



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

(11) PI 9916351-9 B1

(22) Data do Depósito: 20/12/1999

(45) Data de Concessão: 12/04/2016

(RPI 2362)



(54) Título: ENZIMA DE SUBTILASE ISOLADA, COMPOSIÇÃO, E, USO DE UMA ENZIMA
SUBTILASE ISOLADA OU DE UMA COMPOSIÇÃO DE ENZIMA

(51) Int.Cl.: C12N 15/09; C11D 3/386; C12N 1/15; C12N 1/19; C12N 1/21

(30) Prioridade Unionista: 18/12/1998 DK PA 1998 01674

(73) Titular(es): NOVOZYMES A/S

(72) Inventor(es): KIM ANDERSEN VILBOUR, FRANK MIKKELSEN, PETER HANSEN KAMP,
CARSTEN ANDERSEN, MADS NØRREGAARD-MADSEN

“ENZIMA DE SUBTILASE ISOLADA, COMPOSIÇÃO, E, USO DE UMA ENZIMA DE SUBTILASE ISOLADA OU DE UMA COMPOSIÇÃO DE ENZIMA”.

CAMPO TÉCNICO

5 Esta invenção diz respeito a novas enzimas de subtilase dos subgrupos I-S1 e I-S2 tendo pelo menos um resíduo de aminoácido adicional na posição 99 da região (b) de elo de sítio ativo da posição 95 a 103. Estas proteases são utilizáveis exibindo desempenho de lavagem excelente ou
10 melhorado quando usadas em detergentes; composições de limpeza e detergentes. A invenção ainda diz respeito a genes que codificam a expressão das ditas enzimas quando inseridos dentro de uma célula ou organismo hospedeiros adequados; e tais células hospedeiras com estes transformadas e capazes de expressar as ditas variantes de enzima e métodos para produzir as
15 novas enzimas.

15 FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

 Na indústria de detergentes, as enzimas durante mais de 30 anos foram implementadas nas formulações de lavagem. As enzimas usadas em tais formulações compreendem proteases, lipases, amilases, celulasas, bem como outras enzimas ou misturas destas. As enzimas comercialmente
20 mais importantes são as proteases.

 Um número crescente de proteases comercialmente usadas são variantes engendradas de proteína de proteases do tipo selvagem que ocorrem naturalmente, por exemplo, DURAZYM[®] (Novo Nordisk A/S), RELASE[®] (Novo Nordisk A/S), MAXAPEM[®] (Gist-Brocades N.V.), PURAFECT[®]
25 (Genencor International, Inc.).

 Além disso, várias variantes de protease são descritas na técnica, tais como na EP 130756 (GENENTECH) (que corresponde à Patente

US re-concedida Nº 34.606 (GENENCOR)); EP 214435 (HENKEL), WO 87/04461 (AMGEN); WO 87/05050 (GENEX); EP 260105 (GENENCOR); Thomas, Russell e Fersht (1985) Nature 318, 375 a 376; Thomas, Russell e Fersht (1987) J. Mol. Biol. 193, 803 a 813; Russel e Fersht, Nature 328, 496
 5 a 500 (1987); WO 88/08028 (Genex); WO 88/08033 (Amgen); WO 95/27049 (SOLVAY S.A.); WO 95/30011 (PROCTER & GAMBLE COMPANY); WO 95/30010 (PROCTER & GAMBLE COMPANY); WO 95/29979 (PROCTER & GAMBLE COMPANY); US 5.543.302 (SOLVAY S.A.); EP 251 446 (GENENCOR); WO 89/06279 (NOVO NORDISK A/S); WO 91/00345
 10 (NOVO NORDISK A/S); EP 525 610 A1 (SOLVAY); e WO 94/02618 (GIST-BROCADES N.V.).

Entretanto, ainda que várias variantes de protease utilizáveis tenham sido descritas existe ainda uma necessidade para novas proteases ou variantes de protease melhoradas para vários usos industriais.

