

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1998.10.23**

(30) Prioridade(s): **1997.10.23 US 956323**

1997.10.23 US 956324

1997.10.23 US 956564

(43) Data de publicação do pedido: **2000.08.09**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.01.23**
085/2008

(73) Titular(es):

THE PROCTER & GAMBLE COMPANY

ONE PROCTER & GAMBLE PLAZA CINCINNATI,

OHIO, 45202

US

GENENCOR INTERNATIONAL, INC.

US

(72) Inventor(es):

JOANNE NADHERNY

US

VOLKER SCHELLENBERGER

US

JAMES, T., JR. KELLIS

US

CHRISTIAN PAECH

US

DONALD, P. NAKI

US

(74) Mandatário:

ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS

RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **VARIANTES DE PROTEASES COM MÚLTIPLAS SUBSTITUIÇÕES**

(57) Resumo:

RESUMO**"VARIANTES DE PROTEASES COM MÚLTIPLAS SUBSTITUIÇÕES"**

São descritas novas variantes de proteases derivadas de sequências de DNA de proteases não humanas naturais ou recombinantes. As variantes de proteases, em geral, são obtidas através da modificação *in vitro* de uma sequência de DNA precursora, codificadora da protease natural ou recombinante, para gerar a substituição de uma pluralidade de resíduos de aminoácidos na sequência de aminoácidos da protease precursora. Tais variantes de proteases possuem propriedades que são diferentes das da protease precursora, como seja um desempenho de lavagem alterado. O resíduo de aminoácido substituído corresponde às posições 62, 212, 230, 232, 252 e 257 da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*.

DESCRIÇÃO

"VARIANTES DE PROTEASES COM MÚLTIPLAS SUBSTITUIÇÕES"

Fundamento do invento

As proteases serínicas são um subgrupo de hidrolases de carbonilo. Compreendem uma classe diversa de enzimas tendo uma larga gama de especificidades e funções biológicas. Stroud, R. Sci. Amer., 131:74-88. Apesar da sua diversidade funcional, a maquinaria catalítica das proteases serínicas tem sido tentativamente classificada em pelo menos duas famílias geneticamente distintas: 1) as subtilisinas e 2) as proteases serínicas relacionadas com a quimotripsina de mamíferos e homólogos bacterianos (e.g., tripsina e tripsina de *S. gresius*). Estas duas famílias de proteases serínicas apresentam mecanismos de catálise notavelmente semelhantes. Kraut. J. (1977), Annu. Ver. Biochem., 46:331-358. Ainda, apesar da estrutura primária não estar relacionada, a estrutura terciária destas duas famílias de enzimas junta uma tríada catalítica de aminoácidos conservada, consistindo em serina, histidina e aspartato.

As subtilisinas são proteases serínicas (PM de aproximadamente 27500) que são secretadas em grandes quantidades por uma larga variedade de espécies de *Bacillus* e outros microrganismos. A sequência proteica da

subtilisina foi determinada para pelo menos nove espécies diferentes de *Bacillus*. F.S. et al. (1983), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364:1537-1540. Foi descrita a estrutura cristalográfica tridimensional das subtilisinas de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* e várias variantes naturais de *B. lentus*. Estes estudos indicam que apesar da subtilisina não estar geneticamente relacionada com as proteases serínicas de mamífero, possui uma estrutura de centro activo semelhante. As estruturas de cristalografia de raios X da subtilisina, contendo inibidores peptídicos covalentemente ligados (Robertus, J.D., et al. (1972), Biochemistry, 11:2439-2449) ou complexos com o produto (Robertus J.D. et al. (1976), J. Biol. Chem., 251:1097-1103), também proporcionaram informação relativa ao centro activo e encaixe da ligação do substrato putativo da subtilisina. Ainda, um grande número de estudos de cinética e modificação química tem sido descrito para a subtilisina; Svendsen, B. (1976), Carlsberg Res. Commun., 41:2.37-291; Markland. F.S. Id.) assim como pelo menos um descrição em que a cadeia lateral da metionina no resíduo 222 da subtilisina foi convertido por peróxido de hidrogénio em sulfóxido de metionina (Stauffer D.C., et al. (1965), J. Biol. Chem., 244:5333-5338) e foi realizada extensa mutagénese dirigida (Wells e Estell (1988) TIBS 13:291-297).

Sumário do invento

Um objectivo consiste em proporcionar uma protease compreendendo uma substituição de aminoácido numa

posição de resíduo correspondendo à posição de resíduo 232 da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, em que o aminoácido substituído é a valina.

De preferência, a substituição é A232V, a referida protease possuindo melhor desempenho de lavagem comparativamente com uma protease precursora.

As proteases mais preferidas são séries de substituições seleccionadas do grupo consistindo em substituições nas posições de resíduos correspondendo às posições na Tabela 1 da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*; em que a série de substituições inclui a substituição atrás referida, em que o aminoácido substituto é valina e em que a referida a protease apresenta melhor desempenho de lavagem comparativamente com uma protease precursora.

Tabela 1

76	103	104	212	271								
76	103	104	252	261								
76	103	104	212	258								
4	76	103	104	159	217	252						
12	62	76	103	104	159							
76	103	104	212	268	271							
76	87	103	104	212	271							
76	103	104	212	245	271							
76	103	104	134	141	212	271						
76	103	104	212	236	243	271						
20	62	76	103	104								
68	76	103	104	159	232	236	245					
76	103	104	232	245								

(continuação)

24	68	76	103	104	159	232	236	245				
68	103	104	159	232	236	245	252					
68	76	103	104	159	213	232	236	245	260			
68	103	104	159	232	236	245	248	252				
68	103	104	159	232	236	245						
68	103	104	140	159	232	236	245	252				
43	68	103	104	159	232	238	245	252				
43	68	103	104	159	232	238	245					
43	68	103	104	159	232	236	245	252				
68	67	103	104	159	232	236	245	252	275			
68	103	104	159	232	236	245	257					
68	103	104	116	159	232	236	245					
68	103	104	159	232	236	245	248					
10	68	103	104	159	232	236	245					
68	103	104	159	203	232	236	245					
68	103	104	159	232	236	237	245					
68	76	79	103	104	159	232	236	245				
68	103	104	159	183	232	236	245					
68	103	104	159	174	206	232	236	245				
68	103	104	159	188	232	236	245					
68	103	104	159	230	232	236	245					
68	98	103	104	159	232	236	245					
68	103	104	159	215	232	236	245					
68	103	104	159	232	236	245	248					
68	76	103	104	159	232	236	245					
68	76	103	104	159	210	232	236	245				
68	76	103	104	159	232	236	245	257				
76	103	104	232	236	245	257						
68	103	104	159	232	236	245	257	275				
76	103	104	257	275								
68	103	104	159	224	232	236	245	257				
76	103	104	159	232	236	245	257					
68	76	103	104	159	209	232	236	245				
68	76	103	104	159	211	232	236	245				
12	68	76	103	104	159	214	232	236	245			
68	76	103	104	159	215	232	236	245				
12	68	76	103	104	159	232	236	245				
20	68	76	103	104	159	232	236	245	259			
68	67	76	103	104	159	232	236	245	260			

(continuação)

68	76	103	104	159	232	236	245	261				
76	103	104	232	236	242	245						
68	76	103	104	159	210	232	236	245				
12	48	68	76	103	104	159	232	236	245			
76	103	104	232	236	245							
76	103	104	159	192	232	236	245					
76	103	104	147	159	232	236	245	248	251			
12	68	76	103	104	159	232	236	245	272			
68	76	103	104	159	183	206	232	236	245			
68	76	103	104	159	232	236	245	256				
68	76	103	104	159	206	232	236	245				
27	68	76	103	104	159	232	236	245				
68	76	103	104	116	159	170	185	232	236	245		
61	68	103	104	159	232	236	245	248	252			
43	68	103	104	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	212	232	236	245	248	252			
68	103	104	99	159	184	232	236	245	248	252		
103	104	159	232	236	245	248	252					
68	103	104	159	209	232	236	245	248	252			
68	103	104	109	159	232	236	245	248	252			
20	68	103	104	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	209	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	232	236	245	248	252	261			
68	103	104	159	185	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	210	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	185	210	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	212	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	213	232	236	245	248	252			
68	103	104	213	232	236	245	248	252				
68	103	104	159	215	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	216	232	236	245	248	252			
20	68	103	104	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	173	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	232	236	245	248	251	252			
68	103	104	159	206	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	232	236	245	248	252				
55	68	103	104	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	232	236	245	248	252	255			
68	103	104	159	232	236	245	248	252	256			

(continuação)

68	103	104	159	232	236	245	248	252	260			
68	103	104	159	232	236	245	248	252	257			
68	103	104	159	232	236	245	248	252	258			
8	68	103	104	159	232	236	245	248	252	269		
68	103	104	116	159	232	236	245	248	252	260		
68	103	104	159	232	236	245	248	252	261			
68	103	104	159	232	236	245	248	252	261			
68	76	103	104	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	232	236	245	248	252					
103	104	159	232	236	245	248	252					
68	103	104	159	232	236	245	248	252				
18	68	103	104	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	232	236	245	248	252				
68	76	101	103	104	159	213	218	232	236	245	260	
68	103	104	159	228	232	236	245	248	252			
33	68	76	103	104	159	232	236	245	248	252		
68	76	89	103	104	159	210	213	232	236	245	260	
61	68	76	103	104	159	232	236	245	248	252		
103	104	159	205	210	232	236	245					
61	68	103	104	130	159	232	236	245	248	252		
61	68	103	104	133	137	159	232	236	245	248	252	
61	103	104	133	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	232	236	245	248	252				
68	103	104	159	218	232	236	245	248	252			
61	68	103	104	159	160	232	236	245	248	252		
3	61	68	76	103	104	232	236	245	248	252		
61	68	103	104	159	167	232	236	245	248	252		
97	103	104	159	232	236	245	248	252				
98	103	104	159	232	236	245	248	252				
99	103	104	159	232	236	245	248	252				
101	103	104	159	232	236	245	248	252				
102	103	104	159	232	236	245	248	252				
103	104	106	159	232	236	245	248	252				
103	104	109	159	232	236	245	248	252				
103	104	159	232	236	245	248	252	261				
62	103	104	159	232	236	245	248	252				
103	104	159	184	232	236	245	248	252				
103	104	159	166	232	236	245	248	252				
103	104	159	217	232	236	245	248	252				

(continuação)

20	62	103	104	159	213	232	236	245	248	252		
62	103	104	159	213	232	236	245	248	252			
103	104	159	206	217	232	236	245	248	252			
62	103	104	159	206	232	236	245	248	252			
103	104	130	159	232	236	245	248	252				
103	104	131	159	232	236	245	248	252				
27	103	104	159	232	236	245	248	252				
38	103	104	159	232	236	245	248	252				
38	76	103	104	159	213	232	236	245	260			
68	76	103	104	159	213	232	236	245	260	271		
68	76	103	104	159	209	213	232	236	245	260		
68	76	103	104	159	210	213	232	236	245	260		
68	76	103	104	159	205	213	232	236	245	260		
68	76	103	104	159	210	232	236	245	260			
68	103	104	159	213	232	236	245	260				
76	103	104	159	213	232	236	245	260				
68	103	104	159	209	232	236	245					
68	103	104	159	210	232	236	245					
68	103	104	159	230	232	236	245					
68	103	104	159	126	232	236	245					
68	103	104	159	205	232	236	245					
68	103	104	159	210	232	236	245					
103	104	159	230	236	245							
68	103	104	159	232	236	245	260					
103	104	159	232	236	245							
68	103	104	159	174	232	236	245	257				
68	103	104	159	194	232	236	245	257				
68	103	104	159	209	232	236	245	257				
103	104	159	232	236	245	257						
68	76	103	104	159	213	232	236	245	260	261		
68	103	104	159	232	236	245	257	261				
103	104	159	213	232	236	245	260					
103	104	159	210	232	236	245	248	252				
103	104	159	209	232	236	245	257					
68	76	103	104	159	210	213	232	236	245	260		
12	103	104	159	209	213	232	236	245	260			
103	104	209	232	236	245	257						
103	104	159	205	210	213	232	236	245	260			
103	104	159	205	209	232	236	245	260				

(continuação)

