica), fibrose cística, diabetes tipo I e/ou diabetes tipo II. A invenção além disso diz respeito a uma composição farmacêutica compreendendo tais amilases, junto com pelo menos um material auxiliar farmacêuticamente aceitável. A invenção, além disso, diz respeito a um método para o tratamento das doenças mencionadas acima mediante a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de tais amilases.

No que segue, a amilase para uso nas composições, métodos e usos da invenção é referida como a “amilase da invenção”.

No presente contexto, uma amilase é uma enzima que catalisa a endo-hidrólise do amido e outros oligo- e polissacarídeos lineares e ramificados. Em uma forma de realização particular, a amilase para uso de acordo com a invenção tem uma atividade de alfa-amilase, isto é, catalisa a endo-hidrólise das articulações 1,4-alfa-glicosídicas nos oligossacarídeos e polissacarídeos. As alfa-amilases atuam, por exemplo, sobre o amido, o glicogênio e os polissacarídeos relacionados e oligossacarídeos de uma maneira aleatória, liberando grupos redutores na configuração alfa.

Em uma forma de realização preferida, a amilase da invenção é uma alfa-amilase (nome sistemático: 1,4-alfa-D-glicano glicanidrolase). Em outras formas de realização, a amilase da invenção pertence ao grupo de amilases EC 3.2.1, tal como EC 3.2.1.1 (alfa-amilase), EC 3.2.1.2 (beta-amilase), EC 3.2.1.3 (glican 1,4-alfa-glicosidase, amiloglicosidase ou glicoamilase), EC 3.2.1.20 (alfa-glicosidase), EC 3.2.1.60 (glican 1,4-alfa-maltotetraidrolase), EC 3.2.1.68 (isoamilase), EC 3.2.1.98 (glican 1,4-alfa-maltoexosidase) ou EC 3.2.1.133 (glican 1,4-alfa-maltoidrolase). Em uma

forma de realização preferida, a amilase para uso de acordo com a invenção pode ser, ou é, classificada como pertencente ao grupo EC 3.2.1.1. Os números de EC referem-se à Nomenclatura de Enzimas 1992 da NC-IUBMB, Academic Press, San Diego, Califórnia, incluindo os suplementos 1 a 5 publicados em *Eur. J. Biochem.* 1994, 223, 1-5; *Eur. J. Biochem.* 1995, 232, 1-6; *Eur. J. Biochem.* 1996, 237, 1-5; *Eur. J. Biochem.* 1997, 250, 1-6; e *Eur. J. Biochem.* 1999, 264, 610-650; respectivamente. A nomenclatura é regularmente suplementada e atualizada; ver, por exemplo, a World Wide Web em <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html>.

10 Em formas de realização particulares, a amilase da invenção tem um grau de identidade a qualquer um dos (i) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1, (ii) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2, e/ou (iii) aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3, de pelo menos 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, ou pelo menos 60%. Em outras formas de realização

15 particulares, a amilase da invenção tem um grau de identidade a qualquer um dos (i) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1, (ii) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2, e/ou (iii) aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3, de pelo menos 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, ou pelo menos 70%. Nas formas de realização particulares adicionais a amilase da invenção

20 tem um grau de identidade a qualquer um dos (i) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1, (ii) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2, e/ou (iii) aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3, de pelo menos 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79% ou pelo menos 80%. Em outras formas de realização particulares, a amilase da invenção tem um grau de identidade a qualquer um

25 dentre (i) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1, (ii) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2, e/ou (iii) aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3 de pelo menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% ou pelo menos 90%. Em ainda outras formas de realização particulares, a amilase da invenção tem um grau de identidade a qualquer um dos (i) aminoácidos 1 a

481 da SEQ ID NO: 1, (ii) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2, e/ou (iii) aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3, de pelo menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou pelo menos 99%.

Em uma outra formas de realização particular, a amilase da invenção compreende pelo menos uma substituição, deleção e/ou inserção de um ou mais aminoácidos em qualquer uma das seqüências de (i) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1, (ii) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2 e/ou (iii) aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3. Preferivelmente as mudanças de aminoácidos são de uma natureza secundária, isto é, substituições ou inserções conservativas de aminoácidos que não afetam significativamente a duplicação e/ou a atividade da proteína; pequenas deleções; pequenas extensões de terminal amino ou carboxila, tais como um resíduo de metionina de terminal amino; um pequeno peptídeo ligador; ou uma pequena extensão que facilite a purificação pela mudança da carga líquida ou outra função, tal como um trato de poli-histidina, um epítipo antigênico ou um domínio de ligação. No contexto acima, o termo “pequeno” independentemente designa um número de até 25 resíduos de aminoácidos. Nas formas de realização preferidas, o termo “pequeno” designa até 24, 23, 22, 21 ou até 20 resíduos de aminoácido. Nas formas de realização preferidas adicionais, o termo “pequeno” independentemente designa até 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 ou até 10 resíduos de aminoácidos. Em outras formas de realização preferidas, o termo “pequeno” independentemente designa até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou até 1 resíduo de aminoácido. Em formas de realização alternativas, o termo “pequeno” independentemente designa até 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26 ou até 25 resíduos de aminoácido

Exemplos de substituições conservativas acham-se dentro do grupo de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutâmico e ácido aspártico), aminoácidos polares (serina, treonina, glutamina e asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina,

isoleucina, valina e alanina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptofano e tirosina), e pequenos aminoácidos (glicina, alanina, prolina, serina, treonina, cisteína e metionina).

Na alternativa, exemplos de substituições conservativas
 5 acham-se dentro do grupo de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutâmico e ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina e asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina e valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptofano e tirosina), e pequenos aminoácidos (glicina, alanina, serina,
 10 treonina e metionina). As substituições que em geral não alteram a atividade específica são conhecidas na técnica e são descritas, por exemplo, em H. Neurath e R. L. Hill, 1979, em *The Proteins*, Academic Press, New York. As trocas mais comumente ocorrentes são Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg,
 15 Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu e Asp/Gly.

Em formas de realização adicionais, a amilase da invenção tem uma seqüência de aminoácidos que difere em não mais do que 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12 ou não mais do que 11 aminoácidos de qualquer um dentre (i) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1, (ii)
 20 aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2 e/ou (iii) aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3; ou difere de qualquer um dentre (i) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1, (ii) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2 e/ou (iii) aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3 em não mais do que 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou em não mais do que 1 aminoácido. Nas formas de realização alternativas, a
 25 amilase da invenção tem uma seqüência de aminoácidos que difere em não mais do que 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27 ou não mais do que 26 aminoácidos de qualquer um dentre (i) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1, (ii) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2, e/ou (iii) aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3.

Em ainda outras formas de realização particulares, a amilase da invenção é uma variante alélica de qualquer uma das amilases tendo (i) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1, (ii) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2 e/ou (iii) aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3, ou um fragmento destes que tenha atividade de amilase. A amilase da invenção pode também ser uma variante alélica de qualquer uma das amilases tendo as seqüências de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 e SEQ ID NO: 12. A expressão variante alélica denota qualquer dentre duas ou mais formas alternativas de um gene que ocupe o mesmo locus cromossômico. A variação alélica surge naturalmente através de mutação, e pode resultar em polimorfismo dentro das populações. As mutações de genes podem ser silenciosas (sem qualquer mudança no polipeptídeo codificado) ou podem codificar polipeptídeos tendo seqüências de aminoácidos alteradas. Uma variante alélica de um polipeptídeo é um polipeptídeo codificado por uma variante alélica de um gene. O termo fragmento é aqui definido como um polipeptídeo tendo um ou mais aminoácidos deletados do término amino e/ou carboxila de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 3, preferivelmente tendo um ou mais aminoácidos deletados do término amino e/ou carboxila dos aminoácidos 1 a 481, 1 a 484, 1 a 486 ou 1 a 513 da SEQ ID NO: 1; dos aminoácidos 1 a 481 of SEQ ID NO: 2 ou dos aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3. Preferivelmente, um pequeno número de aminoácidos foi deletado, pequeno sendo definido como explanado acima. Mais preferivelmente um fragmento contém pelo menos 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453 ou pelo menos 454 resíduos de aminoácidos. O mais preferível é que um fragmento contenha pelo menos 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469 ou pelo menos 470 resíduos de aminoácido. Ainda mais preferível, um fragmento contém pelo menos 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479 ou pelo menos 480 resíduos de aminoácidos.

Em resumo, uma forma de realização da presente invenção diz respeito a uma amilase para uso farmacêutico, em que a) a amilase compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo em (i) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1, (ii) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2 e/ou (iii) aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3 e/ou b) a amilase é uma variante de uma seqüência de aminoácidos selecionado do grupo consistindo em (i) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1, (ii) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2, e/ou (iii) aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3, em que a variante difere da seqüência de aminoácidos respectiva em não mais do que vinte e cinco aminoácidos, e em que: (i) a variante compreende pelo menos uma substituição, deleção e/ou inserção de um ou mais aminoácidos em comparação com a respectiva seqüência de aminoácidos; e/ou (ii) a variante compreende pelo menos uma pequena deleção em comparação com a respectiva seqüência de aminoácidos; e/ou (iii) a variante compreende pelo menos uma pequena extensão N-terminal ou C-terminal em comparação com a respectiva seqüência de aminoácidos; e/ou c) a amilase é uma variante alélica de uma amilase tendo aminoácidos selecionados do grupo consistindo de (i) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1, (ii) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2 e/ou (iii) aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3; e/ou d) a amilase é um fragmento de uma amilase tendo aminoácidos selecionados do grupo consistindo em (i) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1, (ii) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2 e/ou (iii) aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3.

Em particular, a presente invenção diz respeito a uma amilase para uso farmacêutico, em que a amilase tem uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo em (i) aminoácidos 1 a 481, 1 a 484, 1 a 486 ou 1 a 513 da SEQ ID NO: 1, (ii) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2 e/ou (iii) aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3.

Em ainda outras formas de realização particulares da invenção,

a amilase é derivada de um microorganismo, por exemplo de um fungo, ou de uma bactéria. Exemplos de bactérias são as cepas de *Bacillus*, tais como as cepas de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus circulans*, *Bacillus halmapalus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus* sp., *Bacillus* 5 *stearothermophilus* e *Bacillus subtilis*; preferivelmente das cepas de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus circulans*, *Bacillus halmapalus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus* sp. e *Bacillus stearothermophilus*; os mais preferíveis das cepas de *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis* oU *Bacillus* sp. Neste contexto, a 10 expressão “derivada de” inclui enzimas obteníveis, ou obtidas, de cepas do tipo selvagem; assim como, preferivelmente, as suas variantes tendo pelo menos uma substituição, inserção e/ou deleção de pelo menos um resíduo de aminoácidos. O termo variante também inclui embaralhadores, híbridos, enzimas quiméricas e enzimas de consenso. As variantes podem ter sido 15 produzidas por qualquer método conhecido na técnica, tal como a mutagênese dirigida ao sítio, a mutagênese aleatória, os processos de derivação de consenso (EP 897985), e embaralhadores de genes (WO 95/22625, WO 96/00343), etc.

Exemplos não limitativos das amilases do tipo selvagem da 20 invenção são aqueles derivados do *Bacillus licheniformis*, tal como o nome de entrada da Swissprot AMY_BACLI, número de acesso primário P06278; *Bacillus amyloliquefaciens*, tal como o nome de entrada da Swissprot AMY-_BACAM, número de acesso primário P00692; *Bacillus megaterium*, tal como o nome de entrada da Swissprot AMY_BACME, número de acesso 25 primário P20845; *Bacillus circulans*, tal como o nome de entrada da Swissprot AMY_BACCI, número de acesso primário P08137; *Bacillus stearothermophilus*, tal como o nome de entrada da Swissprot AMY-BACST, número de acesso primário P06279. Outro exemplo é o do *Bacillus subtilis*, tal como o nome de entrada da Swissprot AMY_BACSU, número de acesso

primário P00691. Um outro exemplo ainda é a amilase derivada de *Bacillus halmapalus*, aminoácidos 1 a 485 da SEQ ID NO: 4. Exemplos não limitativos de variantes da amilase para uso de acordo com a invenção são apresentados nas WO 96/23873, WO 99/19467, patente U.S. nº 4.933.279, EP 722490 e EP 904360. Nas formas de realização particulares, a amilase da invenção (i) não é o nome de entrada da Swissprot AMY_BACLI, número de acesso primário P06278; e/ou (ii) não é o nome de entrada da Swissprot AMY_BACST, número de acesso primário P06279.

Outros exemplos particulares de amilases da invenção são as amilases contidas nos seguintes produtos comerciais: Clarase, DexLo, GC 262 SP, G-Zyme G990, G-Zyme G995, G-Zyme G997, G-Zyme G998, HTAA, Optimax 7525, Purastar OxAm, Purastar ST, Spezyme AA, Spezyme Alfa, Spezyme BBA, Spezyme Delta AA, Spezyme DBA, Spezyme Ethyl, Spezyme Fred (GC521), Spezyme HPA e Ultraphlow (todos da Genencor); Validase BAA, Validase FAA, Validase HT340L, Valley Thin 340L (todos da Valley Research); Avizyme 1500, Dextro 300 L, Kleistase, Maltazyme, Maxamyl, Thermozyme, Thermatex, Starzyme HT 120 L, Starzyme Super Conc. e Ultraphlo.

Exemplos particularmente preferidos de amilases da invenção são os seguintes: Uma amilase compreendendo os aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1, tal como as amilases tendo os aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1, os aminoácidos 1 a 484 da SEQ ID NO: 1, os aminoácidos 1 a 486 da SEQ ID NO: 1, ou os aminoácidos 1 a 513 da SEQ ID NO: 1; uma amilase tendo os aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2; e uma amilase tendo os aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3.

Em ainda outras formas de realização particulares, uma amilase adicional pode ser usada. Exemplos de amilases adicionais são as amilases de mamíferos e as proteases microbianas. Uma amilase de mamíferos preferida é o extrato pancreático, por exemplo da suíno ou de boi,

tal como a pancreatina. A pancreatina pode ser usada na forma de um produto sem revestimento (bruto), ou na forma de um produto formulado [revestido entericamente (para proporcionar resistência contra o ácido gástrico) ou não funcionalmente revestido (revestido, porém não para proporcionar resistência contra o ácido gástrico)]. A pancreatina potencialmente compreende ainda outros constituintes enzimáticos ativos como a lipase pancreática, a BSSL (Lipase Estimulada pelo Sal Biliar) e/ou a protease pancreática. A amilase microbiana pode, por exemplo, originar-se das cepas bacterianas ou fúngicas, tais como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aspergillus* ou *Rhizopus*. A amilase pode, em particular, ser derivada de uma cepa de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* ou *Aspergillus melleus*, por exemplo ou dos produtos Amylase A1[®] derivados de *Aspergillus oryzae*, o qual é comercialmente disponível da Amano Pharmaceuticals, Japão, ou Amylase EC[®] derivado de *Aspergillus melleus*, o qual é comercialmente disponível da Extract-Chemie, Alemanha.

A amilase da invenção pode ser usada, com ou sem uma lipase como descrito abaixo, em combinação com uma protease. O termo “protease” é aqui definido como uma enzima que hidrolisa ligações peptídicas. Ele inclui qualquer enzima pertencente ao grupo de enzimas EC 3.4 (incluindo cada uma das suas treze subclasses, estas enzimas estando no que segue referidas como “pertencentes ao grupo EC 3.4.-.-“.

A protease pode ser uma protease de mamífero, ou uma protease microbiana. Uma protease de mamífero preferida é o extrato pancreático, por exemplo de suíno ou de boi, tal como a pancreatina. A pancreatina pode ser usada na forma de um produto não revestido (bruto), ou na forma de um produto formulado (entericamente revestido, ou não funcionalmente revestido). A pancreatina potencialmente compreende ainda outros constituintes enzimáticos ativos como a lipase pancreática, BSSL e/ou a amilase pancreática. A protease microbiana pode ser, por exemplo, com

base nas cepas bacterianas ou fúngicas ou delas derivada. A protease pode, em particular, ser derivada de uma cepa de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus oryzae* ou *Aspergillus melleus*, em particular o produto Prozyme 6[®] (protease alcalina neutra EC 3.4.21.63), que é comercialmente disponível da Amano Pharmaceuticals, Japão. Exemplos de proteases bacterianas são as proteases de *Bacillus* e *Nocardiosis*, tais como a protease de *Bacillus licheniformis* tendo a seqüência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 274 da SEQ ID NO: 5, a protease de *Nocardiosis* sp. tendo a seqüência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 6, ou a protease de *Nocardiosis dassonvillei* subesp. *dassonvillei* tendo a seqüência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 7. A protease dos aminoácidos 1 a 274 da SEQ ID NO: 5 pode, por exemplo, ser preparada como descrito no pedido de patente DK nº 2005 00930 intitulado “*Proteases for Pharmaceutical Use*” e depositado em 24 de junho de 2005 pelas Solvay Pharmaceuticals GmbH e Novozymes A/S. As proteases dos aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NOs: 6 e 7 podem, por exemplo, ser preparadas como descrito nas WO 2001/58276 ou na WO 2004/111224.

Em uma forma de realização preferida, a protease é pelo menos 70% idêntica a qualquer dos (i) aminoácidos 1 a 274 de SEQ ID NO: 5, (ii) aminoácidos 1 a 188 de SEQ ID NO: 6, e/ou (iii) aminoácidos 1 a 188 de SEQ ID NO: 7. Nas formas de realização preferidas adicionais de qualquer dos (i), (ii) ou (iii), os graus de identidade são de pelo menos 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou pelo menos 99%. Nas formas de realização alternativas de qualquer dentre (i), (ii) ou (iii), os graus de identidade são de pelo menos cerca de 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, ou de pelo menos 69%.

A amilase da invenção pode ser usada com o sem uma

protease como mencionado acima, em combinação com uma lipase. No presente contexto, uma lipase significa uma hidrolase de éster carboxílico EC 3.1.1-, que inclui atividades tais como a triacilglicerol lipase EC 3.1.1.3, a fosfolipase A1 3.1.1.4, a lisofosfolipase EC 3.1.1.5, a galactolipase EC 3.1.1.26, a fosfolipase A1 3.1.1.32, a feruloil esterase EC 3.1.1.73. Em uma forma de realização particular, a lipase é uma triacilglicerol lipase EC 3.1.1.3.