15 Portanto, um objetivo da presente invenção, é fornecer proteases ou variantes de protease de proteína engendradas melhoradas especialmente para o uso na indústria de detergente.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Os presentes inventores verificaram que as subtilisinas em que
 20 pelo menos um dos elos de sítio ativo são mais longos do que aqueles presentemente conhecidos exibem propriedades de desempenho de lavagem melhoradas em composições de detergente. A identificação destas foi feita construindo-se variantes de subtilisina especialmente da subtilisina 309 (BLSAVI ou Savinase®) exibindo propriedades de desempenho de lavagem
 25 melhoradas em composições de detergente em relação à enzima precursora do tipo selvagem. Isto foi descrito em nosso mais recente pedido DK1332/97.

Foi agora verificado que certas subtilases ou variantes destas dos subgrupos I-S1 ("subtilisinas" verdadeiras) e I-S2 (subtilisinas altamente alcalinas) tendo pelo menos um resíduo de aminoácido adicional na posição

99 (ou mais exatamente entre as posições 99 e 100) da região (b) de elo de sítio ativo da posição 95 a 103 exibem surpreendentemente desempenho de lavagem melhorado em comparação àquelas presentemente conhecidas e àquelas descritas nos ditos pedidos.

5 As proteases melhoradas de acordo com a invenção podem ser obtidas pelo isolamento a partir de recursos naturais ou pela introdução de pelo menos um outro resíduo de aminoácido (uma inserção) no elo de sítio ativo (b) entre as posições 99 e 100 em uma subtilase do tipo selvagem (para uma definição dos elos de sítio ativo e da numeração das posições ver
10 abaixo).

 Embora esta verificação tenha sido feita na subtilisina 309 é prognosticado que será possível produzir ou isolar subtilases ou variantes de subtilase similarmente vantajosas.

 Além disso será possível avaliar especificamente isolados
15 naturais para identificar novas subtilases do tipo selvagem que compreendam um elo de sítio ativo (b) que seja mais longo do que o elo de sítio ativo correspondente em subtilases conhecidas do tipo selvagem, tais como a subtilisina 309, cujas subtilases podem ser consideradas ter um resíduo de aminoácido inserido entre as posições 99 e 100 e exibindo excelente
20 desempenho de lavagem em um detergente em comparação com a sua subtilisina relacionada mais próxima conhecida, tais como a subtilisina 309.

 No que diz respeito ao alinhamento e numeração referência é feita às Figuras 1, 1a, 2 e 2a abaixo que mostram os alinhamentos entre a subtilisina BPN' (BASBPN) (a) e a subtilisina 309 (BLSAVI) (b) e os
25 alinhamentos entre a subtilisina BPN' (a) (BASBPN) e a subtilisina Carlsberg (g). Nas Figuras 1 e 2 os alinhamentos foram estabelecidos pelo uso da rotina GAP do pacote GCG como indicado abaixo, ao passo que os alinhamentos das Figuras 1a e 2a são os mesmos como mostrado na WO 91/00345. Estes alinhamentos são neste pedido de patente usados como uma

referência para a numeração dos resíduos.

Os sete elos de sítio ativo (a) até (g) (incluindo ambos os resíduos de aminoácido da extremidade indicados) são aqui definidos abranger os resíduos de aminoácido nos segmentos dados abaixo:

- 5 (a) a região entre o resíduo de aminoácido 33 e 43;
- (b) a região entre o resíduo de aminoácido 95 e 103;
- (c) a região entre o resíduo de aminoácido 125 e 132;
- (d) a região entre o resíduo de aminoácido 153 e 173;
- (e) a região entre o resíduo de aminoácido 181 e 195;
- 10 (f) a região entre o resíduo de aminoácido 202 e 204;
- (g) a região entre o resíduo de aminoácido 218 e 219.

Consequentemente em um primeiro aspecto a invenção diz respeito a enzimas isoladas (isto é, mais do que 10 % puras) de subtilase dos subgrupos I-S1 e I-S2 tendo pelo menos um resíduo de aminoácido adicional na posição 99 da região (b) do elo de sítio ativo da posição de 95 a 103, por meio do qual os ditos resíduos de aminoácido adicional(is) corresponde(m) à inserção de pelo menos um resíduo de aminoácido entre as posições 99 e 100.

Em um segundo aspecto a invenção diz respeito a uma sequência isolada de DNA que codifica uma variante de subtilase da invenção.