68	103	104	159	205	209	210	232	236	245			
103	104	159	205	209	210	232	236	245	257			
103	104	159	205	209	232	236	245	257				
68	103	104	159	205	209	210	232	236	245	260		
103	104	159	205	209	210	232	236	245				
103	104	159	209	210	232	236	245					
103	104	159	205	210	232	236	245					
68	103	104	128	159	232	236	245					
48	103	104	159	230	236	245						
48	68	103	104	159	209	232	236	245				
48	68	103	104	159	232	236	245	248	252			
48	68	103	104	159	232	236	245	257	261			
102	103	104	159	212	232	236	245	248	252			
12	102	103	104	159	212	232	236	245	248	252		
101	102	103	104	159	212	232	236	245	248	252		
98	102	103	104	159	212	232	236	245	248	252		
102	103	104	159	213	232	236	245	248	252			
103	104	131	159	232	236	245	248	252				
103	104	159	184	232	236	245	248	252				
103	104	159	232	236	244	245	248	252				
62	103	104	159	213	232	236	245	248	252	256		
12	62	103	104	159	213	232	236	245	248	252		
101	103	104	159	185	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	206	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	213	232	236	245	248	252			
98	102	103	104	159	232	236	245	248	252			
101	102	103	104	159	232	236	245	248	252			
98	102	103	104	159	212	232	236	245	248	252		
98	102	103	104	159	212	232	236	248	252			
62	103	104	109	159	213	232	236	245	248	252		
62	103	104	159	212	213	232	236	245	248	252		
62	101	103	104	159	212	213	232	236	245	248	252	
103	104	159	232	245	248	252						
103	104	159	230	245								
62	103	104	130	159	213	232	236	245	248	252		
101	103	104	130	159	232	236	245	248	252			
101	103	104	128	159	232	236	245	248	252			
62	101	103	104	159	213	232	236	245	248	252		
62	103	104	128	159	213	232	236	245	248	252		

(continuação)

62	103	104	128	159	213	232	236	245	248	252		
101	103	104	159	232	236	245	248	252	260			
101	103	104	131	159	232	236	245	248	252			
98	101	103	104	159	232	236	245	248	252			
99	101	103	104	159	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	212	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	209	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	210	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	205	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	230	236	245						
101	103	104	159	194	232	236	245	248	252			
76	101	103	104	159	194	232	236	245	248	252		
101	103	104	159	230	232	236	245	248	252			
82	103	104	159	185	206	213	232	236	245	248	252	271

As variantes de proteases ainda mais preferidas são séries de substituições seleccionadas do grupo consistindo em substituições correspondendo às da Tabela 2 da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*; em que a série de substituições inclui a substituição referida atrás em que o aminoácido substituto é valina.

(continuação)

R10C	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R						
V68A	S103A	V104I	G159D	V203E	A232V	Q236H	Q245R						
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	K237E	Q245R						
V68A	N76D	I79N	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	N183D	A232V	Q236H	Q245R						
V68A	S103A	V104I	G159D	A174V	Q206L	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	S188C	A232V	Q236H	Q245R						
V68A	S103A	V104I	G159D	A230T	A232V	Q236H	Q245R						
V68A	A98T	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R						
V68A	S103A	V104I	G159D	A215T	A232V	Q236H	Q245R						
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248S						
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R						
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210R	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V					
N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	L257V							
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V	R275H					
N76D	S103A	V104I	L257V	R275H									
V68A	S103A	V104I	G159D	T224A	A232V	Q236H	Q245R	L257V					
N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V						
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y200W	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	G211R	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	G211V	A232V	Q236H	Q245R					
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y214L	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A215R	A232V	Q236H	Q245R					
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R					
Q20R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	S259G				

(continuação)

V68A	S87R	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	T260V		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N261G			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N261W			
N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	S242P	Q245R					
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210L	A232V	Q236H	Q245R			
Q12R	A49V	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R		
N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R						
N76D	S103A	V104I	G159D	Y192F	A232V	Q236H	Q245R				
N76D	S103A	V104I	V147I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248S	K251R		
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	A272S		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	N183K	Q206L	A232V	Q236H	Q245R		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	S256R			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R			
K27R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R			
V68A	N76D	S103A	V104I	N116T	G159D	R170S	N185S	A232V	Q236H	Q245R	
G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N43D	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	S212P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	S99N	G159D	N184D	A232V	G1236H	Q245R	N248D	N252K	
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	Q109R	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
G20R	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209F	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N253K	N261D		
V68A	S103A	V104I	G159D	N185D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		

(continuação)

V68A	S103A	V104I	G159D	P210R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	P210T	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	P210S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	N135D	P210L	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	P210L	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S212A	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S212E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	T213E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	T213S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
V68A	A103V	V104I	G159D	T213E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	T213G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A215V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A215R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S216T	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S216V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S216C	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
G20A	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	N173D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	K251V	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252F				
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252L				
P55G	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252F			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T255V			

(continuação)

V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256N			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256E			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256R			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T260R			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	L257R			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	G258D			
18V	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N269D		
V68A	S103A	V104I	N116S	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T260E		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261R			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261D			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
S103A	V104I	G159D	A232S	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236R	Q245R	N248D	N252K				
N18S	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245V	N248D	N252K				
V68A	N76D	S101T	S103A	V104I	G159D	T213R	N218S	A232V	Q236H	Q245R	T260A	
V68A	S103A	V104I	G159D	A228V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
T33S	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	N76D	E89D	S103A	V104I	G159D	P218L	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A	
G61E	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	C1245R	N248D	N252K		
S103A	V104I	G159D	V205I	P210I	A232V	Q236H	Q345R					
G61E	V68A	S103A	V104I	S130A	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
G61E	V68A	S103A	V104I	A133S	Q137R	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
G61E	S103A	V104I	A133V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248G	N252K				

(continuação)

V68A	S103A	V104I	G159D	N218S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	S160V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
S3L	G61E	V68A	N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	S157F	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
G67E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
A68D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S99E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S103A	V104I	S108E	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S103A	V104I	Q109E	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S103A	V104I	G159D	A232V	G1236H	Q245R	N248D	N252K	N261R			
S103A	V104I	Q109R	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N62D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S103A	V104I	G159D	N184D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S103A	V104I	G159D	S166D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S103A	V104I	G159D	L217E	A232V	Q236H	G1245R	N248D	N252K			
G20R	N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S103A	V104I	G159D	Q206R	L217E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S103A	V104I	S130G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S103A	V104I	P131V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
K27N	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
T38G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			

(continuação)

T38A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A	E271G	
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y209W	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A	
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210I	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A	
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	V205I	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A	
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R	T260A		
V68A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A			
N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A			
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	S103A	V104I	G159D	A230V	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	S103A	V104I	G159D	L126F	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	S103A	V104I	G159D	V205I	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R				
S103A	V104I	G159D	A230V	Q236H	Q245R						
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	T260A				
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R						
V68A	S103A	V104I	G159D	A174V	A232V	Q236H	Q245R	L257V			
V68A	S103A	V104I	G159D	A194S	A232V	Q236H	Q245R	L257V			
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	L257V			
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V					
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A	N261W	
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V	N261W			
S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A				
S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	L257V				

(continuação)

V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210L	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A		
Q12R	S103A	V104I	G159D	Y209W	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A			
S103A	V104I	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	L257V						
S103A	V104I	G159D	V205I	P210I	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A			
S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	T260A				
V68A	S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R			
S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R	L257V			
S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	L257V				
V68A	S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R	T260A		
S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R				
S103A	V104I	G159D	V209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R					
S103A	V104I	G159D	V205I	P210I	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	S128L	G159D	A232V	Q236H	Q245R					
A48V	S103A	V104I	G159D	A230V	Q236H	Q245R						
A48V	V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R				
A48V	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K	N252K			
A48V	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V	N261W			
G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
Q12R	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
G102A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S103A	V104I	P131V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	N184S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	N184G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	V244T	Q245R	N248D	N252K				

(continuação)

S103A	V104I	G159D	A232V	G1236H	V244A	Q245R	N248D	N252K				
N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256R		
Q12R	N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	G159D	N185D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	Q206E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	T213Q	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	N248D	N252K			
N62D	S103A	V104I	Q109R	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S103A	V104I	G159D	S212G	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S101G	S103A	V104I	G159D	S212G	T213R	A332V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
S103A	V104I	G159D	A232V	Q245R	N248D	N252K						
S103A	V104I	G159D	A230V	Q245R								
N62D	S103A	V104I	S130G	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	S130G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	S128G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	S128L	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N62D	S101G	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S103A	V104I	S128G	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S103A	V104I	S128L	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S101G	S103A	V104I	P131V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
A98V	S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S99G	S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			

(continuação)

S101G	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	V205I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	A230V	Q236H	Q245R						
S101G	S103A	V104I	G159D	A194P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N76D	S101G	S103A	V104I	G159D	A194P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	G159D	A230V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N62D	S103A	V104I	G159D	N185D	Q206E	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	E271Q

Ainda, outro objectivo é proporcionar sequências de DNA codificadoras de tais proteases, assim como vectores de expressão contendo tais variantes das sequências de DNA.

Ainda, um outro objectivo do invento é proporcionar células hospedeiras transformadas com tais vectores, assim como células hospedeiras que são capazes de expressar tal DNA para produzir as proteases do invento, intracelularmente ou extracelularmente.

É ainda proporcionada uma composição de limpeza compreendendo uma variante de protease do presente invento.

É igualmente proporcionada uma composição para o tratamento de um têxtil compreendendo uma protease do presente invento.

Breve descrição dos desenhos

Figs. 1 A-C descrevem a sequência de DNA e de aminoácidos da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* e um mapa de restrição parcial deste gene.

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

Figs. 3A e 3B descrevem a sequência de aminoácidos de quatro subtilisinas. A linha de cima representa a

sequência de aminoácidos de subtilisina derivada da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* (igualmente por vezes referida como subtilisina BPN'). A segunda linha descreve a sequência de aminoácidos da subtilisina de *Bacillus subtilis*. A terceira linha descreve a sequência de aminoácidos da subtilisina de *B. licheniformis*. A quarta linha descreve a sequência de aminoácidos de subtilisina de *Bacillus lentus* (também referida como subtilisina 309 em PCT WO89/06276). O símbolo * significa a ausência de resíduos de aminoácidos específicos comparativamente com a subtilisina BPN'.

Descrição detalhada do invento

As proteases são hidrolases de carbonilo que, de um modo geral, actuam de forma a clivar ligações peptídicas de proteínas ou péptidos. Como aqui é usado, "protease" significa uma protease natural ou uma protease recombinante. As proteases naturais incluem hidrolase de α -aminoacetilpéptido, hidrolase de peptidilaminoácido, hidrolase de acilamino, carboxipeptidases serínicas, metalocarboxipeptidase, tiol proteinase, carboxilproteinase e metaloproteinase. As proteases serínicas, metalo, tiol e ácidas são incluídas, assim como as endo- e exoproteases.

O presente invento inclui enzimas proteases que são variantes não naturais da hidrolase de carbonilo (proteases do invento) tendo actividade proteolítica, esta-

bilidade, especificidade de substrato, perfil de pH e/ou características de desempenho diferentes comparativamente com a hidrolase de carbonilo precursora de onde deriva a sequência de aminoácidos das proteases do invento. Especificamente, tais proteases possuem uma sequência de aminoácidos não encontrada na natureza, que é derivada por substituição de uma pluralidade de resíduos de aminoácidos de uma protease precursora com aminoácidos diferentes.

As proteases úteis aqui descritas incluem a substituição de qualquer um dos dezanove L-aminoácidos naturais nas posições de resíduos de aminoácidos designadas. Tais substituições podem ser feitas em qualquer subtilisina precursora (procariótica, eucariótica, de mamífero, etc.). Ao longo deste pedido é feita referência a vários aminoácidos através dos códigos comuns de uma e três letras. Tais códigos estão identificados em Dale, M.W. (1989), "Molecular Genetics of Bacteria", John Wiley & Sons. Ltd., Apêndice B.

As proteases úteis aqui descritas são, de preferência, derivadas de uma subtilisina de *Bacillus*. Mais de preferência, as proteases do invento derivam da subtilisina de *Bacillus lentus* e/ou subtilisina 309.