A lipase pode ser uma lipase de mamíferos, ou uma lipase microbiana. Uma lipase de mamíferos preferida é o extrato pancreático, por exemplo de suíno ou de boi, tal como a pancreatina. A pancreatina pode ser usada na forma de um produto sem revestimento (bruto), ou na forma de um produto formulado (revestido entericamente ou não funcionalmente revestido). A pancreatina potencialmente compreende ainda outros constituintes enzimáticos ativos como a protease pancreática, a BSSL e/ou a amilase pancreática. A lipase microbiana pode, por exemplo, originar-se das cepas bacterianas ou fúngicas, tais como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aspergillus* ou *Rhizopus*. A lipase pode, em particular, ser derivada de uma cepa de *Rhizopus*, tal como *Rhizopus javanicus*, *Rhizopus oryzae* ou *Rhizopus delemar*, por exemplo o produto Lipase D Amano 2000[®] (também designado Lipase D2[®]) o qual acha-se comercialmente disponível da Amano Pharmaceuticals, Japão.

Em outras formas de realização particulares, a lipase é uma lipase microbiana recombinantemente produzida, por exemplo derivada de um fungo tal como *Humicola* ou *Rhizomucor*, de uma levedura tal como a *Candida*, ou de uma bactéria tal como a *Pseudomonas*. Em uma forma de realização preferida, a lipase é derivada de uma cepa de *Humicola lanuginosa* ou *Rhizomucor miehei*.

A lipase de *Humicola lanuginosa* (sinônimo *Thermomyces lanuginosus*) (SEQ ID NO: 9) é descrita na EP 305216, e variantes particulares de lipases são descritas, por exemplo, nas WO 92/05249, WO

92/19726, WO 94/25577, WO 95/22615, WO 97/04079, WO 97/07202, WO 99/42566, WO 00/32758, WO 00/60063, WO 01/83770, WO 02/055679 e WO 02/066622. Uma variante de lipase preferida é uma lipase compreendendo os aminoácidos 1 a 269 ou 2 a 269 da SEQ ID NO: 8, tais como os seguintes (i) aminoácidos +1 a +269 da SEQ ID NO: 8, (ii) aminoácidos -5 a +269 da SEQ ID NO: 8, (iii) aminoácidos -4 a +269 da SEQ ID NO: 8; (iv) aminoácidos -3 a +269 da SEQ ID NO: 8; (v) aminoácidos -2 a +269 da SEQ ID NO: 8; (vi) aminoácidos -1 a +269 da SEQ ID NO: 8, (vii) aminoácidos +2 a +269 da SEQ ID NO: 1, bem como (viii) qualquer mistura de duas ou mais das lipases de (i) a (vii) e suas variantes. Em uma forma de realização particular, a lipase para uso de acordo com a invenção é selecionada das lipases de (i), (ii) e qualquer mistura de (i) e (ii). Misturas preferidas de (i) e (ii) compreendem pelo menos 5%, preferivelmente pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou pelo menos 95% da lipase (i), os percentuais sendo determinados pela seqüenciação N-terminal com o uso do método de Edman, como descrito no Exemplo 5 do pedido PCT que reivindica prioridade do pedido de patente DK nº 2005 00929. Outras misturas preferidas são: (a) composições compreendendo de 35 a 75%, preferível de 40 a 70%, mais preferível de 45 a 65% de lipase (ii); (b) composições compreendendo de 20 a 60%, preferivelmente de 25 a 55%, mais preferível de 30 a 50%, o mais preferível de 35 a 47% da lipase (i); (c) composições compreendendo até 30%, preferivelmente até 25%, mais preferível até 20%, o mais preferível até 16% da lipase (vii); e (d) qualquer combinação de (a), (b) e/ou (c), tal como uma composição compreendendo de 45 a 65% da lipase (ii), 35 a 47% da lipase (i), e até 16% da lipase (vii).

As lipases das SEQ ID NOs: 8 e 9 podem, por exemplo, ser preparadas com base nos preceitos da Patente U.S. nº 5.869.438 (em que a SEQ ID NO: 1 é uma seqüência de DNA codificando a lipase da SEQ ID NO: 9). A lipase da SEQ ID NO: 8 pode, por exemplo, ser preparada pela

expressão recombinante em uma célula hospedeira adequada de uma sequência de DNA que seja uma modificação da SEQ ID NO: 1 da Patente U.S., a modificação refletindo as diferenças de aminoácidos entre as SEQ ID NOs: 8 e 9 presentes. Tais modificações podem ser feitas por mutagênese dirigida ao sítio, como é conhecido na técnica.

Outros exemplos ainda de lipases fúngicas são a cutinase da *Humicola insolens*, que é descrita na EP 785994, e a fosfolipase de *Fusarium oxysporum* que é descrita na EP 869167. Exemplos de lipases de leveduras são as lipases A e B de *Candida antarctica*, cuja lipase A é descrita na EP 652945, e a lipase B é descrita, por exemplo, por Uppenberg *et al.* em *Structure*, 2 (1994), 293. Um exemplo de uma lipase bacteriana é a lipase derivada de EP 214761.

Em uma forma de realização preferida, a lipase é pelo menos 70% idêntica à lipase da SEQ ID NO: 8, ou aos aminoácidos 1 a 269 desta.

Nas formas de realização preferidas adicionais, o grau de identidade à SEQ ID NO: 8, ou aos seus aminoácidos 1 a 269, é de pelo menos 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou pelo menos 99%. Nas formas de realização alternativas, o grau de identidade à SEQ ID NO: 8, ou aos seus aminoácidos 1 a 269, é de pelo menos cerca de 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, ou pelo menos 69%.

Em ainda uma outra forma de realização preferida, a lipase, como a lipase pancreática de mamífero, é uma lipase específica da posição 1,3.

Para os fins da presente invenção, as combinações de enzimas particularmente preferidas são as seguintes: (i) A protease dos aminoácidos 1 a 274 da SEQ ID NO: 5 em combinação com uma amilase compreendendo os aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1 (tais como os seus aminoácidos 1 a

481, 1 a 484, 1 a 486 ou 1 a 513); (ii) a protease dos aminoácidos 1 a 274 da SEQ ID NO: 5 em combinação com a amilase da SEQ ID NO: 2; (iii) a protease dos aminoácidos 1 a 274 da SEQ ID NO: 5 em combinação com a amilase da SEQ ID NO: 3; (iv) a protease dos aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 6 em combinação com uma amilase compreendendo os aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1 (tais como os seus aminoácidos 1 a 481, 1 a 484, 1 a 486 ou 1 a 513); (v) a protease dos aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 6 em combinação com a amilase da SEQ ID NO: 2; (vi) a protease dos aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 6 em combinação com a amilase da SEQ ID NO: 3; (vii) uma lipase compreendendo os aminoácidos 1 a 269 ou 2 a 269 da SEQ ID NO: 8 em combinação com uma amilase compreendendo os aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1 (tais como os seus aminoácidos 1 a 481, 1 a 484, 1 a 486 ou 1 a 513); (viii) uma lipase compreendendo os aminoácidos 1 a 269 ou 2 a 269 da SEQ ID NO: 8 em combinação com a amilase da SEQ ID NO: 2; (ix) uma lipase compreendendo os aminoácidos 1 a 269 ou 2 a 269 da SEQ ID NO: 8 em combinação com a amilase da SEQ ID NO: 3; (x) uma protease dos aminoácidos 1 a 274 da SEQ ID NO: 5 em combinação com uma amilase compreendendo aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1 (tais como os seus aminoácidos 1 a 481, 1 a 484, 1 a 486 ou 1 a 513) e uma lipase compreendendo os aminoácidos 1 a 269 ou 2 a 269 da SEQ ID NO: 8; (xi) uma protease dos aminoácidos 1 a 274 da SEQ ID NO: 5 em combinação com a amilase da SEQ ID NO: 2 e uma lipase compreendendo os aminoácidos 1 a 269 ou 2 a 269 da SEQ ID NO: 8; (xii) a protease dos aminoácidos 1 a 274 da SEQ ID NO: 5 em combinação com a amilase da SEQ ID NO: 3 e uma lipase compreendendo os aminoácidos 1 a 269 ou 2 a 269 da SEQ ID NO: 8); (xiii) a protease dos aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 6 em combinação com uma amilase compreendendo os aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1 (tais como os seus aminoácidos 1 a 481, 1 a 484, 1 a 486 ou 1 a 513) e uma lipase compreendendo os aminoácidos 1 a 269 ou 2 a

269 da SEQ ID NO: 8; (xiv) a protease dos aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 6 a amilase da SEQ ID NO: 2 e uma lipase compreendendo os aminoácidos 1 a 269 ou 2 a 269 da SEQ ID NO: 8; (xv) uma protease dos aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 6 em combinação com a amilase da SEQ ID NO: 3 e uma lipase compreendendo os aminoácidos 1 a 269 ou 2 a 269 da SEQ ID NO: 8; (xvi) uma protease tendo os aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 7 em combinação com uma amilase compreendendo aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1 (tais como os seus aminoácidos 1 a 481, 1 a 484, 1 a 486 ou 1 a 513); (xvii) uma protease tendo os aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 7 em combinação com uma amilase tendo os aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2; (xviii) uma protease tendo os aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 7 em combinação com uma amilase tendo os aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3; (xix) uma protease tendo os aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 7 em combinação com uma amilase compreendendo os aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1 (tais como os seus aminoácidos 1 a 481, 1 a 484, 1 a 486 ou 1 a 513) e uma lipase compreendendo os aminoácidos 1 a 269 ou 2 a 269 da SEQ ID NO: 8; (xx) uma protease tendo os aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 7 em combinação com uma amilase tendo os aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2 e uma lipase compreendendo os aminoácidos 1 a 269 ou 2 a 269 da SEQ ID NO: 8; e (xi) uma protease tendo os aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 7 em combinação com uma amilase tendo os aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3 e uma lipase compreendendo os aminoácidos 1 a 269 ou 2 a 269 da SEQ ID NO: 8.

Conseqüentemente, uma forma de realização da presente invenção diz respeito a uma amilase em combinação com uma lipase e/ou uma protease de acordo com as reivindicações 4 ou 5, em que a amilase é uma amilase selecionada do grupo consistindo em a) uma amilase compreendendo os aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1, b) uma amilase tendo os

aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2, e c) uma amilase tendo os aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3; (ii) a lipase compreende os aminoácidos 2 a 269 da SEQ ID NO: 8; (iii) a protease é uma protease selecionada do grupo consistindo em a) uma protease tendo os aminoácidos 1 a 274 da SEQ ID NO: 5, b) uma protease tendo os aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 6, e c) uma protease tendo os aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 7.

Outras combinações preferidas das enzimas são as seguintes:

- (i) Uma protease tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 274 da SEQ ID NO: 5 em combinação com uma amilase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1; (ii) uma protease tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 274 da SEQ ID NO: 5 em combinação com uma amilase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2; (iii) uma protease tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 274 da SEQ ID NO: 5 em combinação com uma amilase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3; (iv) uma protease tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 6 em combinação com uma amilase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1; (v) uma protease tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 6 em combinação com uma amilase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2; (vi) uma protease tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 6 em combinação com uma amilase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3; (vii) a lipase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 269 da SEQ ID NO: 8 em combinação com uma amilase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1; (viii) a lipase tendo pelo menos 50% de identidade

com os aminoácidos 1 a 269 da SEQ ID NO: 8 em combinação com uma amilase tendo pelo menos 50% de identidade com a SEQ ID NO: 2; (ix) a lipase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 269 da SEQ ID NO: 8 em combinação com uma amilase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3; (x) uma protease tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 274 da SEQ ID NO: 5 em combinação com uma amilase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1 e uma lipase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 269 da SEQ ID NO: 8; (xi) uma protease tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 274 da SEQ ID NO: 5 em combinação com uma amilase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2 e uma lipase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 269 da SEQ ID NO: 8; (xii) uma protease tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 274 da SEQ ID NO: 5 em combinação com uma amilase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3 e uma lipase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 269 da SEQ ID NO: 8); (xiii) uma protease tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 6 em combinação com uma amilase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1 e uma lipase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 269 da SEQ ID NO: 8; (xiv) uma protease tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 6 em combinação com uma amilase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2 e uma lipase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 269 da SEQ ID NO: 8; (xv) uma protease tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 6 em combinação com uma amilase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3 e uma lipase tendo

pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 269 da SEQ ID NO: 8; (xvi) uma protease tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 7 em combinação com uma amilase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1; (xvii) uma protease tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 7 em combinação com uma amilase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2; (xviii) uma protease tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 7 em combinação com uma amilase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3; (xix) uma protease tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 7 em combinação com uma amilase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1 e uma lipase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 269 da SEQ ID NO: 8; (xx) uma protease tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 7 em combinação com uma amilase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2 e uma lipase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 269 da SEQ ID NO: 8; e (xi) uma protease tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 7 em combinação com uma amilase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3 e uma lipase tendo pelo menos 50% de identidade com os aminoácidos 1 a 269 da SEQ ID NO: 8. Nas modalidades preferidas de (i) a (xi), cada grau de identidade é, independentemente, pelo menos 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou pelo menos 99%. Conseqüentemente, uma modalidade da

invenção diz respeito a uma amilase em combinação com uma lipase e/ou uma protease de acordo com as reivindicações 4 ou 5, em que (i) a amilase é uma amilase como definido neste relatório; (ii) a lipase tem pelo menos 70% de identidade com uma lipase tendo os aminoácidos 1 a 269 da SEQ ID NO: 8; (ii) a protease tem pelo menos 70% de identidade com uma protease selecionada do grupo consistindo em a) uma protease tendo os aminoácidos 1 a 274 da SEQ ID NO: 5, b) uma protease tendo os aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 6, e c) uma protease tendo os aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 7.

10 Geralmente, as enzimas amilase, protease e lipase [daqui por diante “a(s) enzima(s)”] da invenção podem ser enzimas naturais ou do tipo selvagem obtidas de animais, em particular de mamíferos, por exemplo enzimas de seres humanos ou de suínos; de plantas ou de microorganismos, mas também quaisquer de seus mutantes, variantes, fragmentos etc. que
15 apresentem a atividade enzimática desejada, bem como as enzimas sintéticas, tais como as enzimas embaralhadas, híbridas ou quiméricas, e as enzimas de consenso.

Em uma forma de realização específica, a(s) enzima(s) é(são) variante(s) alergênica(s) fraca(s), que se destina(m) a invocar uma resposta
20 imunológica reduzida quando exposta a animais, incluindo o homem. A expressão resposta imunológica deve ser entendida como qualquer reação pelo sistema imune de um animal exposto à(s) enzima(s). Um tipo de resposta imunológica é uma resposta alérgica que leve a níveis aumentados de IgE no animal exposto. As variantes alergênicas fracas podem ser preparadas com o
25 uso de técnicas conhecidas na prática. Por exemplo a(s) enzima(s) pode(m) ser conjugadas com componentes poliméricos protegendo porções ou epítopos da(s) enzima(s) envolvidas em uma resposta imunológica. A conjugação com polímeros pode envolver acoplamento químico *in vitro* do polímero na(s) enzima(s), por exemplo como descrito nas WO 96/17929, WO 98/30682, WO

98/35026 e/ou WO 99/00489. A conjugação pode, além disso ou
alternativamente a isso, envolver acoplamento *in vivo* dos polímeros à(s)
enzima(s). Tal conjugação pode ser obtida por engenharia genética da
seqüência de nucleotídeos que codifica a(s) enzima(s), introduzindo
5 seqüências de consenso codificando sítios de glicosilação adicionais na(s)
enzima(s) e expressando a(s) enzima(s) em um hospedeiro capaz de glicosilar
a(s) enzima(s); ver, por exemplo, a WO 00/26354. Outro meio de prover
variantes alergênicas fracas é a engenharia genética da seqüência de
nucleotídeos codificando a(s) enzima(s) de modo a fazer com que as enzimas
10 se auto-oligomerizem, fazendo com que os monômeros enzimáticos possam
proteger os epítomos de outros monômeros enzimáticos e por esse meio
reduzindo a antigenicidade dos oligômeros. Tais produtos e sua preparação
são descritos, por exemplo, na WO 96/16177. Os epítomos envolvidos em uma
reposta imunológica podem ser identificados por vários métodos, tais como o
15 método de apresentação de fago descrito nas WO 00/26230 e WO 01/83559,
ou a abordagem aleatória descrita na EP 561907. Uma vez um epítomo tenha
sido identificado, sua seqüência de aminoácidos pode ser alterada para
produzir propriedades imunológicas alteradas da(s) enzima(s) mediante
técnicas conhecidas de manipulação de genes, tais como a mutagênese
20 dirigida ao sítio (ver, por exemplo, as WO 00/26230, WO 00/26354 e/ou WO
00/22103) e/ou a conjugação de um polímero pode ser feita em proximidade
suficiente ao epítomo para o polímero proteger o epítomo.

Nas formas de realização particulares, a(s) enzima(s) é(são) (i)
estável(is) em pH 2 a 8, preferivelmente também em pH 3 a 7, mais preferível
25 em pH 4 a 6; (ii) ativa(s) em pH 4 a 9, preferivelmente 4a 8; (iii) estável(is)
contra a degradação pela pepsina e outras proteases digestivas (tais como as
proteases pancreáticas, isto é, principalmente, a tripsina e a quimotripsina);
e/ou (iv) estável(is) e/ou ativa(s) na presença de sais biliares.

Em uma forma de realização preferida, a amilase da invenção

tem uma atividade em pH 7,0 e 37°C de pelo menos 35% em relação à atividade no pH ótimo e 37°C. Mais preferível, a atividade em pH 7,0 e 37°C é de pelo menos 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 ou pelo menos 75% da atividade no pH ótimo e 37°C (conforme Tabela 2 do Exemplo 3).

5 Em outra forma de realização preferida, a amilase da invenção tem uma atividade em pH 7,0 e 37°C e na presença de sais biliares a 5 mM de pelo menos 25% em relação à atividade no pH ótimo e a 37°C na ausência dos sais biliares. Mais preferivelmente, a atividade em pH 7,0 e 37°C e na presença de sais biliares a 5 mM é de pelo menos 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 ou
10 pelo menos 65% da atividade no pH ótimo e a 37°C na ausência dos sais biliares (conforme Tabela 3 do Exemplo 3).

 Em ainda outra forma de realização preferida, a atividade específica da amilase da invenção, em pH de 7,0 e a 37°C, é de pelo menos 10%, mais preferível de pelo menos 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65,
15 ou de pelo menos 70%, em relação à atividade específica da amilase da SEQ ID NO: 1 em pH de 5,0 e a 37°C (conforme Tabela 4 do Exemplo 3).

 Em outra forma de realização preferida, a atividade específica da amilase da invenção, em pH 7,0 e a 37°C, e na presença de sais biliares a 5 mM, é de pelo menos 10%, mais preferível de pelo menos 15, 20, 25, 30, 35,
20 40, 45, 50, 55, 60, 65 ou de pelo menos 70%, em relação à atividade específica da amilase da SEQ ID NO: 1 em pH 5,0 e a 37°C, e na presença de sais biliares a 5 mM (conforme Tabela 5 do Exemplo 3).