Em um terceiro aspecto a invenção diz respeito a um vetor de expressão que compreende uma sequência isolada de DNA que codifica uma variante de subtilase da invenção.

Em um quarto aspecto a invenção diz respeito a uma célula hospedeira microbiana transformada com um vetor de expressão de acordo com o quarto aspecto.

Em um outro aspecto a invenção diz respeito à produção das enzimas de subtilisina da invenção.

As enzimas da invenção, no geral podem ser produzidas pelo

cultivo de uma cepa microbiana a partir da qual a enzima foi isolada e recuperando a enzima em uma forma substancialmente pura, ou pela inserção de um vetor de expressão de acordo com o quarto aspecto da invenção dentro de um hospedeiro microbiano adequado, cultivando-se o hospedeiro para expressar a enzima de subtilase desejada e recuperando o produto de enzima.

Além disso, a invenção diz respeito a uma composição que compreende uma subtilase ou variante de subtilase da invenção.

Ainda mais a invenção diz respeito ao uso das enzimas da invenção para vários usos industriais relevantes em particular para o uso em composições de limpeza e composições de limpeza que compreendam as enzimas mutantes especialmente composições de detergente que compreendam as enzimas de subtilisina mutantes.

DEFINIÇÕES

Antes de debater esta invenção em mais detalhes, os seguintes termos e convenções serão primeiro definidos.

NOMENCLATURA DE AMINOÁCIDOS

A	=	Ala	=	Alanina
V	=	Val	=	Valina
L	=	Leu	=	Leucina
I	=	Ile	=	Isoleucina
P	=	Pro	=	Prolina
F	=	Phe	=	Fenilalanina
W	=	Trp	=	Triptofano
M	=	Met	=	Metionina
G	=	Gly	=	Glicina
S	=	Ser	=	Serina
T	=	Thr	=	Treonina
C	=	Cys	=	Cisteína
Y	=	Tyr	=	Tirosina

	N	=	Asn	=	Asparagina
	Q	=	Gln	=	Glutamina
	D	=	Asp	=	Ácido Aspártico
	E	=	Glu	=	Ácido Glutâmico
5	K	=	Lys	=	Lisina
	R	=	Arg	=	Arginina
	H	=	His	=	Histidina
	X	=	Xaa	=	Qualquer aminoácido

NOMENCLATURA DE ÁCIDOS NUCLEICOS

10	A	=	Adenina
	G	=	Guanina
	C	=	Citosina
	T	=	Timina (apenas no DNA)
	U	=	Uracila (apenas no RNA)

15 NOMENCLATURA E CONVENÇÕES PARA A DESIGNAÇÃO DE VARIANTES

Na descrição das várias variantes de enzima produzidas ou consideradas de acordo com a invenção, as seguintes nomenclaturas e convenções foram adaptadas para facilidade de referência:

20 Uma matriz de referência é primeiro definida alinhando-se a enzima do tipo selvagem isolada ou precursora com subtilisina BPN' (BASBPN).

25 O alinhamento pode ser obtido pela rotina GAP do pacote GCG versão 9.1 para numerar as variantes usando-se os seguintes parâmetros: penalidade de criação de intervalo = 8 e penalidade de extensão de intervalo = 8 e todos os outros parâmetros mantidos em seus valores de penalidade. Um outro método é usar alinhamentos reconhecidamente conhecidos entre as subtilases, tais como o alinhamento indicado na WO 91/00345. Na maioria dos casos as diferenças não terão qualquer

importância.

Tais alinhamentos entre subtilisina BPN' (BASBPN) e subtilisina 309 (BLSAVI) e subtilisina Carlsberg (BLSCAR), respectivamente são indicados nas Figuras 1, 1a, 2 e 2a. Por meio destas
 5 várias supressões e inserções serão definidas em relação à BASBPN. Na Figura 1, a subtilisina 309 tem 6 supressões nas posições 36, 58, 158, 162, 163 e 164 em comparação com a BASBPN, ao passo que na Figura 1a a subtilisina 309 tem as mesmas supressões nas posições 36, 56, 159, 164, 165 e 166 em comparação com a BASBPN. Na Figura 2 a subtilisina Carlsberg
 10 tem uma supressão na posição 58 em comparação com a BASBPN, ao passo que na Figura 2a a subtilisina Carlsberg tem uma supressão na posição 56 em comparação com a BASBPN. Estas supressões estão nas Figuras 1, 1a, 2 e 2a indicadas por asteriscos (*).