As subtilisinas são proteases bacterianas ou fúngicas que, de um modo geral, actuam de forma a clivar as ligações peptídicas de proteínas ou péptidos. Como aqui é

usado, "subtilisina" significa uma subtilisina natural ou uma subtilisina recombinante. É conhecida uma série de subtilisinas naturais produzidas, e muitas vezes secretadas, por várias espécies microbianas. As sequências de aminoácidos dos membros desta série não são totalmente homólogas. No entanto, a subtilisina nesta série apresenta o mesmo tipo ou um tipo semelhante de actividade proteolítica. Esta classe de proteases serínicas partilha uma sequência de aminoácidos comum que define uma tríade catalítica que as distingue das proteases serínicas da classe relacionada com quimotripsina. As subtilisinas e as proteases serínicas relacionadas com quimotripsina possuem ambas uma tríade catalítica compreendendo aspartato, histidina e serina. Nas proteases relacionadas com subtilisina a ordem relativa destes aminoácidos, lendo do extremo amina para o extremo carboxilo, é aspartato-histidina-serina. Nas proteases relacionadas com quimotripsina, a ordem relativa, no entanto, é histidina-aspartato-serina. Assim, a subtilisina aqui refere-se a uma protease serínica tendo a tríade catalítica das proteases relacionadas com subtilisina. Exemplos incluem, mas não estão limitados às subtilisinas identificadas na Fig. 3 aqui apresentada. De um modo geral e para fins do presente invento, a numeração dos aminoácidos nas proteases corresponde aos números atribuídos à subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* apresentada na Fig. 1.

"Subtilisina recombinante" ou "protease recombinante" refere-se a uma subtilisina ou protease em que a

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

As "subtilisinas não humanas" e o DNA codificador das mesmas podem ser obtidos a partir de qualquer organismo procariótico e eucariótico. Exemplos adequados de organismos procarióticos incluem organismos gram negativos tais como *E. coli* ou *Pseudomonas* e bactérias gram positivas tais como *Micrococcus* ou *Bacillus*. Exemplos de organismos eucarióticos a partir dos quais a subtilisina e os seus genes podem ser obtidos incluem leveduras, tais como *Saccharomyces cerevisiae*, fungos tais como *Aspergillus sp.*

Uma protease do invento possui uma sequência de aminoácidos que deriva da sequência de aminoácidos de uma "protease precursora". As proteases precursoras incluem proteases naturais e proteases recombinantes. A sequência de aminoácidos da protease do invento "deriva" da sequência de aminoácidos da protease precursora, através da substituição de um ou mais aminoácidos da sequência de aminoácidos precursora. Tal modificação é da "sequência de

DNA precursora" que codifica a sequência de aminoácidos da protease precursora, em lugar da manipulação da enzima protease precursora *per se*. Métodos adequados para tal manipulação da sequência de DNA precursora incluem métodos aqui descritos, assim como métodos conhecidos dos familiarizados com a matéria (ver, por exemplo, EP 0328299, WO89/06297 e as patentes US e pedidos de patentes já aqui referidos).

As substituições específicas de aminoácidos numa ou mais posições de resíduos correspondendo às posições de resíduos seleccionadas do grupo consistindo em 62, 212, 230, 232, 252 e 257 de *Bacillus amyloliquefaciens* estão aqui identificadas.

As proteases preferidas do invento são as que possuem combinações nas posições correspondendo às posições da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* na Tabela 1, em que as combinações de substituições incluem as substituições referidas atrás em que o aminoácido substituto é valina, em que a referida protease apresenta um desempenho melhorado comparativamente com a protease precursora.

As proteases mais preferidas são as que possuem combinações de substituições correspondendo às da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* na Tabela 2, em que as combinações de substituições incluem a substituição referida atrás em que o aminoácido substituto é valina e em

que a referida protease apresenta um melhor desempenho de lavagem comparativamente com um precursor da protease.

Outras proteases preferidas são as que possuem combinações de substituições nas posições de resíduos correspondentes às posições da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* na Tabela 3, em que as combinações de substituições incluem a substituição atrás referida em que o aminoácido substituto é valina e em que a referida protease apresenta melhor desempenho de lavagem comparativamente com uma protease precursora.

Tabela 3

68	103	104	159	232	236	245	252					
68	76	103	104	159	213	232	236	245	260			
68	103	104	159	232	236	245	248	252				
68	103	104	159	232	236	245						
68	103	104	140	159	232	236	245	252				
43	68	103	104	159	232	236	245	252				
43	68	103	104	159	232	236	245					
68	103	104	159	232	236	245	257					
68	76	103	104	159	210	232	236	245				
68	103	104	159	224	232	236	245	257				
76	103	104	159	232	236	245	257					
68	76	103	104	159	211	232	236	245				
12	68	76	103	104	159	214	232	236	245			
68	76	103	104	159	215	232	236	245				
12	68	76	103	104	159	232	236	245				
26	68	76	103	104	159	232	236	245	259			
68	76	87	103	104	159	232	236	245	260			

(continuação)

68	76	103	104	159	232	236	245	261				
12	48	68	76	103	104	159	232	236	245			
76	103	104	159	192	232	236	245					
76	103	104	147	159	232	236	245	248	251			
12	68	76	103	104	159	232	236	245	272			
68	76	103	104	159	183	206	232	236	245			
68	76	103	104	159	232	236	245	256				
68	76	103	104	159	206	232	236	245				
27	68	76	103	104	159	232	236	245				
68	103	104	159	212	232	236	245	248	252			
103	104	159	232	236	248	248	252					
68	103	104	159	209	232	236	245	248	252			
68	103	104	109	159	232	236	245	248	252			
20	68	103	104	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	209	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	210	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	212	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	213	232	236	245	248	252			
68	103	104	213	232	236	245	248	252				
68	103	104	159	215	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	218	232	236	245	248	252			
20	68	103	104	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	232	236	245	248	252	255			
68	103	104	159	232	236	245	248	252	256			
68	103	104	159	232	236	245	248	252	260			
68	103	104	159	228	232	236	245	248	252			
68	76	89	103	104	159	210	213	232	236	245	280	
68	103	104	159	218	232	236	245	248	252			

Estes números das posições de aminoácidos referem-se aos atribuídos à subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* apresentada na Fig. 1. O invento, no entanto, não está limitado à mutação desta subtilisina particular, mas estende-se às proteases precursoras contendo resíduos de aminoácidos nas posições "equivalentes" aos resíduos

particulares identificados na subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. Numa realização preferida do presente invento, a protease precursora é a subtilisina de *Bacillus lentus* e as substituições são feitas nas posições de resíduos de aminoácidos equivalentes em *B. lentus* correspondendo às apresentadas atrás.

Uma posição de resíduo (aminoácido) de uma protease precursora é equivalente a um resíduo de *Bacillus amyloliquefaciens* caso seja homóloga (*i.e.*, correspondendo à mesma posição na estrutura primária ou terciária) ou análoga a um resíduo específico ou porção daquele resíduo na subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* (*i.e.*, tendo a mesma capacidade funcional ou semelhante para combinar, reagir ou interagir quimicamente).

Para estabelecer homologia com a estrutura primária, a sequência de aminoácidos de uma protease precursora é directamente comparada com a sequência primária da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* e, particularmente, com uma série de resíduos conhecidos como invariantes nas subtilisinas para as quais se conhece a sequência. Por exemplo, a Fig. 2 apresentada mostra os resíduos conservados entre a subtilisina de *B. amyloliquefaciens* e a subtilisina de *B. lentus*. Após alinhamento dos resíduos conservados, permitindo as inserções e deleções necessárias de forma a manter o alinhamento (*i.e.*, evitando a eliminação dos resíduos conservados através de deleção e inserção arbitrárias), são definidos os resíduos equivalentes a ami-

noácidos particulares na sequência primária da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. O alinhamento de resíduos conservados, de preferência, deverá conservar 100% de tais resíduos. No entanto, o alinhamento de mais de 75%, ou mesmo 50%, dos resíduos conservados é também adequado para definir resíduos equivalentes. A conservação da tríade catalítica, Asp32/His64/Ser221 deverá ser mantida. Siezen *et al.* refere-se ao agrupamento com subtilases ou proteases serínicas tipo subtilisina.

Por exemplo, na Fig. 3, as sequências de aminoácidos da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* (*carlsbergensis*) e *Bacillus lentus* são alinhadas para proporcionar um máximo de homologia entre sequências de aminoácidos. Uma comparação destas sequências, mostra que existe uma série de resíduos conservados em cada sequência. Estes resíduos conservados (como entre BPN' e *B. lentus*) estão identificados na Fig. 2.

Estes resíduos conservados podem, assim, ser usados para definir os resíduos de aminoácidos equivalentes correspondentes da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* noutras subtilisinas tais como a subtilisina de *Bacillus lentus* (Publicação PCT N° W89/06279 publicada em 13 de Julho, 1989), a enzima precursora da protease aqui preferida, ou a subtilisina referida como PB92 (EP0328299) que é altamente homóloga da subtilisina preferida de *Bacillus lentus*. As sequências de aminoácidos de algumas

destas subtilisinas estão alinhadas nas Figs. 3A e 3B com a sequência de *Bacillus amyloliquefaciens* para produzir um máximo de homologia dos resíduos conservados. Como pode ser observado, existe uma série de deleções na sequência de *Bacillus lentus* comparativamente com a subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. Assim, por exemplo, o aminoácido equivalente a Val165 da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* nas outras subtilisinas é isoleucina para *B. lentus* e *B. licheniformis*.

"Resíduos equivalentes" podem também ser definidos, determinando a homologia ao nível da estrutura terciária para uma protease precursora cuja estrutura terciária foi determinada por cristalografia de raios X. Os resíduos equivalentes são definidos como aqueles cujas coordenadas atômicas de duas ou mais das principais cadeias de átomos de um resíduo de aminoácido particular da protease precursora e da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* (N em N, CA em CA, C em C e O em O) distam em 0,13 nm, e de preferência em 0,1 nm, após o alinhamento. O alinhamento é conseguido após o melhor modelo ter sido orientado e posicionado para dar a máxima sobreposição possível de coordenadas atômicas dos átomos da proteína, que não sejam hidrogénio, da protease em questão com a subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. O melhor modelo é o modelo cristalográfico que dá o factor R mais baixo para os dados de difracção experimental na maior resolução disponível.

$$R\ factor = \frac{\sum_h |F_o(h)| - |F_c(h)|}{\sum_h |F_o(h)|}$$

Os resíduos equivalentes, que são funcionalmente análogos a um resíduo específico da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, estão definidos como os aminoácidos da protease precursora que podem adoptar uma conformação tal que alteram, modificam ou contribuem para a estrutura da proteína, ligação ao substrato ou catálise numa forma definida e atribuída a um resíduo específico da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. Ainda, são os resíduos da protease precursora (para a qual uma estrutura terciária foi obtida por cristalografia de raios X) que ocupam uma posição análoga até ao ponto de, apesar dos átomos da cadeia principal de determinado resíduo poderem não satisfazer os critérios de equivalência com base na ocupação de uma posição homóloga, as coordenadas atómicas de pelo menos dois átomos da cadeia lateral do resíduo estão situados dentro de 0,13 nm dos átomos correspondentes da cadeia lateral da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. As coordenadas da estrutura tridimensional da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* estão descritas na Publicação EPO N° 0251446 (equivalente à Patente US 5182204) e podem ser usadas como descrito atrás para determinar resíduos equivalentes ao nível da estrutura terciária.

Alguns dos resíduos identificados para substituição são resíduos conservados, enquanto que outros não o

são. No caso dos resíduos que não são conservados, a substituição de um ou mais aminoácidos está limitada a substituições que produzem uma variante com uma sequência de aminoácidos que não corresponde a uma encontrada na natureza. No caso dos resíduos conservados, tais substituições não deverão resultar numa sequência natural. As proteases do presente invento incluem as formas maduras das proteases assim como as pró- e prepró-formas de tais proteases. As prepró-formas são a construção preferida, uma vez que facilitam a expressão, secreção e maturação das proteases.

Pró-sequência refere-se a uma sequência de aminoácidos ligada à porção N-terminal da forma madura de uma protease que, quando removida, resulta no aparecimento da forma "madura" da protease. Na natureza são encontradas muitas enzimas proteolíticas como produtos de tradução da pró-enzima e na ausência de processamento pós-traducional, são expressas nesta forma. Uma pró-sequência preferida para a produção de proteases do invento é a pró-sequência putativa da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, se bem que outras pró-sequências de proteases possam ser usadas.

Uma "sequência sinal" ou "pré-sequência" refere-se a qualquer sequência de aminoácidos ligada à porção N-terminal de uma protease ou à porção N-terminal de uma pró-protease que pode participar na secreção da forma madura ou

da pró-protease. Esta definição da sequência sinal é funcional, pretende incluir todas as sequências de aminoácidos codificadas pela porção N-terminal do gene da protease que participam na efectuação da secreção da protease em condições nativas. O presente invento utiliza tais sequências para efectuar a secreção das proteases como aqui definido. Uma sequência sinal possível compreende os primeiros sete resíduos de aminoácidos da sequência sinal da subtilisina de *Bacillus subtilis* fundida com a restante sequência sinal da subtilisina de *Bacillus lentus* (ATCC 21536).