 As atividades referidas nas formas de realização preferidas acima podem adequadamente ser determinadas com o uso de um ensaio de
25 açúcar redutor, por exemplo como descrito no Exemplo 3, usando-se preferivelmente milho ceroso como um substrato. Um procedimento detalhado é descrito no Exemplo 3.

 Em uma outra forma de realização particular, independente, a amilase da invenção tem um perfil de degradação do amido com um ou mais

dos seguintes aspectos característicos: (i) DP1 é detectado como um produto de degradação; (ii) a quantidade de DP4 é menor do que a quantidade de DEP5; (iii) a quantidade de DP4 é menor do que a quantidade de DP6; e/ou (iv) a quantidade de DP5 e/ou de DP6 é mais elevada do que a quantidade de DP1. O DP1 monomérico é preferivelmente glicose, e os produtos DP2 a DP6 são dímeros-hexâmeros, respectivamente, de glicose.

O perfil de degradação pode ser determinado com o uso da HPLC como descrito no Exemplo 4, isto é, após ter sido incubado por 24 horas em uma temperatura de 60 ou 37°C, em um pH de 6,0 ou 5,5, preferivelmente com o uso de milho ceroso como um substrato, mais preferível na presença de Ca^{2+} .

A expressão “em combinação com” refere-se ao uso combinado, de acordo com a invenção, da protease, lipase e/ou amilase. O uso combinado pode ser simultâneo, de sobreposição ou seqüencial, estes três termos sendo geralmente interpretados à luz da prescrição feita pelo médico.

O termo “simultâneo” refere-se a circunstâncias sob as quais as enzimas ficam ativas ao mesmo tempo, por exemplo quando elas são administradas ao mesmo tempo como um ou mais produtos farmacêuticos separados, ou se eles forem administrados em uma e a mesma composição farmacêutica.

O termo “seqüencial” refere-se a casos tais em que uma e/ou duas das enzimas estejam atuando primeiro, e a segunda e/ou terceira enzimas subsequente. Uma ação seqüencial pode ser obtida pela administração das enzimas em questão como formulações farmacêuticas separadas em intervalos desejados, ou como uma composição farmacêutica em que as enzimas em questão sejam diferentemente formuladas (compartimentalizadas), por exemplo com vistas a obter-se um diferente tempo de liberação, prover-se uma estabilidade melhorada do produto, ou otimizar-se a dosagem das enzimas.

O termo “sobreposição” refere-se aos casos em que os períodos de atividade das enzimas não sejam nem completamente simultâneos nem completamente seqüenciais, isto é, exista um certo período em que as enzimas sejam ambas, ou todas, ativas.

5 O termo “uma”, por exemplo quando usado no contexto da(s) enzima(s) da invenção, significa pelo menos uma. Em formas de realização particulares,”uma” significa “uma ou mais” ou “pelo menos uma” o que novamente significa uma, duas, três, quatro, cinco etc.

10 A afinidade entre duas seqüências de aminoácidos é descrita pelo parâmetro “identidade”.

Para os fins da presente invenção, o alinhamento de duas seqüências de aminoácidos é determinado pelo uso do programa Needle do pacote EMBOSS (<http://emboss.org>) versão 2.8.0. O programa Needle executa o algoritmo de alinhamento global descrito em Needleman, S. B. e
15 Wunsch, C. D. (1970) *J. Mol. Biol.* 48, 443-453. A matriz de substituição usada é BLOSUM62, a penalidade de abertura de descontinuidade é 10, e a penalidade da extensão da abertura é 0,5.

O grau de identidade entre uma seqüência de aminoácidos da presente invenção (“seqüência da invenção”; por exemplo, aminoácidos 1 a
20 481 da SEQ ID NO: 1) e uma seqüência diferente de aminoácidos (“seqüência estranha”, por exemplo os aminoácidos 1 a 514 da SEQ ID NO: 12) é calculado como o número de combinações exatas em um alinhamento das duas seqüências, dividido pelo comprimento da “seqüência da invenção” ou pelo comprimento da “seqüência estranha”, qualquer que seja a mais curta. O
25 resultado é expresso em percentual de identidade.

Uma combinação exata ocorre quanto a “seqüência da invenção” e a “seqüência estranha” tenha resíduos de aminoácido idênticos nas mesmas posições da sobreposição (no exemplo de alinhamento abaixo, isto é representado por “|”). O comprimento de uma seqüência é o número de

resíduos de aminoácidos na seqüência (por exemplo, o comprimento da SEQ ID NO: 1 é 481).

No exemplo alinhamento abaixo, puramente hipotético, a sobreposição é a seqüência de aminoácidos “HTWGER-NL” da Seqüência 1; ou a seqüência de aminoácidos “HGWGEDANL” da Seqüência 2. No exemplo, uma descontinuidade é indicada por um “-“.

Exemplo de alinhamento hipotético:

Seqüência 1: ACMSHTWGER-NL

| | | | |

10 Seqüência 2: HGWGEDANLAMNPS

Conseqüentemente, o percentual de identidade da Seqüência 1 à Seqüência 2 é $6/12=0,5$, correspondente a 50%.

Em uma forma de realização particular, o percentual de identidade de uma seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo com, ou aos, aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1 é determinado por i) alinhar as duas seqüências de aminoácidos usando o programa Needle, com a matriz de substituição BLOSUM62, uma penalidade de abertura de descontinuidade de 10, e uma penalidade de extensão da abertura de 0,5; ii) contar o número de combinações exatas no alinhamento; iii) dividir o número de combinações exatas pelo comprimento da mais curta das duas seqüências de aminoácidos, e iv) converter o resultado da divisão de iii) em percentual. O percentual de identidade a, ou com, outras seqüências da invenção tais como os aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2, ou 1 a 483 da SEQ ID NO: 3, é calculado de uma maneira análoga.

25 Na alternativa, o grau de identidade entre duas seqüências de aminoácidos pode ser determinado pelo programa “align”, que é um alinhamento de Needleman-Wunsch (isto é, um alinhamento global). As seqüências são alinhadas pelo programa usando a matriz de classificação básica BLOSUM50. A penalidade para o primeiro resíduo de uma

descontinuidade é 12, e para outros resíduos de uma descontinuidade as penalidades são 2. O algoritmo de Needleman-Wunsch é descrito em Needleman, S. B. e Wunsch, C. D., (1970), *Journal of Molecular Biology*, 48: 443-453, e o programa align, em Myers e W. Miller em “*Optimal Alignments in Linear Space*” CABIOS (aplicações de computador nas biociências) (1988) 4: 11 a 17. O “Align” faz parte do pacote FASTA versão v20u6 (ver W. R. Pearson e D. J. Lipman (1988), “*Improved Tools for Biological Sequence Analysis*”, *PNAS* 85: 2444-2448, e W. R. Pearson (1990) “*Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA*,” *Methods in Enzymology* 183: 63-98).

O grau de identidade entre uma amostra, ou teste, seqüência de qual(is)quer da(s) enzima(s) da invenção e uma seqüência especificada, pode ser determinado como segue: As duas seqüências são alinhadas com o uso do programa “align”. O número de combinações perfeitas (“N-combinação-perfeita”) no alinhamento é determinado (uma combinação perfeita significa o mesmo resíduo de aminoácido na mesma posição do alinhamento). A extensão comum das duas seqüências alinhadas é também determinada, isto é, o número total de aminoácidos no alinhamento (a sobreposição), incluindo as descontinuidades de fuga e conducentes criadas pelo alinhamento, caso haja (“sobreposição-N”). O grau de identidade é calculado como a relação entre “N-combinação-perfeita” e “sobreposição-N” (para a conversão ao percentual de identidade, multiplicar por 100).

Em uma forma de realização alternativa, o grau de identidade entre a amostra, ou teste, a seqüência e uma seqüência especificada podem ser determinadas como segue: As seqüências são alinhadas com o uso do programa “align”. O número de combinações perfeitas (“N-combinação-perfeita”) no alinhamento é determinado (uma combinação perfeita significa o mesmo resíduo de aminoácido na mesma posição do alinhamento). A extensão da seqüência de amostra (o número de resíduos de aminoácidos) é

determinada (“N-amostra”). O grau de identidade é calculado como a relação entre “N-combinação-perfeita” e “N-amostra” (para a conversão ao percentual de identidade, multiplicar por 100).

Em outra forma de realização alternativa, o grau de identidade entre a amostra, ou teste, a sequência e uma sequência especificada pode ser determinado como segue: As sequências são alinhadas com o uso do programa “align”. O número de combinações perfeitas (“N-combinação-perfeita”) no alinhamento é determinado (uma combinação perfeita significa o mesmo resíduo de aminoácido na mesma posição do alinhamento). A extensão da sequência especificada (o número de resíduos de aminoácidos) é determinado (“N-especificado”). O grau de identidade é calculado como a relação entre “N-combinação-perfeita” e “N-especificado” (para a conversão à identidade percentual, multiplicar por 100).

Preferivelmente, a sobreposição é de pelo menos 20% da sequência especificada [“sobreposição-N” como definido acima, dividida pelo número dos aminoácidos na sequência especificada (“N-especificado”), e multiplicada por 100], mais preferível pelo menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou pelo menos 95%. Isto significa que pelo menos 20% (preferivelmente de 25 a 95%) dos aminoácidos da sequência especificada acabam sendo incluídos na sobreposição, quando a sequência de amostra seja alinhada com a sequência especificada.

Na alternativa, a sobreposição é pelo menos 20% da sequência especificada (“sobreposição-N” como definido acima, dividida pela “N-amostra” como definido acima, e multiplicado por 100), mais preferível pelo menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou pelo menos 95%. Isto significa que pelo menos 20% (preferivelmente 25 a 95%) dos aminoácidos da sequência de amostra acabam sendo incluídas na sobreposição, quando alinhadas em relação à sequência

especificada.

A atividade da(s) enzima(s) da invenção pode ser medida com o uso de qualquer ensaio adequado. Geralmente, o pH do ensaio e a temperatura do ensaio podem ser adaptados à enzima em questão. Exemplos de valores de pH do ensaio são os pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12. Exemplos de temperaturas do ensaio são 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90 ou 95°C. Valores preferidos do pH e temperaturas acham-se na faixa fisiológica, tais como os valores de pH de 4, 5, 6, 7 ou 8, e as temperaturas de 30, 35, 37 ou 40°C.

Ensaaios adequados acham-se descritos na parte experimental, e nos pedidos de patentes DK nº 2005 00929 e 2005 00930 bem como nos pedidos PCT correspondentes.

Outros exemplos são os ensaios da Ph.Eur. quanto à atividade de protease, da lipase e da amilase.

MEDICAMENTO

No presente contexto, o termo “medicamento” significa um composto, ou mistura de compostos, que trata, previne e/ou alivia os sintomas da doença, preferivelmente trata e/ou alivia. O medicamento pode ser prescrito por um médico, ou pode ser um produto vendido livremente ao público.

COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

O isolamento, a purificação e a concentração da(s) enzima(s) da invenção podem ser realizadas por meios convencionais. Por exemplo, elas podem ser recuperadas de um caldo de fermentação por procedimentos convencionais, incluindo, porém sem limitar, a centrifugação, a filtração, a extração, a secagem por pulverização, a evaporação ou a precipitação, e ainda purificadas por uma variedade de procedimentos conhecidos na técnica, incluindo, sem limitar, a cromatografia (por exemplo, troca de íons, afinidade, hidrofóbica, cromatofocalização e exclusão de tamanho), procedimentos

eletroforéticos (por exemplo, a focalização isoeétrica preparativa), solubilidade diferencial (por exemplo, precipitação de sulfato de amônio), SDS-PAGE, ou extração (ver, por exemplo, *Protein Purification*, J.-C. Janson e Lars Ryden, editores, VCH Publishers, New York, 1989).

5 Por exemplo, o DNA codificando a amilase da invenção (tal como as SEQ ID NOs: 13 a 16 codificando as SEQ ID NOs: 1 a 4, respectivamente) pode ser recombinantemente expresso em uma célula hospedeira de *Bacillus* como é conhecido na técnica, e purificado do líquido de fermentação pelas etapas do processo como a centrifugação, a
10 ultrafiltração e, se desejável, a germe-filtração. As etapas do processo adicionais, opcionais, incluem várias espécies de cromatografia como, por exemplo, a cromatografia de troca de íons e a cromatografia de interação hidrofóbica. Um material de coluna hidrofóbica adequado é a butila ou a fenila, e tais colunas acham-se comercialmente disponíveis, por exemplo, da
15 Pharmacia. Os pI das amilases de SEQ ID NOs: 1, 2 e 3 são de 5,7, 7,3 e 8,8, respectivamente, e os pesos moleculares de aproximadamente 55 kDa por SDS-PAGE quanto a todas as três amilases.

 Em uma forma de realização particular, as preparações sólidas ou líquidas concentradas de cada uma da(s) enzima(s) são preparadas
20 separadamente. Estes concentrados podem também, pelo menos em parte, ser separadamente formulados, como explanado em mais detalhes abaixo.

 Em uma outra forma de realização particular, a(s) enzima(s) são incorporadas nas composições farmacêuticas da invenção na forma de concentrados sólidos. A(s) enzima(s) podem ser colocadas no estado sólido
25 por vários métodos, como é conhecido na técnica. Por exemplo, o estado sólido pode ser ou cristalino, em que as moléculas enzimáticas são dispostas em uma forma altamente ordenada, ou um precipitado, em que as moléculas enzimáticas são dispostas em uma forma menos ordenada, ou em uma forma desordenada.

A cristalização pode, por exemplo, ser realizada em um pH perto do pI da(s) enzima(s) e em baixa condutividade, por exemplo de 10 mS/cm ou menos, como descrito na EP 691982.

Vários métodos de precipitação são conhecidos na técnica, incluindo a precipitação com sais, tais como o sulfato de amônio e/ou o sulfato de sódio; com solventes orgânicos, tais como o etanol e/ou o isopropanol; ou com polímeros, tais como o PEG (Polietileno Glicol). Na alternativa, a(s) enzima(s) pode(m) ser precipitadas de uma solução pela remoção do solvente (tipicamente água) por vários métodos conhecidos na técnica, por exemplo a liofilização, a evaporação (por exemplo em pressão reduzida) e/ou a secagem por pulverização.

Em uma outra forma de realização particular, o concentrado sólido da(s) enzima(s) tem um conteúdo de proteína de enzima ativa de pelo menos 50% (p/p) com referência ao conteúdo de proteína total do concentrado sólido. Em ainda outras formas de realização particulares, o conteúdo de proteína de enzima ativa, em relação ao conteúdo de proteína total do concentrado sólido, é de pelo menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 ou de pelo menos 95% (p/p). O conteúdo de proteína pode ser medido como é conhecido na técnica, por exemplo por varredura de densitômetro, dos géis de SDS-PAGE coloridos de coomassie, por exemplo com o uso de um densitômetro calibrado GS-800 da BIO-RAD; mediante o uso de um kit comercial, tal como o Protein Assay ESL, número de ordem 1767003, que é comercialmente disponível da Rocha, ou com base no método descrito no Exemplo 8 da WO 01/58276.

Preferivelmente, a proteína da enzima amilase constitui pelo menos 50%, mais preferível pelo menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96 ou pelo menos 97% do espectro protéico do concentrado de lipase sólido para uso de acordo com a invenção, conforme medido por varredura de densitômetro de um gel de SDS-PAGE colorido com coomassie.

Uma composição farmacêutica da invenção compreende a(s) enzima(s), preferivelmente na forma de preparações enzimáticas concentradas, mais preferível concentrações sólidas, juntamente com pelo menos um auxiliar farmaceuticamente aceitável, ou subsidiário, material tal como (i) pelo menos um portador e/ou excipiente; ou (ii) pelo menos um portador, excipiente, diluente e/ou adjuvante. Exemplos não limitativos de outros ingredientes opcionais, todos farmaceuticamente aceitáveis, são os desintegradores, lubrificantes, agentes de tamponamento, agentes umectantes, preservativos, agentes aromatizantes, solventes, agentes solubilizantes, agentes de suspensão, emulsificantes, estabilizadores, propulsores, e veículos.

Geralmente, dependendo, *inter alia*, da indicação médica em questão, a composição da invenção pode ser planejada para todos os modos de administração conhecidos na técnica, preferivelmente incluindo a administração enteral (através do canal alimentar). Assim, a composição pode estar na forma sólida, na semi-sólida, na líquida ou na gasosa, tal como em tabletes, cápsulas, pós, grânulos, microsferas, ungüentos, cremes, espumas, soluções, supositórios, injeções, inalantes, géis, microsferas, loções e aerossóis. O médico saberá selecionar a via de administração mais adequada e, naturalmente, evitar vias de administração potencialmente perigosas ou de outra forma desvantajosas.

Os métodos e materiais auxiliares seguintes são, portanto, também meramente exemplares e não são, de forma alguma, limitativos.

Para as preparações orais sólidas, a(s) enzima(s) podem ser usadas sozinhas ou em combinação com aditivos apropriados para produzir pelotas, micropelotas, tabletes, microtabletes, pós, grânulos ou cápsulas, por exemplo com portadores convencionais, tais como lactose, manitol, amido de milho ou fécula de batata; com excipientes ou aglutinantes, tais como os derivados de celulose, de celulose cristalina ou microcristalina, acácia, amido de milho, ou gelatinas; com desintegradores, tais como o amido de milho, a

fécula de batata ou a carboximetilcelulose sódica; com lubrificantes, tais como a cera de carnaúba, a cera branca, goma laca, sílica coloidal sem água, polietileno glicol (PEGs, também conhecidos pelo termo macrogol) de 1500 a 20000, em particular PEG 4000, PEG 6000, PEG 8000, povidona, talco, 5 monoleína ou estearato de magnésio; e, se desejável, com diluentes, adjuvantes, agentes de tamponamento, agentes umectantes, preservativos tais como o metilparaídroxibenzoato (E218), agentes colorantes tais como o dióxido de titânio (E171) e agentes aromatizantes tais como a sacarose, a sacarina, o óleo de laranja, o óleo de limão, e a vanilina. As preparações orais 10 são exemplos de preparações preferidas para o tratamento da indicação médica de PEI.

A(s) enzima(s) também podem, bem em geral, ser formuladas em preparações orais líquidas, mediante sua dissolução, suspensão ou emulsificação em um solvente aquoso, tal como água, ou em solventes não 15 aquosos, tais como óleos vegetais ou outros óleos semelhantes, glicerídeos de ácido alifático sintético, ésteres de ácidos alifáticos superiores, propileno glicol, polietileno glicol tal como o PEG 4000, ou álcoois inferiores tais como os álcoois C₁-C₄ lineares ou ramificados, por exemplo o 2-propanol; e, se desejável, com materiais subsidiários convencionais ou aditivos tais como 20 solubilizantes, adjuvantes, diluentes, agentes isotônicos, agentes de suspensão, agentes emulsificadores, estabilizantes e preservativos.