As várias modificações realizadas em uma enzima do tipo selvagem são indicadas, no geral, usando-se três elementos como segue:

A POSIÇÃO ORIGINAL DO AMINOÁCIDO DO AMINOÁCIDO SUBSTITUÍDO

A notação G195E significa assim uma substituição de uma glicina na posição 195 com um ácido glutâmico.

20 No caso quando o resíduo original de aminoácido pode ser qualquer resíduo de aminoácido, uma notação resumida pode ser as vezes usada indicando apenas a posição e o aminoácido substituído,

POSIÇÃO DE AMINOÁCIDO SUBSTITUÍDO

25 Tal notação é particularmente relevante em conexão com modificação(ões) nas subtilases homólogas (vide abaixo).

Similarmente quando a identidade do(s) resíduo(s) de aminoácido a ser(em) substituído(s) for(em) irrelevante(s),

POSIÇÃO ORIGINAL DE AMINOÁCIDO

Quando tanto o(s) aminoácido(s) original(is) quanto o(s)

aminoácido(s) substituído(s) podem compreender qualquer aminoácido então apenas a posição é indicada, por exemplo: 170.

Quando o(s) aminoácido(s) original(is) e/ou o(s) aminoácido(s) substituído(s) podem compreender mais do que um, mas não todos os aminoácidos então os aminoácidos selecionados são indicados dentro de chaves { },

POSIÇÃO ORIGINAL DE AMINOÁCIDO {AMINOÁCIDO SUBSTITUÍDO₁, ..., AMINOÁCIDO SUBSTITUÍDO_n}

Para variantes específicas os três específicos ou um código de letras são usados, incluindo os códigos Xaa e X para indicar qualquer resíduo de aminoácido.

SUBSTITUIÇÕES:

A substituição de Ácido Glutâmico no lugar da glicina na posição 195 é designada como:

15 Gly195Glu ou G195E

ou a substituição de qualquer resíduo de aminoácido ácido no lugar da glicina na posição 195 é designada como:

Gly195Xaa ou G195X

ou

20 Gly195 ou G195

A substituição de serina no lugar de qualquer resíduo de aminoácido na posição 170 pode ser assim designada:

Xaa170Ser ou X170S

ou

25 170Ser ou 170S

Tal notação é particularmente relevante em conexão com modificação(ões) nas subtilases homólogas (vide abaixo). 170Ser é assim pretendido compreender por exemplo, tanto uma modificação Lys170Ser em BASBPN quanto uma modificação Arg170Ser em BLSAVI (conforme a

Figura 1).

Para uma modificação onde o(s) aminoácido(s) original(is) e/ou aminoácido(s) substituído(s) pode(m) compreender mais do que um, mas não todos os aminoácidos, a substituição de glicina, alanina, serina ou treonina no lugar da arginina na posição 170 pode ser indicada por:

Arg170{Gly, Ala, Ser, Thr} ou R170{G, A, S, T} para indicar as variantes R170G, R170A, R170S e R170T.

SUPRESSÕES:

Uma supressão de glicina na posição 195 será indicada por:

Gly195* ou G195*

Correspondentemente a supressão de mais do que um resíduo de aminoácido, tal como a supressão de glicina e leucina nas posições 195 e 196 serão designadas

Gly195* + Leu196* ou G195* + L196*

INSERÇÕES:

A inserção de um resíduo de aminoácido adicional tal como por exemplo, uma lisina após G195 é

Gly195GlyLys ou G195GK; ou

quando mais do que um resíduo de aminoácido é inserido, tal como por exemplo, um Lys, Ala e Ser após G195 isto é :

Gly195GlyLysAlaSer ou G195GKAS

Em tais casos o(s) resíduo(s) de aminoácido(s) inserido(s) é/são numerados pela adição de letras minúsculas ao número de posição do resíduo de aminoácido que precede o(s) resíduo(s) de aminoácido(s) inserido(s). No exemplo acima as seqüências 194 a 196 podem ser assim:

	194	195	196	
BLSAVI	A	G	L	
	194	195	195a	195b
				195c
Variante	A	G	K	A - S - L

Nos casos onde um resíduo de aminoácido idêntico ao resíduo de aminoácido existente é inserido está claro que surge uma degeneração na nomenclatura. Se por exemplo uma glicina é inserida após a glicina no exemplo acima isto poderia ser indicado por G195GG. A mesma mudança
 5 atual poderia ser também apenas indicada como A194AG para a mudança de

194 195 196

BLSAVI A - G - L

para

194 195 195a196

10 Variante A - G - G - L

194 194a 195 196

Tais casos estarão evidentes à pessoa habilitada e a indicação G195GG e as indicações correspondentes para este tipo de inserções são assim pretendidas para compreender tais indicações degeneradas
 15 equivalentes.

PREENCHER UM INTERVALO:

Onde uma supressão em uma enzima existe na comparação da referência com a seqüência de subtilisina BPN' usada para a numeração, uma inserção em tal posição é indicada como:

20 *36Asp ou *36D

para a inserção de um ácido aspártico na posição 36

MODIFICAÇÕES MÚLTIPLAS

Variantes que compreendem modificações múltiplas são separadas por sinais de positivo, por exemplo:

25 Arg170Tyr+Gly195Glu ou R170Y+G195E

representando modificações nas posições 170 e 195 substituindo-se tirosina e ácido glutâmico no lugar de arginina e glicina, respectivamente.

ou por exemplo,

Tyr167{Gly, Ala, Ser, Thr}+Arg170{Gly, Ala, Ser, Thr}

designa as variantes

Tyr167Gly+Arg170Gly,	Tyr167Gly+Arg170Ala,
Tyr167Gly+Arg170Ser,	Tyr167Gly+Arg170Thr,
Tyr167Ala+Arg170Gly,	Tyr167Ala+Arg170Ala,
5 Tyr167Ala+Arg170Ser,	Tyr167Ala+Arg170Thr,
Tyr167Ser+Arg170Gly,	Tyr167Ser+Arg170Ala,
Tyr167Ser+Arg170Ser,	Tyr167Ser+Arg170Thr,
Tyr167Thr+Arg170Gly,	Tyr167Thr+Arg170Ala,
Tyr167Thr+Arg170Ser e	Tyr167Thr+Arg170Thr.

10 Esta nomenclatura é particularmente relevante no que diz respeito às modificações voltadas para a substituição, reposição, inserção ou supressão de resíduos de aminoácido tendo propriedades específicas comuns, tais como resíduos de carga positiva (K, R, H), carga negativa (D e) ou modificação de aminoácido(s) conservativo(s) de por exemplo, Tyr167{Gly, 15 Ala, Ser, Thr}+Arg170{Gly, Ala, Ser, Thr}, que significa substituir um aminoácido pequeno por um outro aminoácido pequeno. Ver seção “Descrição detalhada da invenção” para mais detalhes.

PROTEASES

20 As enzimas que clivam as ligações de amida nos substratos de proteína são classificadas como proteases ou (intercambiavelmente) peptidases (ver, Walsh, 1979, Enzymatic Reaction Mechanisms. W. H. Freeman e Company, San Francisco, Capítulo 3).

NUMERAÇÃO DE POSIÇÕES/RESÍDUOS DE AMINOÁCIDO

25 Se nada mais é mencionado a numeração de aminoácido aqui usada corresponde àquela da sequência de subtilase BPN’ (BASBPN). Para mais descrição da sequência BPN’ ver as Figuras 1 e 2 ou Siezen *et al.*, Protein Engng. 4 (1991) 719 a 737.

SERINA PROTEASES

Uma serina protease é uma enzima que catalisa a hidrólise de

ligações de peptídeo e em que existe um resíduo essencial de serina no sítio ativo (White, Handler e Smith, 1973 “Principles of Biochemistry,” Quinta Edição, McGraw-Hill Book Company, NY, pp. 271 a 272).