A forma "prepró" de uma protease do invento consiste na forma madura da protease tendo uma pró-sequência operacionalmente ligada ao extremo amina da protease e uma sequência "pré" ou "sinal" operacionalmente ligada ao extremo amina da pró-sequência.

"Vector de expressão" refere-se a uma construção de DNA contendo uma sequência de DNA, que está operacionalmente ligada a uma sequência de controlo adequada, capaz de efectuar a expressão do referido DNA num hospedeiro adequado. Tais sequências de controlo incluem um promotor para efectuar a transcrição, uma sequência operadora opcional para controlar tal transcrição, uma sequência codificadora de locais de ligação do mRNA ao ribossoma e sequências que controlam a terminação da transcrição e da tradução. O vector pode ser um plasmídeo, uma partícula

fágica, ou simplesmente uma potencial inserção genómica. Uma vez usado para transformar um hospedeiro adequado, o vector pode replicar-se e funcionar independentemente do genoma do hospedeiro, ou pode, nalguns casos, integrar-se no próprio genoma. Na presente especificação, "plasmídeo" e "vector" são por vezes usados indiscriminadamente uma vez que o plasmídeo é presentemente a forma de vector mais vulgarmente usada. No entanto, o invento destina-se a incluir outras formas de vectores de expressão que servem funções equivalentes e que são, ou ficarão, conhecidos na área.

As "células hospedeiras" usadas no presente invento, de um modo geral, são hospedeiros procarióticos ou eucarióticos que preferencialmente foram manipulados pelos métodos descritos na Patente US RE 34606 para os tornar incapazes de secretarem endoprotease enzimaticamente activa. Uma célula hospedeira preferida para a expressão da protease é a estirpe de *Bacillus* BG2036 que é deficiente em protease neutra enzimaticamente activa e protease alcalina (subtilisina). A construção da estirpe BG2036 está descrita detalhadamente na Patente US 5264366. Outras células hospedeiras para a expressão de proteases incluem *Bacillus subtilis* 1168 (também descrito na Patente US RE 34606 e na Patente US 5264366), assim como qualquer estirpe adequada de *Bacillus* como seja *B. licheniformis*, *B. lentus*, etc.

As células hospedeiras são transformadas ou transfectadas com vectores construídos usando técnicas de

DNA recombinante. Tais células hospedeiras transformadas são capazes de replicarem vetores codificadores das variantes de proteases ou de expressarem a variante de protease pretendida. No caso dos vetores que codificam a forma pré ou prepró da variante de protease, tais variantes, quando expressas, são tipicamente secretadas pela célula hospedeira para o meio de cultura da célula hospedeira.

"Ligadas operacionalmente", quando descreve a relação entre duas regiões de DNA, simplesmente significa que estão funcionalmente relacionadas uma com a outra. Por exemplo, uma pré-sequência está operacionalmente ligada a um péptido se funcionar como sequência sinal, participando na secreção da forma madura da proteína, mais provavelmente envolvendo a clivagem da sequência sinal. Um promotor está operacionalmente ligado a uma sequência codificadora se controlar a transcrição da sequência: um local de ligação ao ribossoma está operacionalmente ligado a uma sequência codificadora se estiver posicionado de forma a permitir a sua tradução.

Os genes codificadores da protease precursora natural podem ser obtidos de acordo com os métodos gerais conhecidos dos familiarizados com a matéria. Os métodos, de um modo geral, compreendem a síntese de sondas marcadas tendo sequências putativas codificadoras de regiões da protease com interesse, preparação de bibliotecas genómicas a partir de organismos que expressam a protease e rastreio

das bibliotecas relativamente ao gene com interesse através de hibridação com as sondas. Os clones que deram hibridação positiva foram então mapeados e sequenciados.

A protease clonada foi então usada para transformar uma célula hospedeira de forma a expressar a protease. O gene da protease foi então ligado a um plasmídeo de elevado número de cópias. Este plasmídeo replica-se em hospedeiros uma vez que possui os elementos conhecidos necessários à replicação do plasmídeo: um promotor operacionalmente ligado ao gene em questão (que pode ser fornecido como promotor homólogo próprio do gene se for reconhecido, *i.e.*, transcrito, pelo hospedeiro), uma terminação da transcrição e uma região de poliadenilação (necessária à estabilidade do mRNA transcrito pelo hospedeiro de onde deriva o gene da protease em determinadas células hospedeiras eucarióticas) que é exógena ou fornecida pela região terminadora endógena do gene da protease e, de preferência, um gene de selecção como seja um gene de resistência a antibióticos que permita a manutenção contínua de células hospedeiras transfectadas com plasmídeo, através do crescimento em meio contendo antibiótico. Os plasmídeos de elevado número de cópias também possuem uma origem de replicação para o hospedeiro, permitindo assim que grande número de plasmídeos sejam gerados no citoplasma sem limitações cromossómicas. No entanto, está dentro deste âmbito integrar múltiplas cópias do gene da protease no genoma do hospedeiro. Isto é facilitado pelos microrganismos

mos procarióticos e eucarióticos que são particularmente susceptíveis a recombinação homóloga.

O gene pode ser um gene natural de *B. lentus*. Como alternativa, pode ser produzido um gene sintético codificador de uma protease precursora natural ou mutante. Nesta última abordagem, é determinada a sequência do DNA e/ou a sequência de aminoácidos da protease precursora. Múltiplos fragmentos de DNA sintéticos de cadeia simples sobreponíveis são depois sintetizados, os quais quando hibridados e ligados produzem um DNA sintético codificador da protease precursora. Um exemplo da construção do gene sintético está descrito no Exemplo 3 da Patente US 5204015.

Uma vez clonado o gene natural ou sintético da protease precursora, são efectuadas modificações para a utilização do gene para além da síntese da protease precursora natural. Tais modificações incluem a produção de proteases recombinantes como descrito na Patente US RE34606 e Publicação EPO N° 0251446 e a produção das variantes da protease aqui descritas.

O método de mutagénese com cassete que se segue pode ser usado para facilitar a construção de variantes da protease do presente invento, se bem que outros métodos possam ser usados. Em primeiro lugar, é obtido e sequenciado o gene natural codificador da protease, na sua totalidade ou em parte. Depois a sequência é varrida relativamente a um ponto no qual se pretenda fazer uma

mutação (deleção, inserção ou substituição) de um ou mais aminoácidos na enzima codificada. As sequências que flanqueiam este ponto são avaliadas relativamente à presença de locais de restrição para substituição de um pequeno fragmento do gene com um conjunto de oligonucleótidos que, quando expressos codificarão vários mutantes. Tais locais de restrição são, de preferência, locais únicos dentro do gene da protease, de forma a facilitar a substituição do fragmento de gene. No entanto, pode ser usado qualquer local de restrição conveniente que não seja redundante no gene da protease, desde que os fragmentos de gene gerados por digestão de restrição possam ser montados na sequência adequada. Se os locais de restrição não estiverem presentes nas localizações dentro de uma distância conveniente relativamente ao ponto seleccionado (entre 10 e 15 nucleótidos), tais locais são gerados através da substituição de nucleótidos no gene, de forma que nem a grelha de leitura nem os aminoácidos codificados sejam alterados na construção final. A mutação do gene de forma a alterar a sua sequência de acordo com a sequência pretendida é conseguida através da extensão da sequência iniciadora M13 de acordo com métodos que são do conhecimento geral. A tarefa de localização de regiões flanqueantes adequadas e avaliação das alterações necessárias para chegar a duas sequências de locais de restrição convenientes é feita de rotina através da redundância do código genético, um mapa das enzimas de restrição do gene e do grande número de diferentes locais para enzimas de restrição. Note-se que se estiver disponível um local de restrição flanqueante

conveniente, o método atrás referido necessita de ser usado apenas conjuntamente com a região flanqueante que não possui um local.

Uma vez clonado o DNA natural ou sintético, os locais de restrição flanqueantes das posições a serem mutadas são digeridos com as enzimas de restrição cognatas e uma pluralidade de cassetes de oligonucleótidos complementares dos extremos são ligadas ao gene. A mutagénese é simplificada através deste método devido a todos os oligonucleótidos poderem ser sintetizados de forma a terem os mesmos locais de restrição e não sendo necessários adaptadores sintéticos para criar os locais de restrição.

Como aqui é usado, a actividade proteolítica é definida como a taxa de hidrólise das ligações peptídicas por miligrama de enzima activa. Existem muitos procedimentos conhecidos para a medição da actividade proteolítica (K.M. Kalisz. "Microbial proteinases." Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, A. Fechter ed., 1988). Para além, ou como método alternativo, à actividade proteolítica modificada, as enzimas do presente invento podem ter outras propriedades modificadas tais como Km, Kcat, razão Kcat/Km e/ou perfil do pH da actividade modificado. Estas enzimas podem ser alteradas em função de um substrato particular que se antecipa esteja presente, por exemplo, na preparação de péptidos ou para processos hidrolíticos, tais como utilizações em lavandarias.

Num aspecto do invento, o objectivo é obter, de acordo com o presente invento, proteases tendo alterado o desempenho na lavagem, de preferência melhorado, comparativamente com uma protease precursora em pelo menos uma formulação de detergente e/ou em pelo menos uma série de condições de lavagem.

Existe uma variedade de condições de lavagem incluindo várias formulações de detergentes, volume de água de lavagem, temperatura da água de lavagem e duração do tempo de lavagem a que uma protease variante possa estar exposta. Por exemplo, as formulações de detergentes usadas em diferentes áreas possuem diferentes concentrações dos seus principais componentes presentes na água de lavagem. Por exemplo, um detergente Europeu tipicamente possui cerca de 4500-5000 ppm de componentes do detergente na água de lavagem, enquanto um detergente Japonês tipicamente tem aproximadamente 667 ppm de componentes do detergente na água de lavagem. Na América do Norte, particularmente nos Estados Unidos, um detergente tipicamente tem cerca de 975 ppm de componentes do detergente presentes na água de lavagem.

Um sistema com uma baixa concentração de detergente inclui detergentes com menos de aproximadamente 800 ppm de componentes do detergente presentes na água de lavagem. Os detergentes Japoneses são, tipicamente, considerados um sistema de baixa concentração de detergente uma

vez que aproximadamente 667 ppm de componentes do detergente estão presentes na água de lavagem.

Uma concentração de detergente média inclui detergentes em que cerca de 800 ppm a cerca de 2000 ppm de componentes do detergente estão presentes na água de lavagem. Os detergentes na América do Norte são, de um modo geral, considerados sistemas de concentração média de detergente, uma vez que aproximadamente 975 ppm de componentes do detergente estão presentes na água de lavagem. O Brasil tipicamente tem aproximadamente 1500 ppm de componentes do detergente presentes na água de lavagem.

Um sistema de concentração elevada de detergente inclui detergentes com mais de 2000 ppm de componentes do detergente presentes na água de lavagem. Os detergentes Europeus são, de um modo geral, considerados como sistemas de concentração elevada de detergentes, uma vez que possuem aproximadamente 4500-5000 ppm de componentes do detergente na água de lavagem.

Os detergentes da América latina são, de um modo geral, detergentes à base de fosfatos e a gama de detergentes usados na América Latina podem cair nas concentrações média e alta de detergentes, uma vez que variam na gama de 1500 ppm a 6000 ppm de componentes do detergente na água de lavagem. Como atrás referido, o Brasil tipicamente tem aproximadamente 1500 ppm de componentes do detergente na água de lavagem. No entanto,

outras regiões geográficas com detergentes à base de fosfatos, não limitadas a outros países da América Latina, podem ter sistemas de concentração elevada de detergente até cerca 6000 ppm de componentes do detergente na água de lavagem.

Face ao que foi dito, é evidente que, a nível mundial, as concentrações da composição do detergente nas soluções de lavagem típicas varia entre menos de 800 ppm da composição detergente ("geografias de baixa concentração de detergente"), por exemplo cerca de 667 ppm no Japão, e cerca de 800 ppm a cerca de 2000 ppm ("geografias de concentração média de detergente"), por exemplo cerca de 975 ppm nos EUA a cerca de 1500 ppm no Brasil, até mais de cerca de 2000 ppm ("geografias de elevada concentração de detergente"), por exemplo cerca de 4500 ppm a cerca de 5000 ppm na Europa e cerca de 6000 ppm nas geografias à base de fosfatos elevados.