Além disso, a(s) enzima(s) podem geralmente ser produzidas em supositórios para administração retal, mediante a mistura com uma 25 variedade de bases tais como as bases emulsificantes ou as bases solúveis em água. O supositório pode incluir veículos tais como a manteiga de cacau, as carboceras e os polietileno glicóis, os quais se fundem na temperatura do corpo, e são também solidificados na temperatura ambiente.

O uso de lipossomas como um veículo de liberação é outro método de possível interesse geral. Os lipídeos podem ser qualquer

combinação útil de lipídeos formadores dos lipossomas, incluindo os lipídeos catiônicos ou zwitteriônicos, tais como a fosfatidilcolina. O lipídeo remanescente normalmente será de lipídeos neutros ou ácidos, tais como o colesterol, a fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e outros. Para preparar os lipossomas, o procedimento descrito por Kato *et al.* (1991) *J. Biol. Chem.* 266: 3361 pode ser usado.

As formas de dosagem unitária para administração oral ou retal, tais como xaropes, elixires, pós e suspensões, podem ser fornecidas, em que cada unidade de dosagem, por exemplo a quantidade de uma colher de chá, a quantidade de uma colher de sopa, cápsula, tablete ou supositório, contenha uma quantidade predeterminada da(s) enzima(s). De forma semelhante, as formas de dosagem unitária para injeção ou administração intravenosa, podem compreender a(s) enzima(s) em uma composição como uma solução em água estéril, solução salina normal, ou outro portador farmacêuticamente aceitável.

A expressão “forma de dosagem unitária”, como aqui usada, refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para indivíduos humanos e animais, cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de enzima(s) em um montante suficiente para produzir o efeito desejado.

Em uma forma de realização particular, a composição farmacêutica da invenção é para administração entérica, preferivelmente oral.

Em outras formas de realização particulares, a composição oral é (i) uma composição líquida contendo cristais da(s) enzima(s); (ii) uma suspensão líquida de sedimentos de enzima(s) (altamente) purificada(s); (iii) um gel contendo a(s) enzima(s) na forma sólida ou solubilizada; (iv) uma suspensão líquida de enzima(s) imobilizada(s) ou de enzimas adsorvidas nas partículas e outros; ou (v) uma composição sólida na forma de pó, pelotas, grânulos ou microsferas contendo a(s) enzima(s), se desejável na forma de

tabletes, cápsulas, ou coisa parecida, que sejam opcionalmente revestidas, por exemplo com um revestimento estável em ácido.

Em outra modalidade particular da composição, a(s) enzima(s) é(são) compartimentalizadas, isto é, separadas umas das outras, por exemplo por meio de revestimentos separados.

Em ainda uma outra modalidade particular da composição, a protease é separada dos outros componentes enzimáticos da composição, tais como a lipase e/ou a amilase.

A dosagem da(s) enzima(s) variará amplamente, dependendo da(s) enzima(s) específica(s) a ser(em) administrada(s), da frequência de administração, da maneira de administração, da severidade dos sintomas, e da suscetibilidade do paciente aos efeitos colaterais, etc. Algumas das enzimas específicas podem ser mais potentes do que outras.

Exemplos de preparações orais sólidas da(s) enzima(s) da invenção compreendem: (i) uma amilase de pelo menos 50% de identidade aos (i) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1, (ii) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2, e/ou (iii) aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3; (ii) uma protease tendo pelo menos 70% de identidade com uma protease selecionada do grupo consistindo de a) uma protease tendo os aminoácidos 1 a 274 da SEQ ID NO: 5, b) uma protease tendo os aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 6, e c) uma protease tendo os aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 7; e/ou (iii) uma lipase tendo pelo menos 70% de identidade a uma lipase tendo os aminoácidos 1 a 269 da SEQ ID NO: 8; em que, preferivelmente, as dosagens clínicas diárias previstas das enzimas de (i), (ii) e (iii) são como segue (todas em mg de proteína enzimática por kg de peso corporal): para a amilase de (i): 0,001 a 250, 0,005 a 100, 0,01 a 50, ou 0,05 a 10 mg/kg de peso corporal; para uma protease de (ii): 0,005 a 500, 0,01 a 250, 0,05 a 100, ou 0,1 a 50 mg/kg de peso corporal; para a lipase de (iii): 0,01 a 1000, 0,05 a 500, 0,1 a 250, ou 0,5 a 100 mg/kg de peso corporal.

Um exemplo preferido de preparações orais sólidas da(s) enzima(s) da invenção compreende: (i) uma amilase compreendendo os aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1, (ii) uma protease compreendendo os aminoácidos 1 a 274 da SEQ ID NO: 5, e/ou (iii) uma lipase compreendendo os aminoácidos 2 a 269 da SEQ ID NO: 8.

Exemplos de dosagens clínicas diárias previstas das enzimas de (i), (ii) e (iii) são como a seguir (todas em miligramas de proteína por quilograma de peso corporal: Para a amilase de (i): 0,01 a 50, 0,05 a 10, ou 0,1 a 5 mg/kg de peso corporal; para a protease de (ii): 0,05 a 100, 0,1 a 50, ou 0,5 a 25 mg/kg de peso corporal; para a lipase de (iii): 0,1 a 250, 0,5 a 100, ou 1 a 50 mg/kg de peso corporal.

As ligações de amida (peptídeo), bem como os terminos amino e carbóxi, podem ser modificados para maior estabilidade na administração oral. Por exemplo, o termino carbóxi pode ser amidado.

Modalidades particulares das composições farmacêuticas da invenção, adequadas para o tratamento de distúrbios digestivos, PEI, pancreatite, fibrose cística, diabetes tipo I e/ou diabetes tipo II, podem ser preparadas pela incorporação da(s) enzima(s) da invenção nas pelotas. As pelotas podem geralmente compreender de 10 a 90% (p/p, em relação ao peso seco das pelotas resultantes) de um polímero orgânico fisiologicamente aceitável, de 10 a 90% (p/p, em relação ao peso seco das pelotas resultantes) de celulose ou de um derivado de celulose, e de 80 a 20% (p/p em relação ao peso seco das pelotas resultantes) da(s) enzima(s), a quantidade total do polímero orgânico, celulose ou derivado de celulose, e enzima(s) perfazendo até 100% em cada caso.

O polímero orgânico fisiologicamente aceitável pode ser selecionado do grupo consistindo de polietileno glicol 1500, polietileno glicol 2000, polietileno glicol 3000, polietileno glicol 4000, polietileno glicol 6000, polietileno glicol 8000, polietileno glicol 10000, polietileno glicol 20000,

hidroxipropil metilcelulose, polioxietileno, copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno, e misturas dos referidos polímeros orgânicos. O polietileno glicol 4000 é o preferido como polímero orgânico fisiologicamente aceitável.

A celulose ou um derivado de celulose podem, por exemplo, ser selecionados de celulose, acetato de celulose, éster de ácido graxo de celulose, nitratos de celulose, éter de celulose, carboximetilcelulose, etilcelulose, hidroxietilcelulose, hidroxipropilcelulose, metilcelulose, metiletilcelulose e metilhidroxipropilcelulose. A celulose, em particular a celulose microcristalina, é preferida como celulose ou derivado de celulose.

As pelotas resultantes podem ser revestidas com um revestimento entérico adequado, outros revestimentos não funcionais, ou podem ser usadas diretamente sem tal revestimento. Além disso, as pelotas resultantes podem ser colocadas em cápsulas como as cápsulas de gelatina dura ou as cápsulas livres de gelatina de um tamanho adequado para a terapia de um distúrbio ou doença conforme descrito em maiores detalhes acima. Em uma forma de realização da invenção, as pelotas produzidas de diferentes tipos de enzima, em particular de lipase, protease e/ou amilase, podem ser colocadas nas referidas cápsulas. Embora enchendo-se as cápsulas com os diferentes tipos de enzimas, a dosagem de um tipo único de enzima (a saber, lipase, protease ou amilase) pode ser adaptada às necessidades específicas de um certo grupo de indicação ou de um certo subgrupo de pacientes mediante a adição de uma quantidade especificada de qualquer dentre a lipase, a protease e/ou a amilase às cápsulas, isto é, podem ser produzidas cápsulas que variem em suas relações específicas de lipase:protease:amilase.

Composições farmacêuticas preferidas da lipase da invenção são descritas na WO 2005/092370, em particular nas formulações compreendendo os excipientes preferidos nela mencionados. Em uma forma de realização particularmente preferida, a composição farmacêutica compreende uma mistura macrogolglicerídica de mono-, di- e tri-

acilglicerídeos e polietileno glicol (PEG), mono- e di-ésteres de ácidos carboxílicos C_6 - C_{22} alifáticos, e também possivelmente pequenas proporções de glicerol e polietileno glicol livre.

O polietileno glicol (PEG) contido nas misturas
5 macrogolglicerídicas é preferivelmente PEG que tenha em média 6 a no máximo 40 unidades de óxido de etileno por molécula ou um peso molecular entre 200 e 2000.

Um outro aspecto da invenção leva em conta a composição farmacêutica da(s) enzima(s) da invenção para compreender um sistema
10 consistindo de tensoativo, co-tensoativo e fase lipofílica, o sistema tendo um valor de HLB (Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico) maior ou igual a 10 e um ponto de fusão maior ou igual a 20°C . Em uma forma de realização preferida, o sistema tem um valor de HLB de 10 a 16, preferivelmente de 12 a 15, e tem um ponto de fusão entre 30 e 600°C , preferivelmente entre 40 e 500°C . Em
15 particular, o sistema caracterizado pelo valor de HLB e pelo ponto de fusão é uma mistura de mono-, di- e triacilglicerídeos e mono- e diésteres de polietileno glicol (PEG) com ácidos carboxílicos alifáticos com 8 a 20, preferivelmente 8 a 18, átomos de carbono, por meio do que o polietileno glicol preferivelmente tem cerca de 6 a cerca de 32 unidades de óxido de
20 etileno por molécula, e o sistema opcionalmente contém glicerina livre e/ou polietileno glicol livre. O valor de HLB de um tal sistema é preferivelmente regulado pelo comprimento de cadeia do PEG. O ponto de fusão de um tal sistema é regulado pelo comprimento da cadeia dos ácidos graxos, pelo comprimento da cadeia do PEG e pelo grau de saturação das cadeias de ácido
25 graxo, e, conseqüentemente, pelo óleo de partida para a preparação da mistura macrogolglicerídica.

“Ácidos carboxílicos C_8 - C_{18} alifáticos” designa misturas em que o ácido caprílico (C_8), o ácido cáprico (C_{10}), o ácido láurico (C_{12}), o ácido mirístico (C_{14}), o ácido palmítico (C_{16}) e o ácido esteárico (C_{18}) estejam

contidos em uma proporção significativa e variável, se estes ácidos estiverem saturados, e os ácidos carboxílicos C₈-C₁₈ insaturados correspondentes. As proporções destes ácidos graxos podem variar de acordo com os óleos de partida.

5 Uma tal mistura de mono-, di- e triacilglicerídeos e mono- e diésteres de polietileno glicol (PEG) com ácidos carboxílicos alifáticos com 8 a 18 átomos de carbono, pode, por exemplo, ser obtida por uma reação entre um polietileno glicol com um peso molecular entre 200 e 1500, e um óleo de partida, o óleo de partida consistindo em uma mistura de triglicerídeos com
10 ácidos graxos que sejam selecionados do grupo contendo ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oléico e ácido linolênico, individualmente ou como uma mistura. Opcionalmente, o produto de uma tal reação pode também conter pequenas proporções de glicerina e de polietileno glicol livre.

15 Tais misturas acham-se comercialmente disponíveis, por exemplo, sob o nome comercial de Gelucire[®]. Uma forma de realização vantajosa da invenção mostra que os produtos conhecidos sob o nome comercial de Gelucire[®], em particular o “Gelucire[®] 50/13” e/ou o “Gelucire[®] 44/14”, representam misturas adequadas para uso nas preparações
20 farmacêuticas de acordo com a invenção.

 O “Gelucire[®] 50/13 é uma mistura com mono-, di- e triacilglicerídeos e mono- e diésteres de polietileno glicol, com ácido palmítico (C₁₆) e ácido esteárico (C₁₈) em 40% a 50% e 48% a 58%, respectivamente, compondo a proporção principal dos ácidos graxos ligados.
25 A proporção do ácido caprílico (C₈) e ácido cáprico (C₁₀) é menor do que 3% em cada caso, e a proporção de ácido láurico (C₁₂) e ácido mirístico (C₁₄), em cada caso, é menor do que 5%.

 O “Gelucire[®] 44/14 é uma mistura com mono-, di- e triacilglicerídeos e mono- e diésteres de polietileno glicol, as proporções

respectivas de ácido palmítico (C_{16}) sendo de 4 a 25%, de ácido esteárico (C_{18}) em 5% a 35%, de ácido caprílico (C_8) de menos do que 15%, de ácido cáprico (C_{10}) de menos do que 12%, de ácido láurico (C_{12}) de 30 a 50% e de ácido mirístico (C_{14}) de 5 a 25%. O Gelucire® 44/14 pode, por exemplo, ser
5 preparado por uma reação de alcoólise/esterificação com o uso de óleo de semente de palma e polietileno glicol 1500.

Uma forma de realização preferida da presente invenção leva em conta uma composição farmacêutica da(s) enzima(s) da invenção, que compreende um sistema contendo uma mistura de mono-, di- e triacil-
10 glicerídeos com polietileno glicol mono- e diésteres de ácidos carboxílicos C_8 - C_{18} alifáticos e também, possivelmente, pequenas proporções de glicerina e polietileno glicol livre, o sistema tendo um ponto de fusão entre 40°C e 55°C e um valor de HLB na faixa entre 12 e 15. Mais preferível, o sistema tem um ponto de fusão entre 44°C e 50°C e um valor de HLB na faixa de 13
15 a14. Alternativamente, o sistema tem um ponto de fusão ao redor de 44°C e um valor de HLB de 14, ou o sistema tem um ponto de fusão ao redor de 50°C e um valor de HLB de 13.

MÉTODOS DE TRATAMENTO

A amilase da invenção, opcionalmente em combinação com
20 uma lipase e/ou uma protease [a(s) enzima(s) da invenção], é útil no tratamento terapêutico e/ou profilático de várias doenças ou distúrbios em animais. O termo “animal” inclui todos os animais e, em particular, os seres humanos. Exemplos de animais são os não ruminantes e os ruminantes, tais como o carneiro, a cabra e gado, por exemplo o gado de corte, e a vaca. Em
25 uma forma de realização particular, o animal é um animal não ruminante. Os animais não ruminantes incluem os animais monogástricos, por exemplo os porcos (incluindo, porém sem limitar, os leitões, os porcos em desenvolvimento, e porcas); ave doméstica tal como peru, pato e galinha (incluindo, porém sem limitar, os frangos, poedeiras); bezerros jovens,

animais de estimação tais como gato e cão; e peixe (incluindo, porém sem limitar, o salmão, a truta, tilápia, peixe-gato e carpas); e crustáceos (incluindo, porém sem limitar, camarões e pitus). Em uma forma de realização particular, o animal é um mamífero, mais em particular um ser humano.

5 Por exemplo, a(s) enzima(s) é(são) útil(eis) no tratamento dos distúrbios digestivos como a má digestão ou a dispepsia, que são freqüentemente causadas por uma produção e/ou secreção deficientes no trato gastrintestinal de enzimas digestivas normalmente secretadas, *inter alia*, do estômago e do pâncreas.

10 Além disso, a(s) enzima(s) é(são) particularmente útil(eis) no tratamento da PEI. A PEI pode ser verificada com o uso, *inter alia*, do teste de Borgström (JOP. J. Pancreas (Online) 2002; 3(5): 116-125), e pode ser causada por doenças e condições tais como o câncer pancreático, a cirurgia pancreática e/ou gástrica, por exemplo a ressecção total ou parcial do
15 pâncreas, a gastrectomia, a pós-cirurgia de bypass gastrintestinal (por exemplo, a gastroenterostomia de Billroth II); a pancreatite crônica; a Síndrome de Shwachman Diamond; a obstrução dutal do pâncreas ou do canal colédoco (por exemplo do neoplasma); e/ou a fibrose cística (uma doença herdada, em que um muco espesso bloqueia os dutos do pâncreas).
20 A(s) enzima(s) pode(m) também ser útil(eis) no tratamento da pancreatite aguda.

O efeito da(s) enzima(s) sobre os distúrbios digestivos pode ser medido como descrito de uma maneira geral na EP 0600868, na qual o Exemplo 2 descreve um teste de digestibilidade *in vitro* para medir o teste de
25 estabilidade da lipase sob condições gástricas, e o Exemplo 3 descreve um teste de digestibilidade *in vitro* quanto à atividade da lipase na presença dos sais biliares. Testes correspondentes podem ser estabelecidos quanto à protease e à amilase. Igualmente a WO 02/060474 apresenta testes adequados, por exemplo (1) um teste *in vitro* para medir a digestão lipídica em uma

alimentação de teste de suínos, e (2) uma prova *in vivo* com suíno insuficiente quanto ao pâncreas, no qual a digestibilidade da gordura, da proteína e do amido é medida.

5 Em uma forma de realização particular, o efeito da amilase da invenção é medido com o uso do teste de triagem *in vivo* quanto à eficácia da amilase do Exemplo 2.

10 Como outro exemplo, a(s) enzima(s) é(são) útil(eis) no tratamento do diabetes melito tipo I e/ou tipo II, em particular para tratamento adjuvante em uma terapia do diabetes dos distúrbios digestivos que usualmente acompanham esta doença, com vistas a reduzir as complicações posteriores.

15 O efeito sobre o diabetes melito da(s) enzima(s) pode ser determinado por um ou mais dos métodos descritos na WO 00/54799, por exemplo pelo controle do nível de hemoglobina glicosilada, do nível de glicose do sangue, dos ataques hipoglicêmicos, do estado das vitaminas solúveis em gordura, como as vitaminas A, D e E, da dosagem diária requerida de insulina, do índice de peso corporal, e dos períodos hiperglicêmicos.

20 A invenção aqui descrita e reivindicada não deve ser limitada no escopo pelas formas de realização específicas apresentadas neste relatório descritivo, tendo em vista que estas formas de realização são fornecidas como ilustrações dos vários aspectos da invenção. Pretende-se que quaisquer formas de realização equivalentes se situem dentro do escopo desta invenção. De fato, várias modificações da invenção, além daquelas aqui apresentadas e descritas, se tornarão evidentes àqueles habilitados na técnica, a partir da
25 descrição supracitada. Pretende-se também que tais modificações se situem dentro do escopo das reivindicações anexas. No caso de conflito, o presente relatório descritivo, incluindo as definições, procederão ao controle.