As serina proteases bacterianas têm pesos moleculares na
 5 faixa de 20.000 a 45.000 Daltons. Estas são inibidas pelo diisopropilfluorofosfato. Estas hidrolisam ésteres de terminal simples e são similares em atividade à quimiotripsina eucariótica, também uma serina protease. Um termo mais estrito, alcalino protease, abrange um subgrupo, reflete o pH ótimo alto de algumas das serina proteases, de pH de 9,0 a 11,0
 10 (para revisão, ver Priest (1977) Bacteriological Rev. 41 711 a 753).

SUBTILASES

Um subgrupo das serina proteases experimentalmente denominadas subtilases foi proposto por Siezen *et al.*, Protein Engng. 4 (1991) 719 a 737 e Siezen *et al.* Protein Science 6 (1997) 501 a 523. Estas
 15 são definidas pela análise de homologia de mais do que 170 seqüências de aminoácido de serina proteases previamente chamadas de proteases semelhantes à subtilisina. Uma subtilisina foi prévia e freqüentemente definida como uma serina protease produzida por bactérias Gram-positivas ou fungos e de acordo com Siezen *et al.* agora é um subgrupo das subtilases.
 20 Uma ampla variedade de subtilases foram identificadas e a seqüência de aminoácido de várias subtilases foi determinada. Para uma descrição mais detalhada de tais subtilases e suas seqüências de aminoácido, referência é feita a Siezen *et al.* (1997).

Um subgrupo das subtilases, o I-S1 ou “subtilisinas
 25 verdadeiras”, compreende as subtilisinas “clássicas”, tais como a subtilisina 168 (BSS168), a subtilisina BPN’, a subtilisina Carlsberg (ALCALASE®, NOVO NORDISK A/S) e a subtilisina DY (BSSDY).

Um outro subgrupo das subtilases, o I-S2 ou subtilisinas altamente alcalinas, é reconhecido por Siezen *et al.* (acima). As proteases do

subgrupo I-S2 são descritas como subtilisinas altamente alcalinas e compreendem enzimas tais como a subtilisina PB92 (BAALKP) (MAXACAL[®], Gist-Brocades NV), a subtilisina 309 (SAVINASE[®], NOVO NORDISK A/S), a subtilisina 147 (BLS147) (ESPERASE[®], NOVO VORDISK A/S) e alcalino elastase YaB (BSEYAB).

LISTA DE ACROSSEMIAS PARA SUBTILASES:

I-S1

Subtilisina 168 BSS168 (BSSAS (*Subtilisin amilosacchariticus*), BSAPRJ (*Subtilisin J*), BSAPRN (*Subtilisin NAT*), BMSAMP (Mesentericopeptidase),
 10 Subtilisina BPN', BASBPN,
 Subtilisina DY, BSSDY,
 Subtilisina Carlsberg, BLSCAR (BLKERA (Queratinase), BLSCA1, BLSCA2, BLSCA3),
 BSSPRC, Serina protease C
 15 BSSPRD, Serina protease D

I-S2

Subtilisina Sendai, BSAPRS
 Subtilisina ALP 1, BSAPRQ,
 Subtilisina 147, Esperase[®] BLS147 (BSAPRM (*SubtilisinAprM*), BAH101),
 20 Subtilisina 309, Savinase[®], BLS309/BLSAVI (BSKSMK (M-protease), BAALKP (Subtilisina PB92, Bacilo alcalofílico alcalino protease), BLSUBL (Subtilisina BL)),
 alcalino elastase YaB, BYSYAB,

“SAVINASE[®]”

25 SAVINASE[®] é comercializado pela NOVO NORDISK A/S. É a subtilisina 309 do *B. Lentus* e difere da BAALKP apenas em uma posição (N87S, ver Figura 1, neste). SAVINASE[®] tem a sequência de aminoácido designada b) na Figura 1.

SUBTILASE PRECURSORA

O termo “subtilase precursora” descreve uma subtilase definida de acordo com Siezen *et al.* (1991 e 1997). Para mais detalhes ver a descrição de “SUBTILASES” imediatamente acima. Uma subtilase precursora também pode ser uma subtilase isolada de uma fonte natural em
5 que a modificação subsequente foi feita embora se retenha a característica de uma subtilase. Alternativamente o termo “subtilase precursora” pode ser denominada “subtilase do tipo selvagem”.