As concentrações das soluções de lavagem típicas são determinadas empiricamente. Por exemplo, nos EUA, uma máquina de lavar típica leva um volume de aproximadamente 64,4 l de solução de lavagem. Assim, para se obter uma concentração de aproximadamente 975 ppm de detergente na solução de lavagem deve ser adicionado cerca de 62,79 g de composição de detergente aos 64,4 l da solução de lavagem. Esta quantidade é a quantidade típica medida na água de lavagem pelo consumidor usando o copo oferecido com o detergente.

Ainda outro exemplo, diferentes geografias usam diferentes temperaturas de lavagem. A temperatura da água de lavagem é no Japão, tipicamente, inferior à usada na Europa.

Assim, um aspecto do presente invento inclui uma protease que apresenta melhor desempenho em pelo menos uma série de condições de lavagem.

Num outro aspecto do invento, foi determinado que a substituição de um aminoácido numa posição de resíduo correspondente à posição de resíduo da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* é importante no melhoramento do desempenho de lavagem da enzima, em que o aminoácido substituto é valina.

Estas substituições são, de preferência, feitas na subtilisina de *Bacillus lentus* (recombinante ou nativa), se bem que as substituições possam ser feitas em qualquer protease de *Bacillus*.

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

Muitas das proteases do invento são úteis na formulação de várias composições de detergentes ou em formulações de produtos para cuidados pessoais, tais como champôs ou loções. Uma série de compostos conhecidos são tensioactivos adequados úteis nas composições compreendendo os mutantes das proteases do invento. Estes incluem detergentes não iónicos, aniónicos, catiónicos ou zwitteriónicos, como descrito em US 4404128 de Barry J. Anderson e US 4261868 de Jiri Flora, *et al.* Uma formulação de detergente adequada está descrita no Exemplo 7 da Patente US 5204015. A área está familiarizada com as diferentes formulações que podem ser usadas como composições de limpeza. Para além das composições de limpeza típicas, é facilmente compreendido que as proteases do presente invento podem ser usadas para qualquer fim em que sejam usadas proteases nativas ou selvagens. Assim, estas proteases podem ser usadas, por exemplo, em aplicações de sabão em barra ou líquido, formulações para máquinas de lavar loiça, soluções ou produtos para limpeza de lentes de contacto, hidrólise de péptidos, tratamento de lixo, aplicações têxteis, como enzimas de clivagem de fusões na produção de proteínas, etc. As proteases do presente invento podem ter melhor desempenho numa composição de detergente (comparativamente com o precursor). Como aqui é usado, melhor desempenho num detergente é definido como um aumento da limpeza de determinadas colorações sensíveis a determinadas enzimas tais como relva ou sangue, conforme determinado pela avaliação convencional após um ciclo de lavagem padrão.

As proteases do invento podem ser formuladas em detergentes em pó e líquidos, tendo pH entre 6,5 e 12,0, em níveis de cerca de 5% (de preferência 0,1% a 0,5%) por peso. Estas composições de limpeza dos detergentes podem também incluir outras enzimas tais como proteases, amilases, celulasas, lipases ou endoglicosidases conhecidas, assim como bases de detergentes e estabilizadores.

A adição das proteases do invento a composições de limpeza convencionais não cria qualquer limitação de uso especial. Por outras palavras, quaisquer temperaturas e pHs adequados para o detergente, são também adequados para as presentes composições, desde que na gama de pH referida e que a temperatura seja abaixo da temperatura de desnaturação da protease. Ainda, as proteases do invento podem ser usadas por si sós numa composição de limpeza sem detergentes ou em combinação com bases de detergente e estabilizadores.

O presente invento também está relacionado com composições de limpeza contendo as proteases do invento. As composições de limpeza podem ainda conter aditivos que são normalmente usados nas composições de limpeza. Estes podem ser seleccionados entre branqueadores, tensioactivos, bases, enzimas e catalisadores de branqueadores, mas não lhe estando limitados. Será facilmente aparente para os familiarizados com a área quais os aditivos que são

adequados para inclusão nas composições. A lista aqui apresentada não pretende ser exaustiva e deverá ser considerada como exemplos de aditivos adequados. Será igualmente óbvio para os familiarizados com a área a utilização de aditivos que sejam compatíveis com as enzimas e outros componentes na composição, por exemplo, tensioactivo.

Quando presente, a quantidade do aditivo presente na composição de limpeza varia entre cerca de 0,01% e cerca de 99,9%, de preferência cerca de 1% e cerca de 95%, mais de preferência entre cerca de 1% e cerca de 80%.

Um aspecto do invento é uma composição para o tratamento de um têxtil que inclua proteases variantes do presente invento. A composição pode ser usada para tratar, por exemplo, seda ou lã como descrito em publicações, tais como RD 216034; EP 134267; US 4533359 e EP 344259.

O que se segue é apresentado como exemplo e não deve ser pensado como uma limitação do âmbito das reivindicações.

Exemplo 1

Um grande número de variantes de proteases foi produzido e purificado usando métodos conhecidos na área. Todas as mutações foram feitas na subtilisina de *Bacillus lentus* GG35. As variantes estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4

[illegible]

(continuação)

[illegible]

(continuação)

[illegible]

(continuação)

[illegible]

(continuação)

[illegible]

(continuação)

N43K	V88A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R					
N43D	V88A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K				
V88A	S87G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N253K	R276S			
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R	N248S	L262M				
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	A215V	M222S	Q245R					
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	V237A	Q245R	L262S				
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	A215T	M222S	Q245R					
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R	N261D					
N78D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R							
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	N218D	M222S	Q245R	L262S	N269D			
Q12R	S87P	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R	K251Q				
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	R170S	N185D	M222S	N243D	Q245R			
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R	V268A					
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	P210S	Q245R					
V88A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V					
V88A	S103A	V104I	N116D	G159D	A232V	Q236H	Q245R					
V88A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D					
R10C	V88A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R					
V86A	S103A	V104I	G159D	V203E	A232V	Q236H	Q245R					
V88A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	K237E	Q245R					
V88A	N76D	I79N	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R				
V86A	S103A	V104I	G159D	N183D	A232V	Q236H	Q245R					
V88A	S103A	V104I	G159D	A174V	Q208L	A232V	Q236H	Q245R				
V88A	S103A	V104I	G159D	S168C	A232V	Q236H	Q245R					
V88A	S103A	V104I	G159D	A230T	A232V	Q236H	Q245R					
V88A	A88T	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R					

(continuação)

V68A	S103A	V104I	G159D	A215T	A232V	Q236H	Q245R						
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248S						
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R						
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210R	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V					
N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	L257V							
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V	R275H					
N76D	S103A	V104I	L257V	R275H									
V68A	S103A	V104I	G159D	T224A	A232V	Q236H	Q245R	L257V					
N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V						
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y200W	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	G211R	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	G211V	A232V	Q236H	Q245R					
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y214L	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A215R	A232V	Q236H	Q245R					
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R					
G20R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	S250G				
V68A	S67R	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	T260V				
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N261G					
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N281W					
N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	S242P	Q245R							
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210L	A232V	Q236H	Q245R					
Q12R	A48V	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R				
N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R								
N76D	S103A	V104I	G159D	Y182F	A232V	Q236H	Q245R						
N76D	S103A	V104I	V147I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248S	K251R				

(continuação)

Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q238H	Q245R	A273S		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	N183K	Q238L	A232V	Q238H	Q245R		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q238H	Q245R	S253R			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q238H	Q245R			
K27R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q238H	Q245R			
V68A	N76D	S103A	V104I	N118T	G159D	R170S	N185S	A232V	Q238H	Q245R	
G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K		
N43D	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	S212P	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	S69N	G159D	N184D	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K	
S103A	V104I	G159D	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K				
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	Q108R	G159D	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K		
G20R	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209F	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K	N261D		
V68A	S103A	V104I	G159D	N186D	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	P210R	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	P210T	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	P210S	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	N165D	P210L	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K	
V68A	S103A	V104I	G159D	P210L	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	S212A	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	S212E	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	T213E	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K		

(continuação)

V68A	S103A	V104I	T213S	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K				
V68A	A103V	V104I	G159D	T213E	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	T213G	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A216V	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A216R	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S218T	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S216V	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S218C	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K			
G20A	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	N173D	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N251V	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N253F				
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N253L				
F55G	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252F			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K	T255V			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K	S258N			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K	S258E			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K	S258R			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K	T258R			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K	L257R			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K	G258D			
18V	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K	N268D		
V68A	S103A	V104I	N116S	G159D	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K	T268E		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K				

(continuação)

V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261D		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	A232S	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236R	Q245R	N248D	N252K			
N18S	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245V	N248D	N252K			
V68A	N76D	S101T	S103A	V104I	G159D	T213R	N218S	A232V	Q236H	Q245R	T260A
V68A	S103A	V104I	G159D	A228V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
T33S	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
V68A	N76D	E99D	S103A	V104I	G159D	P210L	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A
G61E	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
S103A	V104I	G159D	V205I	P210I	A232V	Q236H	Q245R				
G61E	V68A	S103A	V104I	S130A	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
G61E	V68A	S103A	V104I	A133S	Q137R	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K
G61E	S103A	V104I	A133V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	N218G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	S160V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
S3L	G61E	V68A	N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	S167F	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
G97E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
A98D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S99E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			

(continuação)

G103A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	M248D	N252K				
S103A	V104I	S106E	G159D	A232V	Q236H	Q245R	M248D	N252K				
S103A	V104I	Q109E	G159D	A232V	Q236H	Q245R	M248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	M248D	N252K	N261R				
S103A	V104I	Q109R	G159D	A232V	Q236H	Q245R	M248D	N252K				
N62D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	M248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	N194D	A232V	Q236H	Q245R	M248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	S159D	A232V	Q236H	Q245R	M248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	L217E	A232V	Q236H	Q245R	M248D	N252K				
G20R	N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	M248D	N252K			
S103A	V104I	G159D	Q206R	L217E	A232V	Q236H	Q245R	M248D	N252K			
N62D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	M248D	N252K				
S103A	V104I	S130G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	M248D	N252K				
S103A	V104I	F131V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	M248D	N252K				
K27N	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	M248D	N252K				
T38G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	M248D	N252K				
T38A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A	E271G		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y209W	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210I	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y205I	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R	T260A			
V68A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A				
N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A				
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R					

(continuação)

V68A	S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	A230V	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	L126F	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	V205I	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	P210L	A232V	Q236H	Q245R					
S103A	V104I	G159D	A230V	Q236H	Q245R							
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	T260A					
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R							
V68A	S103A	V104I	G159D	A174V	A232V	Q236H	Q245R	L257V				
V68A	S103A	V104I	G159D	A194S	A232V	Q236H	Q245R	L257V				
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	L257V				
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V						
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A	N261W		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V					
S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N262K				
S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	L257V					
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	F210L	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A		
Q12R	S103A	V104I	G159D	Y209W	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A			
S103A	V104I	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	L257V						
S103A	V104I	G159D	V205I	P210I	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A			
S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R			
S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R	L257V			
S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	L257V				
V68A	S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R	T260A		

(continuação)

S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R				
S103A	V104I	G159D	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R					
S103A	V104I	G159D	V205I	P210I	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	S128L	G159D	A232V	Q236H	Q245R					
A48V	S103A	V104I	G159D	A230V	Q236H	Q245R						
A48V	V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R				
A48V	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
A48V	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L267V	N201W			
G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
Q12R	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
G101G	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
G102A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S103A	V104I	P131V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	N194S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	N194G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	V244T	Q245R	N248D	N262K				
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	V244A	Q245R	N248D	N262K				
N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256R		
Q12R	N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	G159D	N196D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	Q206E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
G101G	S103A	V104I	G159D	T213Q	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		

(continuação)

A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	N248D	N252K			
N82D	S103A	V104I	Q108R	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S103A	V104I	G159D	S212G	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S101G	S103A	V104I	G159D	S212G	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
S103A	V104I	G159D	A232V	Q245R	N248D	N252K						
S103A	V104I	G159D	A230V	Q245R								
N62D	S103A	V104I	S132G	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	S130G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	S128G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	S128L	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N62D	S101G	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S103A	V104I	S128G	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S103A	V104I	S128L	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T260A			
S101G	S103A	V104I	P131V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
A98V	S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S99G	S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	Y208W	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	F210I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	V205I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	A230V	Q236H	Q245R						
S101G	S103A	V104I	G159D	A194P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N76D	S101G	S103A	V104I	G159D	A194P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	G159D	A230V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N62D	S103A	V104I	G159D	N186D	Q236E	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	E271Q

Exemplo 2

Um grande número de variantes de proteases produzidas no Exemplo 1 foram testadas relativamente ao desempenho em dois tipos de detergentes e condições de lavagem usando um ensaio Microswatch (tecido e corante em placa de microtitulação) descrito em "An improved method of assaying for a preferred enzyme and/or preferred detergent composition" US N° de Série 60/068796.