Várias referências são citadas neste relatório, cujas descrições ficam incorporadas como referência em suas totalidades.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Ensaaios de enzimas

A atividade da amilase, da protease e da lipase pode ser determinada com o uso dos ensaios da FIP (Fédération Internationale Pharmaceutique), 1 unidade da FIP = 1 unidade da Ph.Eur. (Farmacopéia Européia). Estes ensaios são descritos em: Fédération Internationale Pharmaceutique, Scientific Section: International Commission for the standardisation of pharmaceutical enzymes, a) “*Pharmaceutical Enzymes*,” Editores: R. Ruysen e A. Lauwers, E. Story Scientia, Ghent, Bélgica (1978), b) Farmacopéia Européia. Ver também Deemester *et al.* em Lauwers, A., Scharpé, S. (eds): *Pharmaceutical Enzymes*, New York, Marcel Dekker, 1997, pp. 343-385. Os padrões enzimáticos podem ser procurados da International Commission on Pharmaceutical Enzymes, Centre for Standards, Harelbekestraat 72, B-9000 Ghent.

15 Ensaio da FIP da amilase

A atividade amilolítica da pancreatina foi analisada de acordo com o método publicado na Farmacopéia Européia 5.1 em relação ao padrão da pancreatina fornecido pela FIP. Para a determinação da atividade amilolítica das amilases para uso de acordo com a invenção, o ensaio quanto à atividade amilolítica das amilases microbianas descrito pela FIP foi modificado. Em princípio, o amido é hidrolisado pela amilase em pH 5,8 e em temperatura constante ($37,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$) na presença de cloreto de sódio e cloreto de cálcio. Os grupos redutores resultantes da hidrólise reagem com o iodo na solução alcalina e o excesso de iodo é titulado com tiosulfato. Uma unidade de amilase é definida como a quantidade de enzima que, sob as condições e o substrato definidos, hidrolisa 1 micromol de ligação glicosídica por minuto.

25 Reagentes

Solução do substrato: O substrato é amido solúvel (por exemplo, Merck, nº 101252). O conteúdo de água de cada batelada de amido

solúvel é determinado após a abertura do recipiente. A uma quantidade de amido solúvel equivalente a 10,0 g do substrato seco, adicionar 50 ml de água pura (filtração/troca de íons) e misturar. Adicionar esta suspensão, enquanto em agitação contínua, a 800 ml de água pura em ebulição. Lavar o recipiente por várias vezes com quantidades sucessivas, cada uma de 10 ml, de água pura e adicionar a água de lavagem à solução de amido quente. Aquecer até ebulição sob agitação contínua. Esfriar até temperatura ambiente e diluir até 1000 ml com água pura.

Solução tampão (acetato), pH 5,8 (0,2 mol/litro): Dissolver 12 g de ácido acético, 1 g de cloreto de sódio e 544 mg de cloreto de cálcio em cerca de 800 ml de água. Ajustar o pH a 5,8 com uma solução de hidróxido de sódio (cerca de 10 N). Diluir até 1000 ml.

Ácido acético, CH_3COOH , p.a.

Cloreto de sódio, NaCl , p.a.

Hidróxido de sódio 0,25 N

Ácido clorídrico 1 N

Solução de iodo 0,1 N [por exemplo, Titrisol (Merck 9910), diluído com água pura]

Solução de tiosulfato de sódio 0,1 N

Ácido sulfúrico (p.a.) 20%: a 4 partes em volume de água adicionar 1 parte em volume de ácido sulfúrico a 96% cuidadosamente.

Padrão FIP de referência da amilase fúngica (Batelada nº 2; 55310 FIP-U/g, Condição de 25°C sem cloreto de cálcio).

Suspensão de controle da qualidade (padrão de referência da Amilase Fúngica): Dissolver uma quantidade exatamente pesada do padrão de referência de modo que a solução dê um volume de titulação de tiosulfato, que se situe entre 2 e 4 ml (por exemplo, pesar cerca de 12 a 15 mg do padrão de amilase fúngica e dissolver em 100 ml de solução tampão. A suspensão do controle de qualidade é usada apenas para monitoração dia a dia do sistema de

teste.

Suspensão de teste: Dissolver uma quantidade exatamente pesada da amostra de teste de modo que a solução dê um volume de titulação de tiossulfato, que se situe entre 2 e 4 ml.

5 PROCEDIMENTO

Amostra de teste: Para cada determinação, preparar uma solução de reação contendo 25,0 ml de solução de substrato e 10,0 ml de solução tampão de acetato 0,2 M em um frasco de Erlenmeyer de 300 ml. Tampá-lo com uma rolha de borracha e colocá-lo em um banho de água em
10 uma temperatura constante ($37,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$). Tão logo a mistura de substrato tenha alcançado uma temperatura constante, iniciar a reação pela adição de 2,0 ml da suspensão de teste. Sacudir brevemente e incubar por exatamente 10 minutos a 37°C . Interromper a reação imediatamente pela adição de 4 ml de ácido clorídrico. Enquanto agitando, adicionar 10 ml de solução de iodo a 0,1
15 N, 25 ml de hidróxido de sódio a 0,25 N e, para lavar as paredes, 20 ml de água pura. Deixar a mistura repousar em completa escuridão por 15 minutos. Adicionar 4 ml de ácido sulfúrico e titular a solução com solução de tiossulfato de sódio com o uso de uma microbureta. Calcular a média de duas determinações.

20 Amostra de controle da qualidade: Determinar a atividade da suspensão de controle da qualidade como descrito quanto à amostra de teste em duplicata. Usar 2,0 ml da suspensão de referência.

Valores em branco: Preparar valores em branco do teste e das suspensões de referência. Repetir o procedimento como descrito acima, mas
25 adicionar os 4 ml do ácido clorídrico 1 N antes da adição da solução de teste e de referência.

Calcular a atividade da amilase em Unidades por grama da amostra de teste com o uso da seguinte equação:

$$\frac{(n_U - n_{UB}) \times 5 \times 1.000 \text{ solução de teste [ml]}}{2 \text{ ml} \times \text{amostra pesada [mg]}} = \frac{\text{unidades de amilase}}{[\text{g}] \text{ amostra de teste}}$$

n_U : consumo de tiosulfato de sódio 0,1 N [ml] usado na titulação da suspensão de teste;

n_{UB} : consumo de tiosulfato de sódio 0,1 N [ml] usado na titulação em branco da suspensão de teste;

- 5 A atividade medida da monitoração da amostra (amostra de referência fúngica) é de 97500 U/g, com uma Faixa de Médias de $\pm 3 \times SD$, em particular com uma Faixa de ± 6000 U/g.

AMILASE

Alternativamente, o seguinte ensaio de amilase pode ser usado:

- 10 Substrato: Tabletes Phadebas (Pharmacia Diagnostics; reticulado, insolúvel, polímero de amido colorido de azul, o qual é misturado com albumina de soro bovino e uma substância tampão, e produzido em tabletes).

Temperatura do Ensaio: 37°C

- 15 pH do Ensaio: 4,3 (ou 7,0, se desejável)

Tempo de reação: 20 minutos

Após a suspensão em água, o amido é hidrolisado pela alfa-amilase, dando fragmentos azuis solúveis. A absorbância da solução azul resultante, medida em 620 nm, é uma função da atividade de alfa-amilase.

- 20 Uma Unidade de alfa-Amilase Fúngica (1 FAU) é a quantidade de enzima que decompõe 5,26 g de amido (Merck, Amylum solubile Erg. B. 6, Batelada 9947275) por hora nas condições padrão do ensaio. Uma descrição do ensaio mais detalhada, APTSMYQI-3207, acha-se disponível, mediante solicitação, da Novozymes A/S, Krogshoejvej 36, DK-2880 Bagsvaerd, Dinamarca.

25 LIPASE

Substrato: para-Nitro-Fenil (pNP) Valerato

pH do ensaio: 7,7

Temperatura do Ensaio: 40°C

Tempo de reação: 25 minutos

O produto digerido com cor amarela tem uma absorbância característica em 405 nm. Sua quantidade é determinada por espectrofotometria. Uma unidade de lipase é a quantidade da enzima que libera 1 micromol de ácido butírico titulável por minuto sob as dadas condições do ensaio. Uma descrição mais detalhada do ensaio, AF95/6-GB, acha-se disponível mediante solicitação da Novozymes A/S, Krogshoejvej 36, DK-2880 Bagsvaerd, Dinamarca.

PROTEASE

Substrato: Suc-AAPF-pNA (Sigma® S-7388).

10 Tampão do ensaio: ácido succínico 100 mM, HEPES 100 mM (Sigma H-3375). CHES 100 mM (Sigma C-2885), CABS 100 mM (Sigma C-5580), CaCl₂ 1 mM, KCl 150 mM, 0,01% de Triton® X-100 ajustado a pH 9,0 com HCl ou NaOH.

Temperatura do ensaio: 25°C.

15 Amostra de protease diluída de 300 µl foi misturada com 1,5 ml do tampão de ensaio e a reação de atividade foi iniciada pela adição de 1,5 ml de substrato de pNA (50 mg dissolvidos em 1,0 ml de DMSO e ainda diluídos 45x com 0,01% de Triton® X-100) e, após mistura, o aumento em A₄₀₅ foi monitorado por um espectrofotômetro como uma medição da
20 atividade da protease. As amostras de protease foram diluídas antes da medição da atividade de modo a garantir que todas as medições de atividade caíssem dentro da parte linear da curva de resposta de dose para o ensaio.

Exemplo 2: Teste de triagem *in vivo* quanto à eficácia da amilase

25 As amilases de *Bacillus* purificadas dos aminoácidos 1 a 486 da SEQ ID NO: 1, aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2 e aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3 foram testadas em porquinhos Göttingen (Ellegaard), junto com uma amilase fúngica purificada derivada de *Aspergillus oryzae*, sendo abaixo de 50% idênticas a qualquer um das SEQ ID NOs: 1 a 3. A Insuficiência Exócrina Pancreática (PEI) foi induzida nos porquinhos

mediante a ligação do canal pancreático, e eles foram também ajustados com uma cânula reentrante íleocecal, tudo sob anestesia de halotano e em um peso de cerca de 25 kg, como descrito em Tabeling *et al.*, J. 1999, *Studies on nutrient digestibilities (pre-caecal and total) in pancreatic duct-ligated pigs and the effects of enzyme substitution*, *J. Anim. Physiol. A. Anim. Nutr.* 82: 251-263 (daqui por diante referidos como “Tabeling 1999”); e em Gregory *et al.*, J. 1999. *Growth and digestion in pancreatic duct ligated pigs, Effect of enzyme supplementation in “Biology of the Pancreas in Growing Animals”* (SG Pierzynowski & R. Zabielski, eds.), Elsevier Science BV, Amsterdam, pp 381-393 (daqui por diante referido como “Gregory *et al.* 1999”). Um período de pelo menos 4 semanas foi deixado para recuperação da cirurgia, antes que os estudos fossem iniciados. Antes do início do estudo, o estado da PEI de cada porco foi confirmado através do teste da quimotripsina das fezes (comercialmente disponível da Immundiagnostik AG, Wiesenstrasse 4, D-64625 Bensheim, Alemanha, com o nº do catálogo K 6990).

Durante os estudos, os porcos foram alojados em gaiolas de metabolismo modificado em um ciclo de luz-escuro de 12:12 h e permitiu-se livre acesso à água e foram alimentados com duas refeições/dia. A refeição de teste, contendo 15,4% de proteína, 69% de amido e 2,1% de gordura, tinha a seguinte composição em g/100 g de matéria seca: Refeição de carne de aves domésticas 7,1; refeição de peixe 2,45; caseína 4,1; farinha de trigo 20,65; arroz com casca 9,8; fécula de batata 7,7; amido de milho 39,8; celulose em pó 3,0; vitaminas 5,3 (conforme as exigências nutricionais). Os porcos foram alimentados com 250 g desta refeição de teste misturada com 1 litro de água, 0,625 g de Cr₂O₃ e em que diferentes quantidades de amilases (0, 7500, 18750, 90000 FIP U de amilase/refeição, ver Exemplo 1) foram misturadas imediatamente antes da alimentação.

O quimo ileal coletado por um total de 6 horas após o primeiro aparecimento do marcador de refeições no íleo (quimo verde), foi congelado

em -20°C imediatamente após a coleta, para evitar qualquer fermentação bacteriana das amostras. Pelo menos uma lavagem diária foi permitida entre as determinações separadas.

As amostras congeladas foram secadas por congelamento, moídas e analisadas quanto à matéria seca (DM) e o amido. A DM foi estimada em peso após a secagem por congelamento seguido por 8 horas de incubação em 103°C; o amido foi analisado polarimetricamente após a hidrólise ácida, e o açúcar foi estimado gravimetricamente. O Cr_2O_3 foi oxidado até croma e o conteúdo de cromo foi calculado através de extinção em 365 nm (espectrofotômetro), como descrito por Petry e Rapp em *Zeitung für Tierphysiologie* (1970), vol. 27, pp. 181-189.

Digestibilidade: O cálculo da digestibilidade aparente do amido pré-cecal foi feito de acordo com a fórmula, em que o Cr_2O_3 e o amido foram expressos como g/100 g de matéria seca:

15 Digestibilidade aparente (%) =

$$= 100 - \left[\frac{\% \text{ de } \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ na alimentação}}{\% \text{ de } \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ na amostra}} \cdot \frac{\% \text{ de amido na amostra}}{\% \text{ de amido na alimentação}} \cdot 100 \right]$$

Os resultados da digestibilidade aparente do amido são apresentados na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1

Suplemento de enzima	0 Enzimas	7500 FIP U	18750 FIP U	90000 FIP U
Nenhum suplemento	44,9 +/- 7,6			
Pancreatina		64,1 +/- 15,2	76,7 +/- 13,2	97,2 +/- 2,2
Amilase de SEQ ID NO: 1		87,2 +/- 4,3	95,4 +/- 1,6	96,4 +/- 3,0
Amilase de SEQ ID NO: 3		89,0 +/- 6,8	92,5 +/- 3,8	96,8 +/- 2,6
Amilase de SEQ ID NO: 2		93,9 +/- 8,4	93,4 +/- 6,8	96,7 +/- 2,6
<i>Aspergillus oryzae</i> amilase		49,0 +/- 16,2	52,6 +/- 7,5	59,9 +/- 12,5

Os valores são médias $\pm$ Desvio Padrão

20 Dos resultados da Tabela 1, é evidente que as amilases da invenção se desempenham muito melhor do que a amilase de *Aspergillus oryzae* conhecida e melhor do que as preparações de pancreatina conhecidas.

As amilases da invenção produziram um melhoramento intenso e dependente da dose sobre a digestibilidade do amido, já apresentando um melhoramento altamente eficiente na menor dosagem testada.

Exemplo 3: Perfis do pH da amilase, com e sem sais biliares

5 Para uso no tratamento da PEI e de doenças relacionadas, é preferível quanto às enzimas de substituição pancreática terem uma alta atividade ao redor de pH 6 a 7 (condições típicas do intestino delgado superior). Esta experiência serve para determinar os perfis de pH de quatro alfa-amilases, três amilases bacterianas da invenção e uma amilase fúngica de
10 *Aspergillus oryzae* da técnica anterior, com e sem a adição de sais biliares.

Materiais e métodos

Enzimas

As amilases usadas para este estudo foram as amilases purificadas de *Bacillus* dos aminoácidos 1 a 486 da SEQ ID NO: 1 (“SEQ 1”),
15 aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2 (“SEQ 2”) e aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3 (“SEQ 3”), e, para comparação, uma amilase fúngica purificada derivada de *Aspergillus oryzae* (“A. oryzae”), a amilase do produto comercial de amilase Fungamyl®, que é disponível da Novozymes A/S, Krogshoejvej 36, DK-2880 Bagsvaerd, Dinamarca.

20 Perfil do pH - ensaio do açúcar redutor

Tampão de enzimas: 50 mM de acetato, 50 mM de imidazol, 50 mM de ácido malônico, 1 mM de CaCl₂, 0,01% de Triton X-100. Ajustar até pH 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 ou 7,0 com HCl/NaOH.

Tampão de substratos: 1,5 mg/ml de amilopectina (milho
25 ceroso, por exemplo o Milho ceroso 04201 da Cerestar, batelada WM5671), 50 mM de acetato, 50 mM de imidazol, 50 mM de ácido malônico, 1 mM de CaCl₂. Ajustar ao pH desejado (como acima) com HCl/NaOH. Incubar por 5 minutos a 100°C. O tampão de substratos foi produzido com ou sem sais biliares a 5 mM [isto é, taurocolato de sódio BRP, lote 2, da Farmacopéia

Européia (Ph.Eur) ou da FIP, também comercialmente disponível, por exemplo, da LGC promochem, 500 g/mol).

A atividade de amilase foi detectada pelo ensaio do açúcar redutor. Resumidamente, 50 µl de enzima (diluída em tampão de enzima de modo a situar-se dentro da faixa linear do ensaio) foram misturados com 100 µl de tampão de substrato em PCR-MTP (Thermo-Fast® 96, ABgene, cat. nº AB-0600). Os MTP's foram incubados a 37°C por 15 minutos, em seguida ao que 75 µl de solução de parada (100 mM de hidrazida de ácido p-hidróxi-benzóico, 180 mM de tartarato de K-Na, 2% de NaOH) foram adicionados, e as placas foram incubadas em 95°C por 10 minutos. Depois, 150 µl de cada reservatório foram transferidos para MTP de 96 reservatórios, e a absorbância em 410 nm foi monitorada como uma medida da atividade da amilase.

Resultados

Os resultados (média das determinações em duplicata) são apresentados nas Tabelas 2 a 4, abaixo.

A Tabela 2 apresenta a atividade de cada enzima no pH indicado na ausência de sais biliares. Para cada enzima, a atividade máxima foi estabelecida em 100%.

A Tabela 3 apresenta o mesmo da Tabela 2, mas na presença de 5 mM de sais biliares.

A Tabela 4 apresenta a atividade de cada enzima por mg de proteína de enzima no pH indicado na ausência dos sais biliares, em relação à atividade enzimática máxima medida nesta experiência, a qual era a atividade da enzima da SEQ 1 em pH 5,0 (100%). A atividade de cada enzima foi conseqüentemente normalizada em relação a esta atividade. A quantidade de proteína enzimática para cada enzima foi determinada com base na atividade específica.

A Tabela 5 apresenta o mesmo da Tabela 4, mas na presença de 5 mM de sais biliares. Aqui, a atividade da enzima de SEQ 1 em pH 5,0 na

presença de 5 mM de sais biliares é o valor de referência (100%).