MODIFICAÇÃO(ÕES) DE UMA VARIANTE DE SUBTILASE

O termo “modificação(ões)” usado aqui é definido para incluir
10 a modificação química de uma subtilase, bem como a manipulação genética do DNA que codifica uma subtilase. A(s) modificação(ões) podem ser reposição(ões) da(s) cadeia(s) lateral(s) de aminoácido, substituição(ões), supressão(ões) e/ou inserções no(s) aminoácido(s) de interesse.

VARIANTE DE SUBTILASE

15 No contexto desta invenção, o termo variante de subtilase ou subtilase que sofreu mutação significa uma subtilase que foi produzida por um organismo que expressa um gene mutante derivado de um microorganismo precursor que possuiu um gene original ou precursor e que produziu uma enzima precursora correspondente, o gene precursor tendo
20 sofrido mutação de modo a produzir o gene mutante do qual a dita subtilase protease que sofreu mutação é produzida quando expressada em um hospedeiro adequado.

SEQUÊNCIAS HOMÓLOGAS DE SUBTILASE

As regiões específicas de elo de sítio ativo e as inserções de
25 aminoácido nas ditos elos da subtilase SAVINASE® são identificados para a modificação nestas para se obter uma variante de subtilase da invenção.

Entretanto, a invenção não é limitada às modificações desta subtilase em particular, mas estende-se a outras subtilases precursoras (do tipo selvagem), que tenham uma estrutura primária homóloga àquela da

SAVINASE®. A homologia entre duas sequências de aminoácido é neste contexto descrita pelo parâmetro “identidade”.

De modo a determinar o grau de identidade entre duas subtilases a rotina GAP do pacote GCG versão 9.1 pode ser aplicada (abaixo) usando-se os mesmos ajustes. O rendimento da rotina, é além do alinhamento de aminoácido o cálculo da “Porcentagem de Identidade” entre as duas sequências.

Com base nesta descrição é rotina para uma pessoa habilitada na técnica identificar subtilases homólogas adequadas e as regiões homólogas de elo de sítio ativo correspondentes, que podem ser modificadas de acordo com a invenção.

DESEMPENHO DE LAVAGEM

A capacidade de uma enzima para catalisar a degradação de vários substratos que ocorrem naturalmente presentes nos objetos a serem limpos durante por exemplo, a lavagem ou limpeza de superfície dura é freqüentemente referida como a sua capacidade de lavagem, capacidade de lavar, de detergência ou de desempenho de lavagem. Por todo este pedido o termo desempenho de lavagem será usado para abranger esta propriedade.

SEQUÊNCIA ISOLADA DE DNA

O termo “isolado”, quando aplicado a uma molécula de sequência de DNA, denota que a sequência de DNA foi removida do seu ambiente genético natural e é assim livre de outras sequências codificadoras estranhas ou não desejadas e está em uma forma adequada para o uso dentro de sistemas de produção de proteína geneticamente engendradas. Tais moléculas isoladas são aquelas que são separadas do seu ambiente natural e incluem cDNA e clones genômicos. As moléculas isoladas de DNA da presente invenção são livres de outros genes com os quais são ordinariamente associadas, mas podem incluir regiões 5’ e 3’ não traduzidas que ocorram naturalmente tais como promotores e terminadores. A identificação de

regiões associadas estarão evidentes a uma pessoa de habilidade comum na técnica (ver, por exemplo, Dynan e Tijan, Nature 316: 774 a 778, 1985). O termo “uma seqüência isolada de DNA” pode ser alternativamente denominada “uma seqüência clonada DNA”.

5 PROTEÍNA ISOLADA

Quando aplicado a uma proteína, o termo “isolada” indica que a proteína foi removida do seu ambiente natural.

Em uma forma preferida, a proteína isolada é substancialmente livre de outras proteínas, particularmente outras proteínas homólogas (isto é, “impurezas homólogas” (ver abaixo)).