A Tabela 5 apresenta as proteases variantes testadas e os resultados dos testes com dois detergentes diferentes. Para a coluna A, o detergente foi Ariel Ultra filtrado a 0,67 g/l (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, USA), numa solução contendo 3 x 64,8 mg (3 "grains") por galão, dureza mista, em $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ e 0,3 ppm de enzima foi usado em cada alvéolo a 20°C. Para a coluna B, o detergente foi Ariel Futur filtrado a 3,38 g/l (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, USA), numa solução contendo 15 x 64,8 mg (15 "grains") por galão, dureza mista, em $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ e 0,3 ppm de enzima foi usado em cada alvéolo a 40°C.

Tabela 5

[illegible]

(continuação)

										A	B
N78D	N77D	S103A	V104I	A174V						1.99	0.36
T3SS	N78D	S103A	V104I	K237Q						1.11	0.55
N76D	S103A	V104I	N183D							1.50	0.26
R19L	N76D	S103A	V104I							1.11	0.48
R19C	N76D	S103A	V104I							1.06	0.19
N75D	S103A	V104I	N184D							1.32	0.28
N76D	S103A	V104I	N252D							1.19	0.53
N76D	S103A	V104I	S258C							0.92	0.12
N76D	S103A	V104I	K251T							1.31	0.43
N76D	P86S	S103A	V104I							1.00	0.98
I72V	N76D	S103A	V104I	N185D						1.70	0.37
N78D	S103A	V104I	K237E	T274A						1.12	0.18
N76D	S103A	V104I	A226V							1.13	0.80
N78D	S103A	V104I	G159D							1.88	0.23
H17L	N76D	S103A	V104I	K237E						1.39	0.28
N76D	S103A	V104I	S130L							0.62	0.71
N76D	S103A	V104I	Q109R							0.23	1.28
N76D	S98R	S103A	V104I	N204T						0.21	0.87
N76D	S103A	V104I	D181N							0.24	1.07
Q12R	N76D	S103A	V104I							0.81	1.31
N76D	S103A	V104I	S212P	E271V						0.89	1.35
N76D	S103A	V104I	N252K	N281Y						0.37	1.02
N76D	S103A	V104I	S242T							0.86	0.92
N76D	S103A	V104I	E271Q							0.63	1.26
Q12R	N76D	S103A	V104I	S242T						0.49	1.32

(continuação)

												A	B
Q12H	N82H	N76D	S103A	V104I	G159D							1.42	0.14
L42I	N76D	S103A	V104I	G159D								1.86	0.18
N76D	S103A	V104I	G146S	G159D								1.87	0.19
N76D	S103A	V104I	G159D	N236S								1.80	0.15
N76D	S103A	V104I	G159D	T224A								1.61	0.07
N76D	S103A	V104I	S212P	V268F	E271V							0.44	1.42
N76D	S67R	S103A	V104I	S212P	E271V							0.39	2.03
N76D	S103A	V104I	S212P	Q245L	E271V							0.62	1.78
N76D	S103A	V104I	Q109R	Q245R								0.11	1.78
N76D	S103A	V104I	Q109R	P210L								0.12	1.21
G20V	N62S	N76D	S103A	V104I								1.63	0.78
V68A	N76D	S103A	V104I	Q236H								2.37	0.44
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	E271V						2.97	0.45
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	Q245R						3.00	0.81
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	L217I	Q236H	E271V					2.71	0.12
H17Q	V88A	N76D	S103A	V104I								2.48	0.38
V68A	N76D	S103A	V104I									2.48	0.81
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236R							3.31	0.11
V68A	L75R	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H						3.08	0.14
V68A	N76D	S103A	V104I	A114V	V121I	G159D	Q236H	Q245R				3.11	0.40
Q12R	V88A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H						3.12	0.94
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y200S	Q236H	T259K					3.18	0.03
V68A	N76D	S103A	V104I	N117K	G159D	N184S	Q236H					2.78	0.06
V68A	N76D	S103A	V104I	Q236H								2.49	0.87
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	Q245L						3.37	0.03

(continuação)

V68A	N76D	S103A	V104I	N123S	G159D		Q236H	H249V				A	B
												3.11	0.03
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	H249Q						3.15	0.04
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	Q245R	N261D					3.31	0.03
V68A	N76D	S103A	V104I	S141N	G159D	Q236H	Q245R	T255S				3.25	0.02
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	Q245R	R247H					2.78	0.03
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A174V	N204D	Q236H	Q245R				3.28	0.02
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	N204D	Q236H	Q245R					3.34	0.02
V68A	N76D	S103A	V104I	A123V	G159D	N218D	Q236H	Q245R				3.28	0.03
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R					2.91	0.58
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A184I	V203A	Q236H	Q245R				2.86	0.13
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T280A			1.30	1.73
T22K	V68A	N76D	S103A	V104I								1.83	1.13
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210R	A232V	Q236H	Q245R				1.28	1.84
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V				3.72	0.8
N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	L257V						0.6	1.5
N76D	S103A	V104I	L257V	R276H								1.91	0.15
N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V					1.92	1.09
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y208W	A232V	Q236H	Q245R				3.57	0.99
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	G211R	A232V	Q236H	Q245R				1.74	1.78
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	G211V	A232V	Q236H	Q245R				3.15	1.08
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y214L	A232V	Q236H	Q245R			2.33	1.92
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A218R	A232V	Q236H	Q245R				1.87	1.45
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R				2.16	1.72
Q20R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	S259G			2.77	1.59
V68A	N76D	S87R	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	T280V			2.82	1.49

(continuação)

										A	B
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A32V	Q238H	Q245R	N281S		2.92	0.88
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q238H	Q245R	N281W		2.17	1.37
N76D	S103A	V104I	A232V	Q238H	S242P	Q245R				0.48	1.2
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	F210L	A232V	Q238H	Q245R		2.92	0.76
Q12R	A48V	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q238H	Q245R	2.09	1.89
N76D	S103A	V104I	A232V	Q238H	Q245R					0.51	1.44
N76D	S103A	V104I	G159D	V102F	A232V	Q238H	Q245R			1.80	1.14
N76D	S103A	V104I	V147I	G159D	A232V	Q238H	Q245R	N248S	K251R	1.36	1.29
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q238H	Q245R	A272G	1.92	1.81
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	N193K	Q208L	A232V	Q238H	Q245R	1.17	1.53
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q238H	Q245R	S256R		2.01	1.72
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q208R	A232V	Q238H	Q245R		2.09	1.82
K27R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q238H	Q245R		3.00	1.08
V68A	N76D	S103A	V104I	N116T	G159D	R170S	N195S	A232V	Q238H	ND	ND
N76D	S103A	V104I	M222S	Q245R						1.01	1.23
Q12R	N76D	S103A	V104I	M222S	H248R					0.57	1.85
N76D	S103A	V104I	N173R	M222S						0.86	0.46
N76D	S103A	V104I	M222S	Y263F						1.24	0.77
L21M	N76D	S103A	V104I	M222S	K237R	Y283F				1.18	0.76
N76D	S103A	V104I	Q109R	M222S						0.52	1.18
N76D	S103A	V104I	Q109R	M222S	E271D					0.56	1.12
G61 R	N76D	S103A	V104I	M222S						0.43	0.98
N76D	S103A	V104I	Q137R	M222S						0.42	1.25
N76D	S103A	V104I	M222S	H248R						1.16	1.01
Q12R	N76D	S103A	V104I	M222S	Q245R					0.53	1.48

Exemplo 3

A Tabela 6 apresenta as variantes de protease testadas no Exemplo 1 e os resultados dos testes em quatro detergentes diferentes. Para a coluna A, o detergente foi Ariel Ultra filtrado a 0,67 g/l (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, USA), numa solução contendo 3 x 64,8 mg (3 "grains") por galão, dureza mista, em $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ e 0,3 ppm de enzima foi usado em cada alvéolo a 20°C. Para a coluna B, o detergente foi Ariel Futur filtrado a 3,38 g/l (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, USA), numa solução contendo 15 x 64,8 mg (15 "grains") por galão, dureza mista em $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ e 0,3 ppm de enzima foi usado em cada alvéolo a 40°C. Para a coluna C, o detergente HSP a 3,5 g/l (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, USA), numa solução contendo 8 x 64,8 mg (8 "grains") por galão, dureza mista, em $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ e 0,3 ppm de enzima foi usado em cada alvéolo a 20°C. Para a coluna D, o detergente foi Tide KT a 0,67 g/l (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, USA), numa solução contendo 3 x 64,8 mg (3 "grains") por galão, dureza mista, em $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ e 0,3 ppm de enzima foi usado em cada alvéolo a 20°C.

Tabela 6

												A	B	C	D
N76D	S103A	V104I										1	1	1	1
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					1.44	1.41	1.39	1.29
V88A	S103A	V104I	G159D	Y239W	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.34	1.49	1.65	2.35
V88A	S103A	V104I	Q108R	G158D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			1.05	1.41	1.20	1.19
Q26R	V88A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			1.51	1.72	1.65	1.31
V88A	S103A	V104I	G159D	Y206F	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.12	1.38	1.60	2.02
V88A	S103A	V104I	G159D	N185D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.91	0.91	1.49	2.79
V88A	S103A	V104I	G159D	P210R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			0.93	1.39	1.23	0.90
V88A	S103A	V104I	G159D	N185D	P210L	A232V	Q236H	Q245R	N252K			2.67	0.86	1.41	2.89
V88A	S103A	V104I	G159D	P210L	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			3.22	1.43	1.55	1.78
V88A	S103A	V104I	G159D	S212C	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.39	1.43	1.63	2.07
V88A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.31	1.47	1.62	2.01
V88A	S103A	V104I	G159D	S212E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.63	0.56	1.36	2.88
V88A	S103A	V104I	G159D	T213E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.75	0.50	1.27	2.79
V88A	S103A	V104I	T213S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.11	1.38	1.31	0.75
V88A	A103V	V104I	G159D	T213E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.27	0.15	1.12	2.01
V88A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			1.37	1.42	1.37	1.08
V88A	S103A	V104I	G159D	A216V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.14	1.40	1.53	1.54
V88A	S103A	V104I	G159D	A215R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			1.22	1.56	1.47	1.20
V88A	S103A	V104I	G159D	S216T	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.12	1.36	1.66	1.56
V88A	S103A	V104I	G159D	S216V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			1.66	1.36	1.47	1.97
V88A	S103A	V104I	G159D	S216C	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			3.24	0.33	1.07	2.89
V88A	S103A	V104I	G159D	N173D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.43	0.46	1.29	2.42
V88A	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			0.89	1.46	1.24	0.95
V88A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.52	1.00	1.42	2.42

(continuação)

												A	B	C	D
V88A	S103A	V104I	G169D	A332V	Q238H	Q245R	N248D	N252L				2.05	1.13	1.30	1.95
P55S	V88A	S103A	V104I	G169D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252F			2.61	0.91	1.43	3.22
V88A	S103A	V104I	G169D	A332V	Q238H	Q245R	N248D	N252K	T255V			2.18	1.36	1.58	1.72
V88A	S103A	V104I	G169D	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K	S256N			2.14	1.46	1.59	1.65
V88A	S103A	V104I	G169D	A332V	Q238H	Q245R	N248D	N252K	S256E			2.46	0.77	1.33	2.68
V88A	S103A	V104I	G169D	A332V	Q238H	Q245R	N248D	N252K	S256R			1.31	1.52	1.46	0.84
V88A	S103A	V104I	G169D	A332V	Q238H	Q245R	N248D	N252K	T280R			1.21	1.41	1.31	1.05
V88A	S103A	V104I	G169D	A332V	Q238H	Q245R	N248D	N252K	L257R			1.51	1.41	0.85	1.18
V88A	S103A	V104I	G169D	A332V	Q238H	Q245R	N248D	N252K	G256D			2.56	0.59	1.30	2.64
V88A	S103A	V104I	G169D	A332V	Q238H	Q245R	N248D	N252K	N261R			1.02	1.47	1.37	0.84
V88A	S103A	V104I	A232V	Q238H	Q245R	N248D	N252K					1.04	1.50	1.32	0.73
V88A	S103A	V104I	G169D	A332V	Q238H	Q245V	N248D	N252K				2.60	0.93	1.41	2.67
V88A	S103A	V104I	G169D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.31	1.36	1.63	1.57
G61E	V88A	S103A	V104I	S130A	G169D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		2.93	0.25	1.39	2.44
G61E	S103A	V104I	A133V	G169D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.10	0.97	1.36	2.29
V88A	S103A	V104I	G169D	A332V	Q238H	Q245R	N248G	N252K				1.97	1.54	0.89	1.27
V88A	S103A	V104I	G169D	N218S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.30	1.50	1.62	1.56
G23R	V88A	S103A	V104I	G169D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			1.72	1.72	1.87	1.15
V88A	N76D	E89D	S103A	V104I	G169D	P210L	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A	1.32	1.30	1.11	1.28
V88A	N76D	S103A	V104I	G169D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.50	0.83	1.43	2.25
G61E	V88A	S103A	V104I	G169D	S180V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		4.20	0.07	ND	1.28
S3L	G61E	V88A	N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		3.47	0.80	ND	1.45
G61E	V88A	S103A	V104I	G169D	Y187F	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		4.32	0.79	ND	1.56
G27E	S103A	V104I	G169D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				3.14	0.41	ND	1.40
A98D	S103A	V104I	G169D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.71	0.66	ND	1.72