Tabela 2: atividade relativa sem sais biliares

Enzima / pH	2	3	4	5	6	7
A, oryzae	0,0	0,0	77,4	93,4	100,0	25,6
SEQ 2	0,4	0,2	7,8	51,8	100,0	76,1
SEQ 3	0,3	0,8	2,8	22,2	79,7	100,0
SEQ 1	0,1	1,8	29,4	100,0	86,0	71,1

Tabela 3: Atividade relativa com sais biliares

Enzima / pH	2	3	4	5	6	7
A, oryzae	0,0	0,0	53,5	71,8	68,6	16,1
SEQ 2	0,1	0,0	0,5	37,5	85,8	66,1
SEQ 3	0,0	0,0	0,8	2,5	61,4	78,1
SEQ 1	0,0	0,0	10,4*	76,0	68,6	59,7

*Uma medição descartada por ser claramente incorreta.

5 **Tabela 4: Atividades absolutas normalizadas relativas à SEQ. 1 sem sais biliares**

Enzima / pH	2	3	4	5	6	7
A, oryzae	0,0	0,0	10,9	13,2	14,1	3,6
SEQ 2	0,1	0,1	2,1	14,0	27,1	20,6
SEQ 3	0,1	0,4	1,4	10,7	38,3	48,0
SEQ 1	0,1	1,8	29,4	100,0	86,0	71,1

Tabela 5: Atividades absolutas normalizadas relativas à SEQ. 1 com sais biliares

Enzima / pH	2	3	4	5	6	7
A, oryzae	0,0	0,0	9,9	13,3	12,7	3,0
SEQ 2	0,0	0,0	0,2	13,4	30,6	23,6
SEQ 3	0,0	0,0	0,5	1,6	38,8	49,3
SEQ 1	0,0	0,0	13,7	100,0	90,2	78,6

Estes resultados mostram que, embora os sais biliares pareçam
10 reduzir levemente a atividade da amilase, a atividade na presença de 5 mM de
sais biliares é ainda satisfatória. Os resultados mostram também que os sais
biliares não levam a um deslocamento do pH ótimo.

Os resultados além disso mostram que cada uma das amilases
de *Bacillus* da invenção têm, todas, mais do que 50% de atividade relativa em
15 pH 7, o que não é o caso quanto à amilase fúngica comparativa.

Finalmente, as Tabelas 4 e 5 demonstram que, pelo menos sob
estas condições, a amilase tendo os aminoácidos 1 a 486 da SEQ ID NO: 1

tem uma atividade significativamente mais elevada por mg de enzima, do que todas as outras amilases testadas.

Exemplo 4: Perfil de degradação das amilases

O perfil de degradação (impressão digital qualitativa DP1-10) das cinco alfa-amilases foi determinado pela degradação do amido de milho ceroso seguida pela análise em HPLC.

Materiais e métodos

As enzimas foram as amilases purificadas de *Bacillus* dos aminoácidos 1 a 486 da SEQ ID NO: 1 (“SEQ 1”), aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2 (“SEQ 2”) e aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3 (“SEQ 3”), e, para comparação, uma amilase fúngica purificada derivada de *Aspergillus oryzae* (“A. oryzae”), a amilase do produto comercial de amilase Fungamyl®, que é disponível da Novozymes A/S, Krogshoejvej 36, DK-2880 Bagsvaerd, Dinamarca. A pancreatina foi da Solvay Pharmaceuticals.

Como substrato, uma pasta de 50 mg/ml de amido de milho ceroso (por exemplo, milho ceroso 04201 da Cerestar, Batelada: WM5671) foi produzida em 50 mM de tampão de acetato de Na, pH 6,0, 40 ppm de Ca^{2+} .

As enzimas purificadas foram dosadas em uma concentração de 0,0073 mg de proteína enzimática por grama de substância seca da mistura de reação. A quantidade de proteína da enzima amilase foi calculada com base nos valores de A_{280} e nas seqüências de aminoácidos (composições de aminoácidos) com o uso dos princípios delineados em S. C. Gill e P. H. von Hippel, *Analytical Biochemistry* 182, 319-326, (1989). Após a dosagem da enzima, a reação foi incubada a 60°C. Aliquotas foram removidas após 24 horas e diluídas a 1:1 em água desmineralizada e duas gotas de HCl 1 M foram adicionadas. As enzimas foram inativadas por ebulição por 15 minutos. As amostras foram filtradas através de um filtro de 0,2 µm antes da aplicação na HPLC ajustada com duas colunas Aminex HPX 42A (Biorad) conectadas

em série e usando-se água como eluente.

100 mg de pancreatina foram dissolvidos em 10 ml de tampão de acetato de Na 50 mM, pH 5,5, 20 µl desta solução foram adicionados a 1 ml de pasta de substrato (50 mg/ml de amido de milho ceroso em acetato de Na 50 mM, pH 5,5) e incubados a 37°C por 24 horas, e depois inativados e filtrados como descrito acima antes da aplicação na HPLC.

Em uma experiência separada (não mostrada), a amilase da “SEQ 1” foi também testada a 37°C, o que deu origem ao mesmo perfil de degradação como a 60°C.

10 Resultados

Os cromatogramas resultantes após 24 horas de incubação são apresentados nas Figuras 1 a 5 juntamente com as indicações de modo que o composto seja representado pelo pico no cromatograma. A bem da clareza, estas indicações foram introduzidas na Figura 1 apenas, mas elas se aplicam *mutatis mutandis* a cada uma das outras figuras também. A designação de DP significa o Grau de Polimerização. Assim, DP1 designa o monômero, DP2, o dímero, DP3, o trímero, DP4, o tetrâmero, DP5, o pentâmero, DP6, o hexâmero, e assim por diante.

Parece das figuras que a alfa-amilase fúngica (“A. oryzae”) gera DP2, DP3 e DP4 como os principais produtos de degradação, enquanto deixa uma grande fração não hidrolisada (grande pico no tempo de retenção de 10 minutos). O DP1 não foi detectado como um produto de degradação.

As alfa-amilases bacterianas, por outro lado (“SEQ 1”, “SEQ 2”, “SEQ 3”), em geral, produzem DP1, DP2, DP3, e qualquer dentre DP5 ou DP6, como produtos principais, deixando apenas uma pequena parte do substrato não hidrolisado. Geralmente, uma baixa quantidade de DP4 parece ser produzida.

No que diz respeito à Pancreatina, ela parece comportar-se como uma mistura das amilases fúngicas e bacterianas descritas acima, isto é,

gerando produtos de baixo DP (DP1, DP2 e DP3), quase nada de DP4, DP5 e DP6, e apenas deixando um pequeno pico de substrato não hidrolisado.

Exemplo 5: Composições farmacêuticas de amilase

(A) Pelotas de alta resistência

5 Um concentrado líquido foi preparado como descrito na DK 2005 00931 (um ultrafiltrado em filtração de germe) da amilase tendo os aminoácidos 1 a 486 da SEQ ID NO: 1. O concentrado líquido foi secado por pulverização. O conteúdo medido da proteína de amilase do pó de amilase secado por pulverização, foi de 37%. 1125 g do pó de amilase secado por
10 pulverização foram pré-misturados secos junto com celulose microcristalina (450 g) e polietileno glicol 4000 (Macrogol[®] 4000; 675 g) em um misturador comercialmente disponível. Álcool isopropílico a 100% (460 g) foi adicionado e a massa úmida resultante continuou a ser completamente misturada na temperatura ambiente. A massa homogeneizada foi então
15 extrusada em uma extrusora comercialmente disponível que foi ajustada com uma matriz de perfurar tendo um diâmetro de furo de 0,8 mm para formar pelotas cilíndricas. A temperatura das contas não excedeu os 50°C enquanto em extrusão. O extrusado produzido foi arredondado em pelotas esféricas com um esferonizador comercialmente disponível mediante a adição da
20 quantidade necessária de álcool isopropílico a 100% (75,5 g). As pelotas foram secadas em uma temperatura de suprimento de aproximadamente 40°C em um secador a vácuo comercialmente disponível (da Voetsch). A temperatura do produto não excedeu os 45°C. As pelotas secas foram então separadas com o uso de uma máquina de peneira mecânica com telas de 0,7 e
25 1,4 mm. As frações da peneira de $\geq 0,7$ mm e $\leq 1,4$ mm foram coletadas e puderam ser carregadas em porções de 200 mg de pelotas cada em cápsulas de tamanho 2. A concentração de amilase das pelotas secas resultantes foi de aproximadamente 18,5% (p/p).

(B) Pelotas de menor resistência

Semelhante ao exemplo (A) acima fornecido, as pelotas com um conteúdo menor de amilase foram produzidas com o uso de 562,5 g do mesmo pó de amilase secado por pulverização, celulose microcristalina (1125 g), polietileno glicol 4000 (562,5 g), álcool isopropílico para umedecer (700 g) e álcool isopropílico para boleamento (41,6 g). A concentração de amilase das pelotas secas resultantes foi aproximadamente de 9,3% (p/p).

As pelotas resultantes dos exemplos (A) e (B) foram testadas quanto à atividade amilolítica pela aplicação de um método da FIP modificado para amilases microbianas. Em princípio, o amido é hidrolisado pela amilase em pH 5,8 e em uma temperatura constante ($37,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$) na presença de cloreto de sódio e cloreto de cálcio. Os grupos redutores resultantes da hidrólise reagem com iodo em solução alcalina e o excesso de iodo foi titulado com tiosulfato. Uma unidade de amilase é definida como a quantidade de enzima, que, sob as condições e substrato definidos, hidrolisa 1 micromol de ligação glicosídica por minuto. A atividade amilolítica nas pelotas foi observada ser de aproximadamente 96% em relação à atividade amilolítica no material de amilase pulverulento de partida para cada um dos Exemplos (A) e (B).

As pelotas resultantes dos Exemplos (A) e (B) foram então testadas quanto à desintegração de acordo com a Farmacopéia Européia 2.9.1. (Seção de “Desintegração de tabletes e cápsulas”) (solução de teste: água – 500 ml, 37°C). A desintegração das pelotas do Exemplo (A) foi completada dentro de 15 minutos. A desintegração das pelotas do Exemplo (B) foi completada dentro de 9 minutos.

Exemplo 6: Composições farmacêuticas de amilase e protease

As pelotas de alta resistência contendo amilase e protease foram preparadas como segue:

Um concentrado líquido filtrado em germe da protease dos aminoácidos 1 a 274 de SEQ ID NO: 5 foi preparado como descrito no

Exemplo 1 do pedido de patente DK nº 2005 00930 e secado por pulverização. A amilase secada por pulverização na forma de pó (398,5 g) preparada como descrito no Exemplo 5, foi pré-misturada seca com o pó de protease secado por pulverização (746,5 g, tendo um conteúdo de proteína de protease medido de 58,5%), celulose microcristalina (458g) e polietileno glicol 4000 (Macrogol® 4000; 687 g) em um misturador comercialmente disponível. Álcool isopropílico a 100% (460 g) foi adicionado e a massa úmida resultante continuou a ser completamente misturada na temperatura ambiente. A massa homogeneizada foi então extrusada em uma extrusora comercialmente disponível que foi ajustada com uma matriz de perfurar tendo um diâmetro de furo de 0,8 mm para formar pelotas cilíndricas. A temperatura das contas não excedeu os 50°C enquanto em extrusão. O extrusado produzido foi arredondado em pelotas esféricas com um esferonizador comercialmente disponível mediante a adição da quantidade necessária de álcool isopropílico a 100% (58 g). As pelotas foram secadas com o uso de uma temperatura de suprimento de aproximadamente 40°C em um secador de vácuo comercialmente disponível (da Voetsch). A temperatura do produto não excedeu os 45°C. As pelotas secas foram então separadas mediante o uso de uma máquina de peneira mecânica com telas de 0,7 e 1,4 mm. As frações da peneira $\geq 0,7$ mm e $\leq 1,4$ mm foram coletadas e puderam ser carregadas em porções de 200 mg cada em cápsulas de tamanho 2.

As pelotas disso resultantes foram testadas quanto às atividades proteolíticas e amilolíticas de acordo com os métodos delineados acima. Nenhuma perda na atividade proteolítica ou na amilolítica foi observada nas pelotas em cada caso em relação ao material pulverulento de partida de protease ou amilase, respectivamente.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

```

<110> Novozymes A/S
      Solvay Pharmaceuticals GmbH
<120> Amylases para uso farmacêutico
<130> 10795.204-WO
<160> 16
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 513
<212> PRT
<213> Bacillus stearothermophilus
<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(513)
<400> 1
Ala Ala Pro Phe Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu
1      5      10      15
Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Glu Ala Asn Asn
      20      25      30
Leu Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr Lys
      35      40      45
Gly Thr Ser Arg Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr Asp
      50      55      60
Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr
65      70      75      80
Lys Ala Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Ala Ala Gly Met
      85      90      95
Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asp His Lys Gly Gly Ala Asp Gly
      100     105     110
Thr Glu Trp Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg Asn Gln
      115     120     125
Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp Phe
      130     135     140
Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr His
145     150     155     160
Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Ser Arg Ile Tyr
      165     170     175
Lys Phe Arg Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu Phe Gly
      180     185     190
Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp His Pro Glu
      195     200     205
Val Val Thr Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr Val Asn Thr Thr
      210     215     220
Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser
225     230     235     240
Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Ser Gln Thr Gly Lys Pro
      245     250     255
Leu Phe Thr Val Gly Glu Tyr Trp Ser Tyr Asp Ile Asn Lys Leu His
      260     265     270
Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asp Gly Thr Met Ser Leu Phe Asp Ala Pro
      275     280     285
Leu His Asn Lys Phe Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Gly Gly Ala Phe Asp
      290     295     300
Met Arg Thr Leu Met Thr Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln Pro Thr Leu
305     310     315     320
Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly Gln Ala Leu
      325     330     335
Gln Ser Trp Val Asp Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile
      340     345     350
Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr
      355     360     365

```

Gly Ile Pro Gln Tyr Asn Ile Pro Ser Leu Lys Ser Lys Ile Asp Pro
 370 375 380
 Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His Asp Tyr
 385 390 395 400
 Leu Asp His Ser Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Gly Thr Glu
 405 410 415
 Lys Pro Gly Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly Gly
 420 425 430
 Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys Val Phe Tyr
 435 440 445
 Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ser Asp Gly
 450 455 460
 Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Trp Val Pro
 465 470 475 480
 Arg Lys Thr Thr Val Ser Thr Ile Ala Arg Pro Ile Thr Thr Arg Pro
 485 490 495
 Trp Thr Gly Glu Phe Val Arg Trp Thr Glu Pro Arg Leu Val Ala Trp
 500 505 510
 Pro

<210> 2

<211> 481

<212> PRT

<213> Bacillus licheniformis

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(481)

<400> 2

Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp
 1 5 10 15
 Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp
 20 25 30
 Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Thr Ser
 35 40 45
 Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu
 50 55 60
 Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Gly Glu
 65 70 75 80
 Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn Val Tyr
 85 90 95
 Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Ala Asp Ala Thr Glu Asp
 100 105 110
 Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val Ile Ser
 115 120 125
 Gly Glu His Leu Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro Gly Arg
 130 135 140
 Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Tyr Trp Tyr His Phe Asp Gly
 145 150 155 160
 Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys Phe Gln
 165 170 175
 Gly Lys Thr Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Phe Gly Asn Tyr Asp
 180 185 190
 Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Tyr Asp His Pro Asp Val Val Ala
 195 200 205
 Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln Leu Asp
 210 215 220
 Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe Leu Arg
 225 230 235 240
 Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met Phe Thr
 245 250 255
 Val Ala Glu Tyr Trp Ser Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn Tyr Leu
 260 265 270
 Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu His Tyr

275		280		285
Gln Phe His Ala Ala Ser Thr	Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met Arg Lys			
290	295	300		
Leu Leu Asn Gly Thr Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser Val Thr				
305	310	315		320
Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu Ser Thr				
	325	330		335
Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg				
	340	345		350
Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly Thr Lys				
	355	360		365
Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile Glu Pro				
	370	375		380
Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His Asp Tyr				
385	390	395		400
Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp Ser Ser				
	405	410		415
Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly Gly				
	420	425		430
Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr Trp His				
	435	440		445
Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser Glu Gly				
	450	455		460
Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr Val Gln				
465	470	475		480
Arg				

<210> 3

<211> 483

<212> PRT

<213> Bacillus sp.

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(483)

<400> 3

His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr				
1	5	10		15
Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Ser Asp Ala Ser				
	20	25		30
Asn Leu Lys Asp Lys Gly Ile Ser Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp				
	35	40		45
Lys Gly Ala Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr				
	50	55		60
Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr Gly				
65	70	75		80
Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Asn Ala Leu Lys Ser Asn Gly				
	85	90		95
Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp				
	100	105		110
Ala Thr Glu Met Val Lys Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn				
	115	120		125
Gln Glu Val Ser Gly Glu Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp				
	130	135		140
Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Asn Phe Lys Trp Arg Trp Tyr				
145	150	155		160
His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Lys Leu Asn Asn Arg				
	165	170		175
Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Lys Gly Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu				
	180	185		190
Phe Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met Asp His				
	195	200		205
Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr Thr Asn				
210	215	220		

Thr Leu Gly Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His Ile Lys
 225 230 235 240
 Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Ile Asn His Val Arg Ser Ala Thr Gly
 245 250 255
 Lys Asn Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu Gly Ala
 260 265 270
 Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val Phe Asp
 275 280 285
 Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Lys Ser Gly Gly Asn
 290 295 300
 Tyr Asp Met Arg Gln Ile Phe Asn Gly Thr Val Val Gln Lys His Pro
 305 310 315 320
 Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro Glu Glu
 325 330 335
 Ala Leu Glu Ser Phe Val Glu Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala
 340 345 350
 Leu Thr Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr Gly Asp
 355 360 365
 Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys Ser Lys Ile
 370 375 380
 Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Lys Tyr Ala Tyr Gly Arg Gln Asn
 385 390 395 400
 Asp Tyr Leu Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asn
 405 410 415
 Thr Ala His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp Gly Ala
 420 425 430
 Gly Gly Asn Lys Trp Met Phe Val Gly Arg Asn Lys Ala Gly Gln Val
 435 440 445
 Trp Thr Asp Ile Thr Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Thr Ile Asn Ala
 450 455 460
 Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Trp
 465 470 475 480
 Val Asn Lys

<210> 4

<211> 485

<212> PRT

<213> Bacillus halmapalus

<220>

<221> mat_peptideo

<222> (1)..(485)

<400> 4

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

Ile	Tyr	Lys	Phe	Arg	Gly	Asp	Gly	Lys	Ala	Trp	Asp	Trp	Glu	Val	Asp	165	170	175
			180						185				190					
Ser	Glu	Asn	Gly	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ala	Asp	Val	Asp	Met			
		195					200					205						
Asp	His	Pro	Glu	Val	Val	Asn	Glu	Leu	Arg	Arg	Trp	Gly	Glu	Trp	Tyr			
	210					215					220							
Thr	Asn	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Val	Lys	His			
225					230					235					240			
Ile	Lys	Tyr	Ser	Phe	Thr	Arg	Asp	Trp	Leu	Thr	His	Val	Arg	Asn	Ala			
			245					250						255				
Thr	Gly	Lys	Glu	Met	Phe	Ala	Val	Ala	Glu	Phe	Trp	Lys	Asn	Asp	Leu			
			260					265					270					
Gly	Ala	Leu	Glu	Asn	Tyr	Leu	Asn	Lys	Thr	Asn	Trp	Asn	His	Ser	Val			
	275						280					285						
Phe	Asp	Val	Pro	Leu	His	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Asn	Ala	Ser	Asn	Ser	Gly			
	290					295					300							
Gly	Asn	Tyr	Asp	Met	Ala	Lys	Leu	Leu	Asn	Gly	Thr	Val	Val	Gln	Lys			
305					310					315					320			
His	Pro	Met	His	Ala	Val	Thr	Phe	Val	Asp	Asn	His	Asp	Ser	Gln	Pro			
			325					330						335				
Gly	Glu	Ser	Leu	Glu	Ser	Phe	Val	Gln	Glu	Trp	Phe	Lys	Pro	Leu	Ala			
		340						345					350					
Tyr	Ala	Leu	Ile	Leu	Thr	Arg	Glu	Gln	Gly	Tyr	Pro	Ser	Val	Phe	Tyr			
	355						360					365						
Gly	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Ile	Pro	Thr	His	Ser	Val	Pro	Ala	Met	Lys	Ala			
	370					375					380							
Lys	Ile	Asp	Pro	Ile	Leu	Glu	Ala	Arg	Gln	Asn	Phe	Ala	Tyr	Gly	Thr			
385					390					395					400			
Gln	His	Asp	Tyr	Phe	Asp	His	His	Asn	Ile	Ile	Gly	Trp	Thr	Arg	Glu			
			405					410						415				
Gly	Asn	Thr	Thr	His	Pro	Asn	Ser	Gly	Leu	Ala	Thr	Ile	Met	Ser	Asp			
		420						425					430					
Gly	Pro	Gly	Gly	Glu	Lys	Trp	Met	Tyr	Val	Gly	Gln	Asn	Lys	Ala	Gly			
	435						440					445						
Gln	Val	Trp	His	Asp	Ile	Thr	Gly	Asn	Lys	Pro	Gly	Thr	Val	Thr	Ile			
	450					455					460							
Asn	Ala	Asp	Gly	Trp	Ala	Asn	Phe	Ser	Val	Asn	Gly	Gly	Ser	Val	Ser			
465					470					475					480			
Ile	Trp	Val	Lys	Arg														
			485															

<210> 5

<211> 274

<212> PRT

<213> Bacillus licheniformis

<220>

<221> mat_peptideo

<222> (1)..(274)

<400> 5

Ala	Gln	Thr	Val	Pro	Tyr	Gly	Ile	Pro	Leu	Ile	Lys	Ala	Asp	Lys	Val	1	5	10	15
Gln	Ala	Gln	Gly	Phe	Lys	Gly	Ala	Asn	Val	Lys	Val	Ala	Val	Leu	Asp	20	25	30	
Thr	Gly	Ile	Gln	Ala	Ser	His	Pro	Asp	Leu	Asn	Val	Val	Gly	Gly	Ala	35	40	45	
Ser	Phe	Val	Ala	Gly	Glu	Ala	Tyr	Asn	Thr	Asp	Gly	Asn	Gly	His	Gly	50	55	60	
Thr	His	Val	Ala	Gly	Thr	Val	Ala	Ala	Leu	Asp	Asn	Thr	Thr	Gly	Val	65	70	75	80
Leu	Gly	Val	Ala	Pro	Ser	Val	Ser	Leu	Tyr	Ala	Val	Lys	Val	Leu	Asn	85	90	95	
Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Val	Ser	Gly	Ile	Glu	Trp	100	105	110	

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

<210> 6
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> Nocardiosis sp.
 <220>
 <221> mat_peptideo
 <222> (1)..(188)
 <400> 6

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

<210> 7
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> Nocardiosis dassonvillei subsp. dassonvillei
 <220>
 <221> mat_peptideo
 <222> (1)..(188)
 <400> 7

Ala Asp Ile Ile Gly Gly Leu Ala Tyr Tyr Met Gly Gly Arg Cys Ser

```

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

```

<210> 8

<211> 274

<212> PRT

<213> Humicola lanuginosa

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(274)

<220>

<221> mat_peptideo

<222> (6)..(274)

<400> 8

```

Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe Asn
-5           -1 1           5           10
Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn Asp
15           20           25
Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro Glu
30           35           40
Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser Gly
45           50           55
Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys Leu
60           65           70           75
Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile Gly
80           85           90
Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly Cys
95           100          105
Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp Thr
110          115          120
Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr Arg
125          130          135
Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val Ala
140          145          150          155
Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser Tyr
160          165          170
Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr Val
175          180          185
Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile Val
190          195          200
Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro Glu
205          210          215
Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Arg Arg Arg Asp Ile

```

220 225 230 235
Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro Asn
240 245 250
Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly Thr
255 260 265
Cys Leu

<210> 9

<211> 269

<212> PRT

<213> Humicola lanuginosa

<220>

<221> mat_peptideo

<222> (1)..(269)

<400> 9

Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe Asn Leu Phe Ala Gln Tyr
1 5 10 15
Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn Asp Ala Pro Ala Gly Thr
20 25 30
Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro Glu Val Glu Lys Ala Asp
35 40 45
Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser Gly Val Gly Asp Val Thr
50 55 60
Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys Leu Ile Val Leu Ser Phe
65 70 75 80
Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile Gly Asn Leu Asn Phe Asp
85 90 95
Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly Cys Arg Gly His Asp Gly
100 105 110
Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp Thr Leu Arg Gln Lys Val
115 120 125
Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr Arg Val Val Phe Thr Gly
130 135 140
His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val Ala Gly Ala Asp Leu Arg
145 150 155 160
Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser Tyr Gly Ala Pro Arg Val
165 170 175
Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr Val Gln Thr Gly Gly Thr
180 185 190
Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile Val Pro Arg Leu Pro Pro
195 200 205
Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Lys Ser
210 215 220
Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp Ile Val Lys Ile Glu Gly
225 230 235 240
Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro Asn Ile Pro Asp Ile Pro
245 250 255
Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly Thr Cys Leu
260 265

<210> 10

<211> 483

<212> PRT

<213> Bacillus licheniformis

<220>

<221> mat_peptideo

<222> (1)..(483)

<400> 10

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

```

Thr Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu
 50      55      60
Gly Glu Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys
 65      70      75      80
Gly Glu Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn
      85      90      95
Val Tyr Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Ala Thr
      100      105      110
Glu Asp Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val
      115      120      125
Ile Ser Gly Glu His Leu Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro
      130      135      140
Gly Arg Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe
      145      150      155      160
Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys
      165      170      175
Phe Gln Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Asn Gly Asn
      180      185      190
Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Tyr Asp His Pro Asp Val
      195      200      205
Ala Ala Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln
      210      215      220
Leu Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe
      225      230      235      240
Leu Arg Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met
      245      250      255
Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn
      260      265      270
Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu
      275      280      285
His Tyr Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met
      290      295      300
Arg Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser
      305      310      315      320
Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu
      325      330      335
Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu
      340      345      350
Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly
      355      360      365
Thr Lys Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile
      370      375      380
Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His
      385      390      395      400
Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp
      405      410      415
Ser Ser Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro
      420      425      430
Gly Gly Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr
      435      440      445
Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser
      450      455      460
Glu Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr
      465      470      475      480
Val Gln Arg

```

<210> 11

<211> 480

<212> PRT

<213> Bacillus amyloliquefaciens

<220>

<221> mat_peptideo

<222> (1)..(480)

<400> 11

Val 1	Asn	Gly	Thr	Leu 5	Met	Gln	Tyr	Phe	Glu 10	Trp	Tyr	Thr	Pro	Asn 15	Asp
Gly	Gln	His	Trp 20	Lys	Arg	Leu	Gln	Asn 25	Asp	Ala	Glu	His	Leu 30	Ser	Asp
Ile	Gly	Ile 35	Thr	Ala	Val	Trp	Ile 40	Pro	Pro	Ala	Tyr	Lys 45	Gly	Leu	Ser
Gln	Ser 50	Asp	Asn	Gly	Tyr	Gly 55	Pro	Tyr	Asp	Leu	Tyr 60	Asp	Leu	Gly	Glu
Phe 65	Gln	Gln	Lys	Gly 70	Thr	Val	Arg	Thr	Lys 75	Tyr	Gly	Thr	Lys	Ser	Glu 80
Leu	Gln	Asp	Ala 85	Ile	Gly	Ser	Leu	His 90	Ser	Arg	Asn	Val	Gln 95	Val	Tyr
Gly	Asp	Val 100	Val	Leu	Asn	His	Lys 105	Ala	Gly	Ala	Asp	Ala 110	Thr	Glu	Asp
Val	Thr 115	Ala	Val	Glu	Val	Asn 120	Pro	Ala	Asn 125	Arg	Asn	Gln 130	Glu	Thr	Ser
Glu	Glu 135	Tyr	Gln	Ile	Lys 140	Ala	Trp	Thr	Asp 145	Phe	Arg	Phe 150	Pro	Gly	Arg
Gly 145	Asn	Thr	Tyr	Ser 150	Asp	Phe	Lys	Trp	His 155	Trp	Tyr	His 160	Phe	Asp	Gly 165
Ala	Asp	Trp 165	Asp	Glu	Ser	Arg	Lys 170	Ile	Ser 175	Arg	Ile	Phe 180	Lys	Phe	Arg 185
Gly	Glu	Gly 185	Lys	Ala 190	Trp	Asp	Trp 195	Glu	Val	Ser	Ser	Glu 200	Asn	Gly	Asn 205
Tyr	Asp 210	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ala 215	Asp	Val	Asp 220	Tyr	Asp	His 225	Pro	Asp	Val 230
Val	Ala 235	Glu	Thr	Lys	Lys	Trp 240	Gly	Ile	Trp 245	Tyr	Ala 250	Asn	Glu	Leu	Ser 255
Leu 260	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile 265	Asp	Ala	Ala	Lys 270	His	Ile	Lys 275	Phe	Ser	Phe 280
Leu 285	Arg	Asp	Trp 290	Val	Gln	Ala 295	Val	Arg	Gln 300	Ala	Thr	Gly 305	Lys	Glu	Met 310
Phe	Thr 315	Val	Ala	Glu	Tyr	Trp 320	Gln	Asn 325	Asn	Ala	Gly 330	Lys 335	Leu	Glu	Asn 340
Tyr	Leu 345	Asn	Lys	Thr	Ser	Phe 350	Asn	Gln 355	Ser	Val	Phe 360	Asp 365	Val	Pro	Leu 370
His	Phe 375	Asn	Leu	Gln	Ala 380	Ala 385	Ser	Ser	Gln 390	Gly	Gly 395	Tyr 400	Asp	Met	
Arg 405	Arg	Leu	Leu	Asp	Gly 410	Thr	Val	Val	Ser 415	Arg	His	Pro	Glu	Lys	Ala 420
Val	Thr 425	Phe	Val	Glu	Asn	His 430	Asp	Thr	Gln 435	Pro	Gly	Gln 440	Ser	Leu	Glu 445
Ser	Thr 450	Val	Gln	Thr	Trp	Phe 455	Lys	Pro	Leu 460	Ala	Tyr	Ala 465	Phe	Ile	Leu 470
Thr	Arg 475	Glu	Ser	Gly	Tyr	Pro 480	Gln	Val	Phe 485	Tyr	Gly	Asp 490	Met	Tyr	Gly 495
Thr	Lys 500	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys 505	Glu	Ile	Pro 510	Ser	Leu	Lys 515	Asp	Asn	Ile 520
Glu	Pro 525	Ile	Leu	Lys	Ala 530	Arg	Lys	Glu	Tyr 535	Ala	Tyr	Gly 540	Pro	Gln	His 545
Asp	Tyr 550	Ile	Asp	His	Pro	Asp 555	Val	Ile	Gly 560	Trp	Thr	Arg 565	Glu	Gly	Asp 570
Ser	Ser 575	Ala	Ala	Lys	Ser	Gly 580	Leu	Ala	Ala 585	Leu	Ile	Thr 590	Asp	Gly	Pro 595
Gly	Gly 600	Ser	Lys	Arg	Met	Tyr 605	Ala	Gly	Leu 610	Lys	Asn	Ala 615	Gly	Glu	Thr 620
Trp	Tyr 625	Asp	Ile	Thr	Gly	Asn 630	Arg	Ser	Asp 635	Thr	Val	Lys 640	Ile	Gly	Ser 645
Asp 650	Gly	Trp	Gly	Glu	Phe	His 655	Val	Asn	Asp 660	Gly	Ser	Val	Ser	Ile	Tyr 665

<210> 12

<211> 514

```

<212> PRT
<213> Bacillus stearothermophilus
<220>
<221> mat_peptideo
<222> (1)..(514)
<400> 12
Ala Ala Pro Phe Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu
1      5      10      15
Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Glu Ala Asn Asn
20     25     30
Leu Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr Lys
35     40     45
Gly Thr Ser Arg Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr Asp
50     55     60
Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Ala Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr
65     70     75     80
Lys Ala Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Ala Ala Gly Met
85     90     95
Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asp His Lys Gly Gly Ala Asp Gly
100    105    110
Thr Glu Trp Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg Asn Gln
115    120    125
Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp Phe
130    135    140
Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr His
145    150    155    160
Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Ser Arg Ile Tyr
165    170    175
Lys Phe Arg Gly Ile Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu
180    185    190
Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp His
195    200    205
Pro Glu Val Val Thr Glu Leu Lys Ser Trp Gly Lys Trp Tyr Val Asn
210    215    220
Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys
225    230    235    240
Phe Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Asp Val Arg Ser Gln Thr Gly
245    250    255
Lys Pro Leu Phe Thr Val Gly Glu Tyr Trp Ser Tyr Asp Ile Asn Lys
260    265    270
Leu His Asn Tyr Ile Met Lys Thr Asn Gly Thr Met Ser Leu Phe Asp
275    280    285
Ala Pro Leu His Asn Lys Phe Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Gly Gly Thr
290    295    300
Phe Asp Met Arg Thr Leu Met Thr Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln Pro
305    310    315    320
Thr Leu Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly Gln
325    330    335
Ala Leu Gln Ser Trp Val Asp Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala
340    345    350
Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp
355    360    365
Tyr Tyr Gly Ile Pro Gln Tyr Asn Ile Pro Ser Leu Lys Ser Lys Ile
370    375    380
Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His
385    390    395    400
Asp Tyr Leu Asp His Ser Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Val
405    410    415
Thr Glu Lys Pro Gly Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro
420    425    430
Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys Val
435    440    445
Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ser

```

```

      450              455              460
Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Trp
465              470              475              480
Val Pro Arg Lys Thr Thr Val Ser Thr Ile Ala Trp Ser Ile Thr Thr
      485              490              495
Arg Pro Trp Thr Asp Glu Phe Val Arg Trp Thr Glu Pro Arg Leu Val
      500              505              510
Ala Trp

```

<210> 13

<211> 1620

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> VARIANTE de DNA de *Bacillus stearothermophilus*

<220>

<221> misc_aspecto

<222> (1)..(1620)

<223> DNA codificando SEQ ID NO: 1

<400> 13

```

atgaaacacac aaaaacggct ttacgcccga ttgctgacgc tgttatttgc gctcatcttc      60
ttgctgcctc attctgcagc cgcggcaccg tttaacggca ccatgatgca gtattttgaa      120
tggtacttgc cggatgatgg caggttatgg accaaagtgg ccaatgaagc caacaactta      180
tccagccttg gcatcaccgc tctttggctg ccgcccgtt acaaaggaac aagccgcagc      240
gacgtagggt acggagtata cgacttgat gacctcggcg aattcaatca aaaagggacc      300
gtccgcacaa aatacggaac aaaagctcaa tatcttcaag ccattcaagc cgccacgcc      360
gctggaatgc aagtgtacgc cgatgtcgtg ttcgaccata aaggcggcgc tgacggcacg      420
gaatgggtgg acgccgtcga agtcaatccg tccgaccgca accaagaaat ctcgggcacc      480
tatcaaatcc aagcatggac gaaatttgat tttccggggc ggggcaacac ctactccagc      540
tttaagtggc gctggtacca ttttgacggc gttgattggg acgaaagccg aaaattgagc      600
cgcatttaca aattccgtgg caaggcttgg gattgggaag tagacacgga attcggaaac      660
tatgactact taatgtatgc cgacctgat atggatcatc ccgaagtcgt gaccgagctg      720
aaaaactggg ggaaatggta tgtcaacaca acgaacattg atgggttccg gcttgatgcc      780
gtcaagcata ttaagttcag ttttttccct gattggttgt cgtatgtgcg ttctcagact      840
ggcaagccgc tatttaccgt cggggaatat tggagctatg acatcaacaa gttgcacaat      900
tacattacga aaacagacgg aacgatgtct ttgtttgatg ccccgttaca caacaaattt      960
tataccgctt ccaaatacagg gggcgcatth gatatgcgca cgtaaatgac caatactctc     1020
atgaaagatc aaccgacatt ggccgtcacc ttcgttgata atcatgacac cgaacccggc     1080
caagcgtcgc aatcatgggt cgacccatgg ttcaaaccgt tggcttacgc ctttattcta     1140
actcggcagg aaggataccc gtgcgtcttt tatggtgact attatggcat tccacaatat     1200
aacattcctt cgctgaaaag caaaatcgat ccgctctca tcgcgcgcag ggattatgct     1260
tacggaacgc aacatgatta tcttgatcac tccgacatca tcgggtggac aagggaaggg     1320
ggcactgaaa aaccaggatc cggactggcc gcactgatca ccgatgggcc gggagggaagc     1380
aaatggatgt acgttggcaa acaacacgct ggaaaagtgt tctatgacct taccggcaac     1440
cggagtgaca ccgtcaccat caacagtgat ggatgggggg aattcaaagt caatggcggg     1500
tcggtttccg tttgggttcc tagaaaaacg accgtttcta ccatcgctcg gccgatcaca     1560
acccgaccgt ggactggtga attcgtccgt tggaccgaac cacggttggt ggcattggcct     1620

```

<210> 14

<211> 1461

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> VARIANTE de DNA de *Bacillus licheniformis*

<220>

<221> misc_aspecto

<222> (1)..(1461)

<223> DNA codificando SEQ ID NO: 2

<400> 14

```

atgcctgcag cagcagccgt aaatggcacg ctgatgcagt attttgaatg gtatacgccg      60
aacgacggcc agcattggaa acgattgcag aatgatgcgg aacatttatc ggatatcggt      120
attactgccg tctggattcc cccggcatat aagggaacga gccaagcgga tgtgggctac      180
ggtgcttacg acctttatga tttaggggag tttcatcaaa aagggacggg tcggacaaag      240
tacggcacia aaggagagct gcaatctgcg atcaaaagtc ttcattcccg cgacattaac      300

```

```

gtttacgggg atgtggtcat caaccacaaa ggcggcgctg atgcgaccga agatgtaacc 360
gcggttgaag tcgatccgcg tgaccgcaac cgcgtaattt caggagaaca cctaattaaa 420
gcctggacac attttcattt tccggggcgc ggcagcacat acagcgattt taagtggat 480
tggtaccatt ttgacggaac cgattgggac gagtcccgaa agctgaaccg catctataag 540
tttcaaggga agacttgga ttgggaagtt tccaatgaat tcggcaacta tgattatttg 600
atgtatgccg acatcgatta tgaccatcct gacgtcgtag cagaaattaa gagatggggc 660
acttggtatg ccaatgaact gcaattggac ggtttccgtc ttgatgctgt caaacacatt 720
aaattttctt ttttgcgga ttgggttaat catgtcaggg aaaaaacggg gaaggaaatg 780
tttacggtag ctgagtactg gtcgaatgac ttgggcgcgc tggaaaacta tttgaacaaa 840
acaaatttta atcattcagt gtttgacgtg ccgcttcatt atcagttcca tgctgcatcg 900
acacagggag gcggctatga tatgaggaaa ttgctgaacg gtacggtcgt ttccaagcat 960
ccgttgaaat cggttacatt tgtcgataac catgatacac agccggggca atcgcttgag 1020
tcgactgtcc aaacatgggt taagccgctt gcttacgctt ttattctcac aagggaatct 1080
ggataccctc aggttttcta cggggatatg tacgggacga aaggagactc ccagcgcgaa 1140
attcctgcct tgaacacaaa aattgaaccg atcttaaaag cgagaaaaca gtatgcgtac 1200
ggagcacagc atgattattt cgaccacat gacattgtcg gctggacaag ggaaggcgac 1260
agctcggttg caaattcagg tttggcggca ttaataacag acggacccgg tggggcaaaag 1320
cgaatgtatg tcggccggca aaacgccggt gagacatggc atgacattac cggaaccgt 1380
tcggagccgg ttgtcatcaa ttcggaaggc tggggagagt ttcacgtaaa cggcgggtcg 1440
gtttcaattt atgttcaaag a 1461

```

<210> 15

<211> 1449

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> VARIANTE de DNA de Bacillus sp.