(continuação)

												A	B	C	D
S08E	S103A	V104I	G159D	A332V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.97	0.88	ND	1.71
S101E	S103A	V104I	G159D	A332V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				3.50	0.27	ND	1.90
S101G	S103A	V104I	G159D	A332V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.24	1.80	ND	1.33
G102A	S103A	V104I	G159D	A332V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				3.35	1.33	ND	1.89
S103A	V104I	S106E	G159D	A332V	Q236H	Q245R	N246D	N252K				4.88	0.65	ND	2.71
S103A	V104I	Q108E	G159D	A332V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				4.22	1.05	ND	2.40
S103A	V104I	G159D	A332V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261R				5.45	2.19	ND	2.56
S103A	V104I	Q109R	G159D	A332V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				3.78	2.18	ND	1.82
N62D	S103A	V104I	G159D	A332V	Q236H	Q245R	N246D	N253K				7.42	0.13	ND	2.46
S103A	V104I	G159D	N184D	A332V	Q236H	Q245R	N246D	N252K				5.43	1.38	ND	2.84
S103A	V104I	G159D	S168D	A332V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				5.12	1.21	ND	3.97
S103A	V104I	G159D	L217E	A332V	Q236H	Q245R	N246D	N252K				0.38	0.95	ND	3.09
G20R	N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A332V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		3.17	2.83	ND	2.80
N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A332V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			4.38	1.92	ND	2.54
S103A	V104I	G159D	Q208R	L217E	A332V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			3.05	2.81	ND	1.10
N62D	S103A	V104I	G159D	Q206R	A332V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			4.09	2.46	ND	2.55
S103A	V104I	G159D	N184G	A332V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.32	2.08	ND	2.40
S103A	V104I	G159D	A332V	Q236H	V244T	Q245R	N248D	N252K				2.34	2.04	ND	1.86
S103A	V104I	G159D	A332V	Q236H	V244A	Q245R	N248D	N252K				2.24	2.11	ND	1.95
K27N	S103A	V104I	G168D	A332V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.81	1.58	ND	2.47
T38G	S103A	V104I	G159D	A332V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.30	2.09	ND	1.82
N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A332V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.83	2.88	ND	1.44
Q12R	N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A332V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		2.01	2.76	ND	1.98
N62D	S103A	V104I	G159D	N185D	Q208E	T213R	A332V	Q236H	Q245R	N248D		7.74	0.84	ND	5.38
S101G	S103A	V104I	G159D	N185D	A332V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			5.14	1.41	ND	1.82

(continuação)

												A	B	C	D
S101G	S103A	V104I	G159D	Q208E	A232V	Q236H	Q245R	N249D	N252K			4.97	0.57	ND	1.36
S101G	S103A	V104I	G159D	T213Q	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.41	1.86	ND	1.01
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			4.42	0.50	ND	2.88
S101G	G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			5.86	1.20	ND	3.84
G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			5.97	2.10	ND	3.19
Q139R	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		2.86	2.67	ND	2.17
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		4.02	0.41	ND	2.25
S101G	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		6.83	2.07	ND	2.08
G102A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.03	2.48	ND	2.25
A92D	S103A	V104I	Q108R	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		2.88	2.78	ND	2.34
S103A	V104I	G159D	A232V	Q245R	N248D	N252K						2.74	2.10	ND	1.86
S103A	V104I	G159D	A230V	Q245R								2.11	2.35	ND	1.49
A92D	S103A	V104I	S138G	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		3.42	0.71	ND	2.59
S101G	S103A	V104I	S138G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N249D	N252K			2.59	1.32	ND	1.81
S101G	G103A	V104I	S128G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248Q	N252K			1.30	1.23	ND	0.0
S101G	S103A	V104I	S138L	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.84	0.71	ND	1.08
A92D	S101G	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		3.17	0.83	ND	2.35
A92D	S103A	V104I	S128G	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		2.15	1.38	ND	1.77
A92D	S103A	V104I	S128L	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		3.07	0.87	ND	1.45
S101G	S103A	V104I	P131V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.26	1.18	ND	3.05
A98V	S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			1.92	1.34	ND	1.98
S99G	S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.16	1.47	ND	1.20
S101G	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			1.79	1.38	ND	1.91
S101G	S103A	V104I	G159D	V203W	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			1.15	1.18	ND	8.7
S101G	S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			3.47	1.23	ND	1.93

(continuação)

S101G	S103A	V104I	G159D	V206I	A232V	Q236H	Q246R	N248D	N252K						A	B	C	D
S101G	S103A	V104I	G159D	A230V	Q236H	Q246R									1.80	1.38	ND	1.06
S101G	S103A	V104I	G159D	A194P	A232V	Q236H	Q246R								1.55	1.51	ND	1.23
N76Q	S101G	S103A	V104I	G159D	A194P	A232V	Q236H	Q246R	N248D	N252K					1.86	1.30	ND	1.19
G81E	V69A	S103A	V104I	G159D	S180V	A232V	Q236H	Q246R	Q245R	N248D	N252K				2.49	0.80	ND	1.25
S3L	G61E	V68A	N78D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q246R	Q245R	N248D	N252K				4.20	7	128	ND
G81E	V69A	S103A	V104I	G159D	V187F	A232V	Q236H	Q246R	Q245R	N248D	N252K				4.32	79	155	ND
G87E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q246R	N248D	N252K							3.14	41	140	ND
A88D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q246R	N248D	N252K							2.71	68	172	ND
S89E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q246R	N248D	N252K							2.97	88	171	ND
S101E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q246R	N248D	N252K							3.50	27	190	ND
S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q246R	N248D	N252K							2.24	180	133	ND
G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q246R	N248D	N252K							3.35	133	169	ND
S103A	V104I	S106E	G159D	A232V	Q236H	Q246R	N248D	N252K							4.88	55	271	ND
S103A	V104I	G109E	G159D	A232V	Q236H	Q246R	N248D	N252K							4.22	105	240	ND
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N249D	N252K	N261R							5.45	219	256	ND
S103A	V104I	G109R	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K							3.76	218	182	ND
N82Q	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q246R	N248D	N252K							7.42	13	246	ND
S103A	V104I	G159D	N184Q	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K							5.43	136	284	ND
S103A	V104I	G159D	S168D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K							5.12	121	387	ND
S103A	V104I	G159D	L217E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K							8.38	85	309	ND
G20R	N82Q	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					3.17	283	260	ND
N82Q	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K						4.38	182	354	ND
S103A	V104I	G159D	Q206R	L217E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K						3.05	281	110	ND
N82Q	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K						4.09	248	255	ND

(continuação)

												A	B	C	D
S103A	V104I	G159D	N194G	A232V	Q226H	Q245R	N248D	N252K				232	208	249	ND
S103A	V104I	G159D	A232V	Q226H	V244T	Q245R	N248D	N252K				234	204	186	ND
S103A	V104I	G159D	A232V	Q226H	V244A	Q245R	N248D	N252K				224	211	185	ND
K27N	S103A	V104I	G159D	A232V	Q226H	Q245R	N248D	N252K				261	156	247	ND
T36G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q226H	Q245R	N248D	N252K				230	209	182	ND
M62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S259R		263	266	144	ND
Q12R	M62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		201	276	199	
M62D	S103A	V104I	G159D	N186D	Q208E	T213R	A232V	Q226H	Q245R	N248D	E271Q	774	84	539	ND
S101G	S103A	V104I	G159D	N186D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			514	141	192	ND
S101G	S103A	V104I	G159D	Q208E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			487	57	138	ND
S101G	S103A	V104I	G159D	T213Q	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			241	186	101	ND
A68L	G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			442	50	289	ND
S101G	G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			596	120	394	ND
G102A	G102A	S103A	V104I	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			587	210	319	ND
Q12R	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		286	267	217	ND
A68L	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		482	41	225	ND
S101G	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		663	207	203	ND
G102A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			203	246	225	ND
M62D	S103A	V104I	Q159R	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		286	276	334	ND
S103A	V104I	G159D	A232V	Q246R	N248D							274	210	186	ND
S103A	V104I	G159D	A230V	Q245R								211	235	149	ND
M62D	S103A	V104I	S130G	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		342	71	258	ND
S101G	S103A	V104I	S130G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			269	132	161	ND
S101G	G103A	V104I	S128G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			130	123	80	ND
S101G	S103A	V104I	S128L	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			264	71	108	ND

(continuação)

N82D	S101G	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				A	B	C	D
N82D	S103A	V104I	S138G	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				317	83	235	ND
N82D	S103A	V104I	S126L	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				215	136	177	ND
S101G	S103A	V104I	P131V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					307	7	145	ND
A88V	S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					226	116	305	ND
S89G	S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					182	134	106	ND
S101G	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					216	147	120	ND
S101G	S103A	V104I	G159D	V208W	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					176	138	101	ND
S101G	S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					116	113	87	ND
S101G	S103A	V104I	G159D	V205I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					147	123	103	ND
S101G	S103A	V104I	G159D	A200V	Q236H	Q245R								180	138	105	ND
S101G	S103A	V104I	G159D	A184P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					155	161	123	ND
N76D	S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					186	130	110	ND
														240	80	125	ND

REIVINDICAÇÕES

1. Uma protease compreendendo a substituição de um aminoácido numa posição de resíduo correspondendo à posição de resíduo 232 da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, em que o aminoácido substituto é valina, a referida protease tendo um melhor desempenho na lavagem comparativamente com uma protease precursora sem a referida substituição.

2. Uma protease de acordo com a reivindicação 1, em que a substituição é A232V.

3. A protease de acordo com a reivindicação 1 ou com a reivindicação 2 que deriva de uma subtilisina de *Bacillus*.

4. A protease de acordo com a reivindicação 3 que deriva da subtilisina de *Bacillus lentus*.

5. Um DNA codificador de uma protease da reivindicação 1 ou da reivindicação 2.

6. Um vector de expressão codificador do DNA da reivindicação 5.

7. Uma célula hospedeira transformada com o vector de expressão da reivindicação 6.

8. Uma composição de limpeza compreendendo a protease da reivindicação 1 ou da reivindicação 2.

9. Uma composição para o tratamento de um têxtil compreendendo a protease da reivindicação 1 ou da reivindicação 2.

10. A protease de acordo com a reivindicação 1 ou com a reivindicação 2 compreendendo uma série de substituições seleccionadas do grupo consistindo nas substituições nas posições de resíduos correspondendo às posições na Tabela 1 da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, em que a série de substituições inclui a substituição referida na reivindicação 1, em que o aminoácido substituto é valina.

11. A protease de acordo com a reivindicação 10 compreendendo uma série de substituições seleccionadas do grupo consistindo em substituições correspondendo às da Tabela 2 da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, em que a série de substituições inclui a substituição referida na reivindicação 1, em que o aminoácido substituto é valina.

12. A protease de acordo com a reivindicação 10 compreendendo uma série de substituições seleccionadas do grupo consistindo em substituições nas posições de resíduos correspondendo às posições da Tabela 3 da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, em que a série de substituições

inclui a substituição referida na reivindicação 1, em que o aminoácido substituto é valina.

13. A protease da reivindicação 1 ou da reivindicação 2 incluindo ainda substituições dos resíduos de aminoácidos numa ou mais das posições 62, 230, 212, 252 ou 257.

14. A protease da reivindicação 1 ou da reivindicação 2 compreendendo uma série de substituições selecionadas do grupo que inclui as substituições em cada uma das posições de resíduos - correspondendo às posições de resíduos 68, 103, 104, 159, 232, 236 e 245 da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, em que o aminoácido substituto na posição correspondente à posição 232 é valina.

15. A protease da reivindicação 1 ou da reivindicação 2 compreendendo uma série de substituições selecionadas do grupo que inclui as substituições em cada uma das posições de resíduos correspondendo às posições de resíduos 103, 104, 159, 232, 236, 245, 248 e 252 da subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, em que o aminoácido substituto na posição correspondente à posição 232 é valina.

16. A protease da reivindicação 1 ou da reivindicação 2 compreendendo uma série de substituições selecionadas do grupo que inclui cada uma das substituições V68A, V104I, G159D, A232V, Q236H e Q245R.

17. A protease da reivindicação 1 ou da reivindicação 2 compreendendo uma série de substituições selecionadas do grupo que inclui cada uma das substituições S103A, V104I, G159D, A232V, Q236H, Q245R, N248D e N252K.

18. A protease da reivindicação 17, em que a série de substituições ainda inclui a substituição S101G.

Lisboa, 17 de Abril de 2008

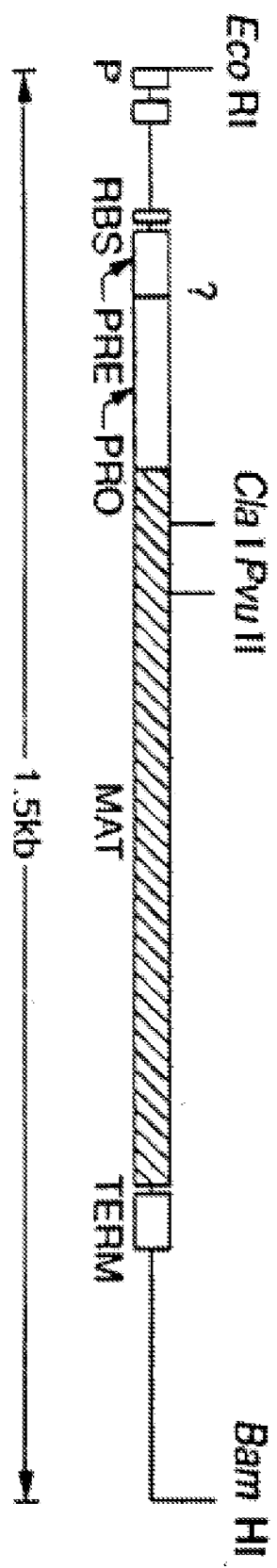


FIG. 1A

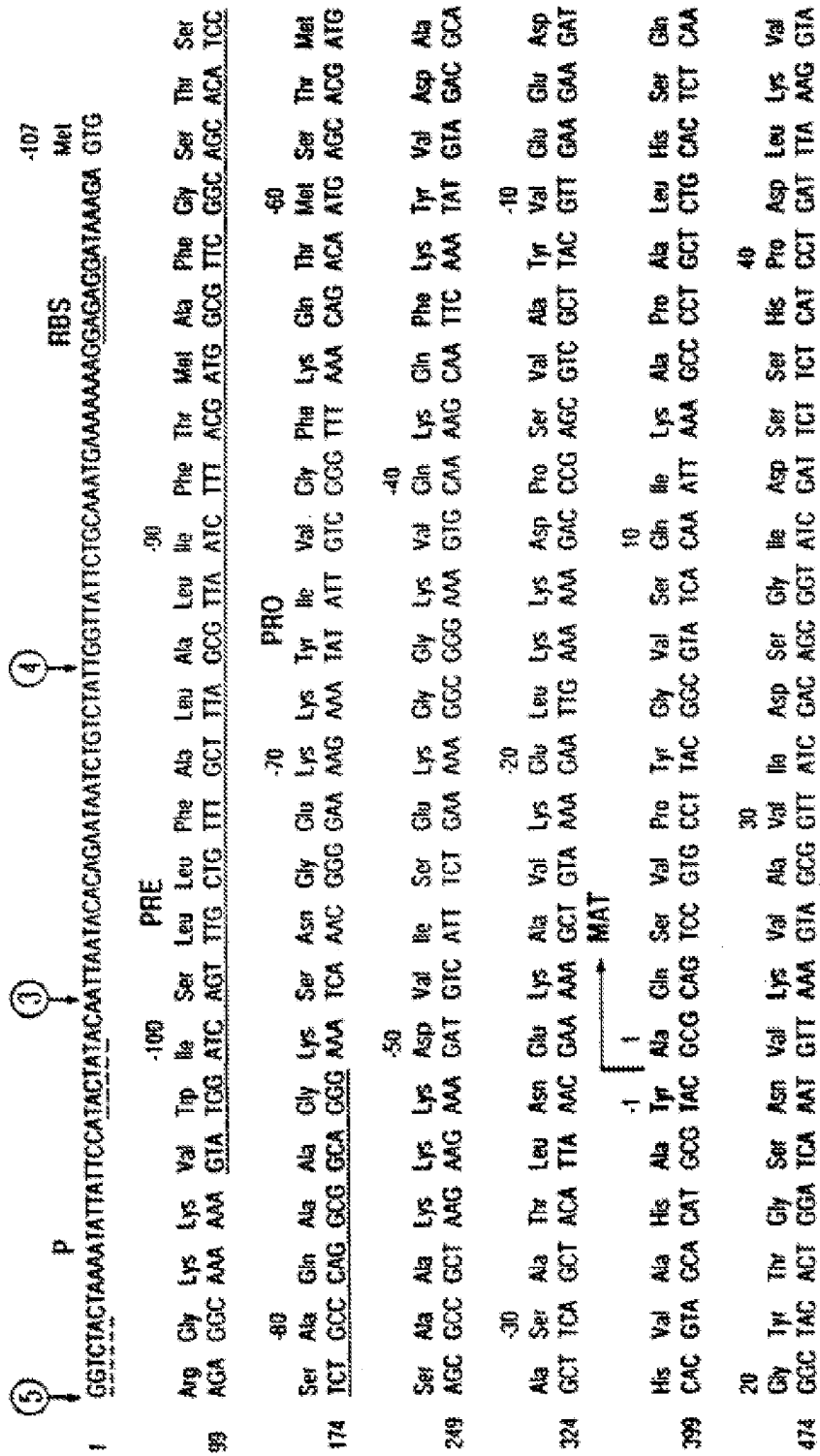


FIG. 1B - 1

```

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

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

100     Asp Ala
110     Ser Ala 90
Val Leu Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu Trp Ala Ile Ala Asn Asn Met
699 GTT CTC GGT GCT GAC GGT TCC GGC CAA TAC AEC TGG ATC ATT AAC GGA ATC GAG TGG GCG ATC GCA AAC AAT ATG

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

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

160     Ser Thr 160
170     Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala Val Gly Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly Pro
924 AAA TAC CCT TCT GTC ATT GCA GTA GGC GCT GGT CAC AGC AGC AAC CAA AGA GCA TCT TTC TCA AGC GTA GGA CCT

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

200     Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Val Ala Gly GCA GCG GCT GCT GTT ATG ATT CTT TCT AAG CAC CCG AAC TGG ACA AAC ACT
1074 ACG TCA ATG GCA TCT CCG CAC GTT GGC GCA GCG GCT GCT GTT ATG ATT CTT TCT AAG CAC CCG AAC TGG ACA AAC ACT

220     Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Val Ala Gly GCA GCG GCT GCT GTT ATG ATT CTT TCT AAG CAC CCG AAC TGG ACA AAC ACT
1074 ACG TCA ATG GCA TCT CCG CAC GTT GGC GCA GCG GCT GCT GTT ATG ATT CTT TCT AAG CAC CCG AAC TGG ACA AAC ACT

```

FIG. 1B - 2

[illegible]

1316 ATATCGACCGATGGCTCCCTCTGAAAATTTTAAACGAGAACGGCGGTGACCTGGCTACGTCCTGTAAAGCGGCAAGTCCTGAAAGGCTGTCATGCGCG

1416 CTCCCGGTTCCGGTCAAGCTCAATGCGGTAAAGGTCGGCGGCTTTCCTCATACGGGAGACGGCATTCGTATCGGATC

FIG. 1B-3

FIG. 13-1

FIG. 1B-2

FIG. 18-3

FIG. 1B

RESÍDUOS CONSERVADOS EM SUBTILISINAS DE
BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS

```

1      10      20
A Q S V P . G . . . . . A P A . H . . G

21     30     40
. T G S . V K V A V . D . G . . . . H P

41     50     60
D L . . . G G A S . V P . . . . . Q D

61     70     80
. N . H G T H V A G T . A A L N N S I G

81     90     100
V L G V A P S A . L Y A V K V L G A . G

101    110    120
S G . . S . L . . G . E W A . N . . . .

121    130    140
V . N . S L G . P S . S . . . . . A . .

141    150    160
. . . . . G V . V V A A . G N . G . . .

161    170    180
. . . . . Y P . . Y . . . . A V G A .

181    190    200
D . . N . . A S P S . . G . . L D . . A

201    210    220
P G V . . Q S T . P G . . Y . . . N G T

221    230    240
S M A . P H V A G A A A L . . . K . . .

241    250    260
W . . . Q . R . . L . N T . . . L G . .

261    270
. . Y G . G L . N . . A A . .

```

FIG._2

COMPARAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE SUBTILISINAS DE:

B. amyloliquefaciens

B. subtilis

O. ichthyiformis

Stylus

[illegible]

FIG. 3A

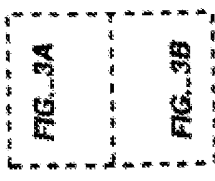
161 170 180 190
SSSTVCGYPPGKYPPSSVIAVGA VDS SSSS VGPPELDVMA
STSTVCGYPPAKYPPSTIAVGA VNS SSSS ACGSELDVMA
STNTICGYPPAKYPPDVIAVGA VDS SSSS ACGSELDVMA
* * * ISYPPAR YANAMAVGATDQNNNNRRA SFSQYGA GLDI VA

201 210 220 230
PGVSSIQSSTLPQGNKYGAYNGTSSMA SPHVAGAAALILSKHPT
PGVSSIQSSTLPQGNKYGAYNGTSSMA SPHVAGAAALILSKHPT
PGVACGVYSSTYPGNTT YASLNGTSSMA SPHVAGAAALILSKHPT
PGVNVQSSTYPGNTT YASLNGTSSMA SPHVAGAAALILSKHPT

241 250 260 270
WTTNTAQVVRSSSRRLLENNTTKLGDSFY YGKGLIN VQAAQ
WTTNTAQVVRSSSRRLLENNTTKLGDSFY YGKGLIN VQAAQ
LSASQVVRSSSRRLLENNTTKLGDSFY YGKGLIN VQAAQ
WSNVQVVRSSSRRLLENNTTKLGDSFY YGKGLIN VQAAQ

FIG._3B

FIG._3



REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

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

Documentos de patentes citadas na Descrição

- | | |
|----------------|-----------------|
| • WO 8906278 A | • EP 0251446 A |
| • US RE34686 E | • US 5182204 A |
| • US 5204015 A | • US 5264366 A |
| • US 5185258 A | • US 4404128 A |
| • US 5709676 A | • US 4261868 A |
| • US 5801038 A | • EP 134267 A |
| • US 5763257 A | • US 4533359 A |
| • EP 0328299 A | • EP 344259 A |
| • WO 8906279 A | • US 60068796 B |

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- | | |
|---|--|
| • STROUD, R. <i>Sci. Amer.</i> , vol. 131, 74-88 | • STAUFFER, D.C. <i>J. Biol. Chem.</i> , 1965, vol. 244, 5333-5338 |
| • KRAUT, J. <i>Annu. Rev. Biochem.</i> , 1977, vol. 46, 331-358 | • WELLS ; ESTELL. <i>TIBS</i> , 1985, vol. 13, 291-297 |
| • MARKLAND, F.S. et al. <i>Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.</i> , 1983, vol. 354, 1537-1540 | • DALE, M.W. <i>Molecular Genetics of Bacteria</i> . John Wiley & Sons. Ltd, 1989 |
| • ROBERTUS, J.D. et al. <i>Biochemistry</i> , 1972, vol. 11, 2439-2449 | • SIEZEN et al. <i>Protein Eng.</i> , 1991, vol. 4 (7), 719-737 |
| • ROBERTUS, J.D. et al. <i>J. Biol. Chem.</i> , 1976, vol. 251, 1097-1103 | • Microbial Proteinases. K. M. KALISZ. <i>Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology</i> . 1988 |
| • SVENDSEN, B. <i>Carlsberg Res. Commun.</i> , 1976, vol. 41, 237-291 | |