<220>

<221> misc_aspecto

<222> (1)..(1449)

<223> DNA encoding SEQ ID NO: 3

<400> 15

```

caccataatg gtacgaacgg cacaatgatg cagtactttg aatgggtatct accaaatgac 60
ggaaaccatt ggaatagatt aaggtctgat gcaagtaacc taaaagataa agggatctca 120
gcggttttga ttccctctgc atggaagggt gcctctcaaa atgatgtggg gtatggtgct 180
tatgatctgt atgatttagg agaattcaat caaaaaggaa ccattcgtac aaaatatgga 240
acgcgcaatc agttacaagc tgcggttaac gccttgaaaa gtaatggaat tcaagtgtat 300
ggcgatgttg taatgaatca taaaggggga gcagacgcta ccgaaatggt taaagcagtc 360
gaagtaaacc cgaataatag aaatcaagaa gtgtccgggtg aatatacaat tgaggcttgg 420
acaaagtttg actttccagg acgaggtaat actcattcaa acttcaaag gagatggtat 480
cactttgatg gagtagattg ggatcagtcg cgtaagctga acaatcgaat ttataaattc 540
cgcggtaaa ggtgggattg ggaagtcgat acagaattcg gtaactatga ttacctaattg 600
tatgcagata ttgacatgga tcaccagag gtagtgaatg agctaagaaa ttggggtggt 660
tggtatacga atacattagg cttgatgggt tttagaatag atgcagtaaa acatataaaa 720
tacagcttta ctctgtgattg gattaatcat gttagaagtg caactggcaa aaatatgttt 780
gcggttgccg aatttttgaa aaatgattta ggtgctattg aaaactattt aaacaaaaca 840
aactggaacc attcagtcct tgatgttccg ctgcactata acctctataa tgcttcaaaa 900
agcggaggga attatgatat gaggcaaata tttaatggta cagtcgtgca aaagcatcca 960
atgcatgctg ttacatttgt tgataatcat gattcgcaac ctgaagaagc tttagagtct 1020
tttgttgaag aatgggttcaa accattagcg tatgctttga cattaacacg tgaacaaggc 1080
tacccttctg tattttatgg agattattat ggcattccaa cgcatggtgt accagcgatg 1140
aaatcgaaaa ttgaccgat tctagaagcg cgtcaaaagt atgcatatgg aagacaaaat 1200
gactacttag accatcataa tatcatcggt tggacacgtg aagggaatac agcacacccc 1260
aactccggtt tagctactat catgtccgat ggggcaggag gaaataagtg gatgtttgtt 1320
gggcgtaata aagctggtca agtttggacc gatatcactg gaaataaagc cggtagctgt 1380
acgattaatg ctgatggatg gggtaat tctgtaaatg gaggatcagt ttctatttgg 1440
gtaaacaaa 1449

```

<210> 16

<211> 1768

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> VARIANTE de DNA de Bacillus halmapalus

<220>

<221> misc_aspecto

<223> DNA codificando SEQ ID NO: 4

<400> 16

gtgaggaaac	gaaaaaatat	gctattaagt	atgtttatag	tatttattat	gatgctttct	60
tttgtgccag	tttcaggtgg	agaggtagaa	gcacatcata	atgggacaaa	tgggacgatg	120
atgcaatact	ttgaatggca	cttgcctaata	gatgggaatc	actggaatag	attaagagat	180
gatgctagta	atctaagaaa	tagaggtata	accgctatit	ggattccgcc	tgcttgga	240
gggacttcgc	aaaatgatgt	ggggtatgga	gcctatgata	tttatgattt	aggggaattt	300
aatcaaaagg	ggacggttcg	tactaagtat	gggacacgta	gtcaattgga	gtctgccatc	360
catgctttta	agaataatgg	cgttcaagtt	tatggggatg	tagtgatgaa	ccataaagga	420
ggagctgatg	ctacagaaaa	cgttcttgct	gtcgaggtga	atccaaataa	ccggaatcaa	480
gaaatatctg	gggactacac	aattgaggct	tggactaagt	ttgattttcc	agggaggggt	540
aatacatact	cagactttta	atggcggttg	tatcatttcg	atgggtgtaga	ttgggatcaa	600
tcacgcacaat	tccaaaaatcg	tatctacaaa	ttccgaggtg	atggtaaggc	atgggattgg	660
gaagtagatt	cggaaaaatgg	aaattatgat	tattttaatgt	atgcagatgt	agatatggat	720
catccggagg	tagtaaatga	gcttagaaga	tggggagaat	ggtatacaaa	tacattaaat	780
cttgatggat	ttaggatcga	tgcggtgaag	catattaaat	atagctttac	acgtgattgg	840
ttgacccatg	taagaaacgc	aacgggaaaa	gaaatgtttg	ctgttgctga	attttgga	900
aatgatttag	gtgccttgga	gaactattta	aataaaacaa	actggaatca	ttctgtcttt	960
gatgtccccc	ttcattataa	tctttataac	gcgtcaaata	gtggaggcaa	ctatgacatg	1020
gcaaaacttc	ttaatggaac	ggttggtcaa	aagcatccaa	tgcatgccgt	aacttttgtg	1080
gataatcacg	attctcaacc	tggggaatca	ttagaatcat	ttgtacaaga	atggtttaag	1140
ccacttgctt	atgcgcttat	tttaacaaga	gaacaaggct	atccctctgt	cttctatggt	1200
gactactatg	gaattccaac	acatagtgtc	ccagcaatga	aagccaagat	tgatccaatc	1260
ttagaggcgc	gtcaaaaattt	tgcatatgga	acacaacatg	attattttga	ccatcataat	1320
ataatcggat	ggacacgtga	aggaaatacc	acgcatccca	attcaggact	tgcgactatc	1380
atgtcggatg	ggccaggggg	agagaaatgg	atgtacgtag	ggcaaaataa	agcagggtcaa	1440
gtttggcatg	acataactgg	aaataaacca	ggaacagtta	cgatcaatgc	agatggatgg	1500
gctaattttt	cagtaaatgg	aggatctggt	tccattttgg	tgaaacgata	atggaaaaaa	1560
gaaaaggcta	aatggtcttt	tctttttttc	taggaggtgt	tgtaaatgga	gtttattcaa	1620
ttactaagtg	ccgagctaaa	agatcagtcg	tatctttttt	taaaattaga	agcatttggt	1680
tccgtattag	atatagaggg	tcatgaaaaa	tgtgttatgc	aatatcaaat	ggggcagcag	1740
ttcttttacg	tgagcggcaa	tgaaattg				1768

REIVINDICAÇÕES

1. Amilase, caracterizada pelo fato de que tem pelo menos 50% de identidade a (i) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1, (ii) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2, e/ou (iii) aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3; para uso como um medicamento.

2. Amilase de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que:

a) a amilase compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo em (i) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1, (ii) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2 e/ou (iii) aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3 e/ou

b) a amilase é uma variante de uma seqüência de aminoácidos selecionados do grupo consistindo em (i) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1, (ii) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2, e/ou (iii) aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3, em que a variante difere da seqüência de aminoácidos respectiva por não mais do que vinte e cinco aminoácidos, e em que:

(i) a variante compreende pelo menos uma substituição, deleção e/ou inserção de um ou mais aminoácidos em comparação com a respectiva seqüência de aminoácidos; e/ou

(ii) a variante compreende pelo menos uma pequena deleção em comparação com a respectiva seqüência de aminoácidos; e/ou

(iii) a variante compreende pelo menos uma pequena extensão N-terminal ou C-terminal em comparação com a respectiva seqüência de aminoácidos; e/ou

c) a amilase é uma variante alélica de uma amilase tendo aminoácidos selecionados do grupo consistindo de (i) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1, (ii) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2 e/ou (iii) aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3; e/ou

d) a amilase é um fragmento de uma amilase tendo

aminoácidos selecionados do grupo consistindo em (i) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1, (ii) aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2 e/ou (iii) aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3.

3. Amilase de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo
5 fato de que tem uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo nos (i) aminoácidos 1 a 481, 1 a 484, 1 a 486 ou 1 a 513 da SEQ ID NO: 1; (ii) aminoácidos 1 a 481 of SEQ ID NO: 2 e/ou (iii) aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3.

4. Amilase de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a
10 3, em combinação com uma lipase ou uma protease, caracterizada pelo fato de ser para uso como um medicamento.

5. Amilase de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em combinação com uma lipase e uma protease, caracterizada pelo fato de ser para uso como um medicamento.

15 6. Amilase em combinação com uma lipase e/ou uma protease de acordo com as reivindicações 4 ou 5, caracterizada pelo fato de que:

(i) a lipase tem pelo menos 70% de identidade com uma lipase tendo os aminoácidos 1 a 269 da SEQ ID NO: 8;

(ii) a protease tem pelo menos 70% de identidade com uma
20 protease selecionada do grupo consistindo em

a) uma protease tendo os aminoácidos 1 a 274 da SEQ ID NO: 5,

b) uma protease tendo os aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 6, e

25 c) uma protease tendo os aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 7.

7. Amilase em combinação com uma lipase e/ou uma protease de acordo com as reivindicações 4 ou 5, a amilase caracterizada pelo fato de que

(i) é uma amilase selecionada do grupo consistindo em

a) uma amilase compreendendo os aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 1,

b) uma amilase tendo os aminoácidos 1 a 481 da SEQ ID NO: 2, e

c) uma amilase tendo os aminoácidos 1 a 483 da SEQ ID NO: 3;

(ii) a lipase compreende os aminoácidos 2 a 269 da SEQ ID NO: 8;

(iii) a protease é uma protease selecionada do grupo consistindo em

a) uma protease tendo os aminoácidos 1 a 274 da SEQ ID NO: 5,

b) uma protease tendo os aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 6, e

c) uma protease tendo os aminoácidos 1 a 188 da SEQ ID NO: 7.

8. Uso de uma amilase como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de um medicamento para o tratamento de distúrbios digestivos, insuficiência exócrina pancreática, pancreatite, fibrose cística, diabetes tipo I e/ou diabetes tipo II.

9. Uso de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que ainda compreende o uso de uma lipase ou de uma protease.

10. Uso de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que ainda compreende o uso de uma lipase e uma protease.

11. Uso de acordo com as reivindicações 9 ou 10, caracterizado pelo fato de que a lipase e/ou protease são como definidas nas reivindicações 6 ou 7.

12. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende uma amilase como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, juntamente com pelo menos um material auxiliar farmacêuticamente aceitável.

5 13. Composição de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que ainda compreende uma lipase ou uma protease.

14. Composição de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que ainda compreende uma lipase e uma protease.

10 15. Composição de acordo com as reivindicações 13 ou 14, caracterizada pelo fato de que a lipase e/ou a protease são como definidas nas reivindicações 6 ou 7.

15 16. Método para o tratamento de uma doença sendo distúrbios digestivos, insuficiência exócrina pancreática, pancreatite, fibrose cística, diabetes tipo I e/ou diabetes tipo II, o método caracterizado pelo fato de ser pela administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma amilase como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que ainda compreende administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma lipase ou uma protease.

20 18. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que ainda compreende administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma lipase e uma protease.

25 19. Método de acordo com as reivindicações 17 ou 18, caracterizado pelo fato de que a lipase e/ou a protease são de acordo com as reivindicações 6 ou 7.

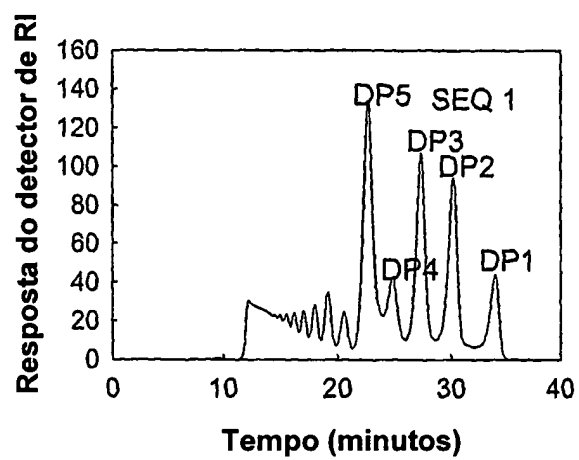


Fig. 1

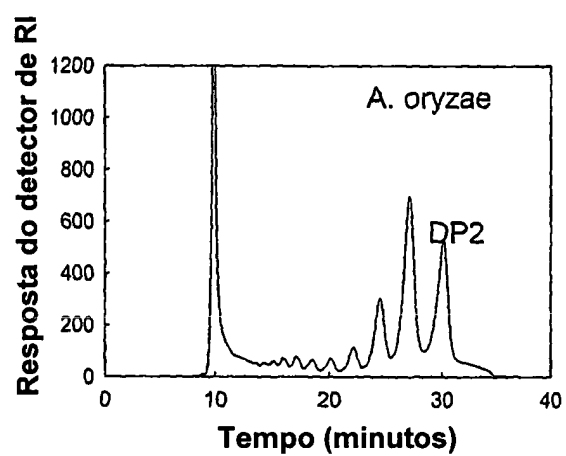


Fig. 2

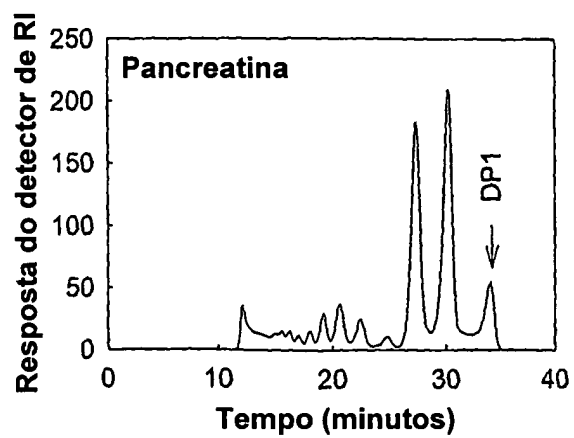


Fig. 3

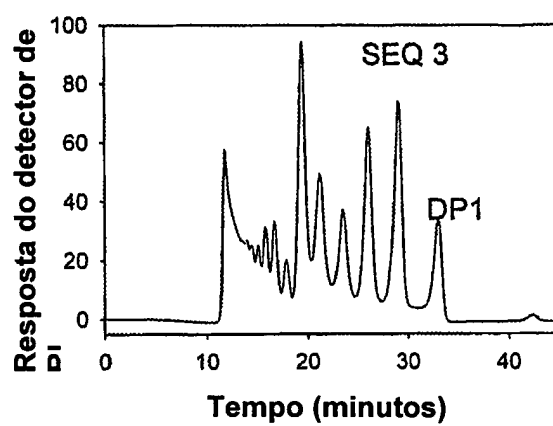


Fig. 4

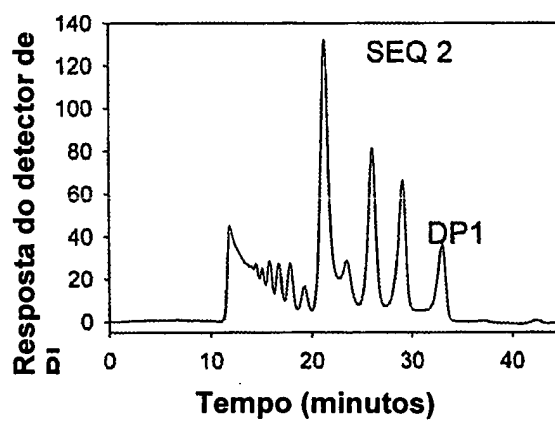


Fig. 5

RESUMO

“AMILASE, USO DA MESMA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE UMA DOENÇA”

O uso farmacêutico das amilases relacionadas às alfa-amilases de *Bacillus* da SEQ ID NOs: 1 a 3, opcionalmente em combinação com uma lipase e/ou uma protease. Exemplos de indicações médicas são: tratamento dos distúrbios digestivos, insuficiência exócrina pancreática (PEI), pancreatite, fibrose cística, diabetes tipo I, e/ou diabetes tipo II. As amilases das SEQ ID NOs: 1 a 3 são variantes das amilases de *Bacillus steatothermophilus*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus* sp. As amilases da invenção têm uma eficácia melhorada *in vivo*, um perfil de pH melhorado, uma alta atividade específica, e/ou um perfil de degradação do amido melhorado.