Uma proteína isolada é mais do que 10 % pura, preferivelmente mais do que 20 % pura, mais preferivelmente mais do que 30 % pura, como determinado por SDS-PAGE. Além disso é preferido fornecer a proteína em uma forma altamente purificada, isto é, mais do que 40 % pura, mais do que 60 % pura, mais do que 80 % pura, mais preferivelmente mais do que 95 % pura e ainda mais preferivelmente mais do que 99 % pura, como determinado por SDS-PAGE.

O termo “proteína isolada” pode ser alternativamente denominado “proteína purificada”.

20 IMPUREZAS HOMÓLOGAS

O termo “impurezas homólogas” significa qualquer impureza (por exemplo, um outro polipeptídeo que não o polipeptídeo da invenção) que origina da célula homóloga onde o polipeptídeo da invenção é originalmente obtido.

25 OBTIDO DE

O termo “obtido de” como aqui usado em conexão com uma fonte microbiana específica, significa que o polinucleotídeo e/ou polipeptídeo produzidos pela fonte específica ou por uma célula em que um gene da fonte foi inserido.

SUBSTRATO

O termo “Substrato” usado em conexão com um substrato para uma protease deve ser interpretado em sua forma mais ampla como aquela que compreende um composto contendo pelo menos uma ligação de peptídeo suscetível à hidrólise por uma subtilisina protease.

PRODUTO

O termo “Produto” usado em conexão com um produto derivado de uma reação enzimática de protease deve ser no contexto desta invenção interpretado incluir os produtos de uma reação de hidrólise que envolve uma subtilase protease. Um produto pode ser o substrato em uma reação de hidrólise subsequente.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra um alinhamento entre a subtilisina BPN’ (a) e a Savinase[®] (b) usando-se a rotina GAP mencionada acima.

A Figura 1a mostra o alinhamento entre a subtilisina BPN’ e a Savinase[®] como extraído da WO 91/00345.

A Figura 2 mostra um alinhamento entre a subtilisina BPN’ e a subtilisina Carlsberg usando-se a rotina GAP mencionada acima.

A Figura 2a mostra o alinhamento entre a subtilisina BPN’ e a subtilisina Carlsberg como extraído da WO 91/00345.

A Figura 3 mostra a estrutura tridimensional da Savinase (Banco de dados de Proteína (PDB) entrada 1SVN). Na Figura o elo de sítio ativo (b) é indicada.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

As subtilases da invenção em um primeiro aspecto dizem respeito a uma enzima de subtilase isolada (isto é, mais do que 10 % pura) dos subgrupos I-S1 e I-S2 tendo pelo menos um resíduo de aminoácido adicional na posição 99 da região (b) do elo de sítio ativo da posição 95 a 103, por meio do qual o(s) dito(s) resíduo(s) de aminoácido adicional(is)

correspondem à inserção de pelo menos um resíduo de aminoácido entre as posições 99 e 100.

Em outras palavras as subtilases da invenção são caracterizadas por compreender uma região (b) de elo de sítio ativo de mais do que 9 resíduos de aminoácido e em que o resíduo de aminoácido adicional é ou pode ser considerado como sendo inserido entre as posições 99 e 100 como comparado à subtilase do tipo selvagem precursora ou uma conhecida.

Uma subtilase do primeiro aspecto da invenção pode ser uma subtilase precursora ou do tipo selvagem identificada e isolada da natureza.

10 Tal subtilase precursora do tipo selvagem pode ser especificamente avaliada por técnicas padrão conhecidas na técnica.

Um modo preferido de fazer isto pode ser amplificando-se especificamente por PCR regiões de DNA conhecidas por codificar os elos de sítio ativo nas subtilases de numerosos microorganismos diferentes, preferivelmente cepas diferentes de Bacilos.

As subtilases são um grupo de enzimas conservadas, no sentido de que o seu DNA e as seqüências de aminoácido são homólogas. Consequentemente é possível construir iniciadores relativamente específicos que flanqueiam os elos de sítio ativo.

20 Um modo de fazer isto é investigando-se um alinhamento de subtilases diferentes (ver, por exemplo, Siezen *et al.* Protein Science 6 (1997) 501 a 523). É a partir deste trabalho de rotina que uma pessoa habilitada na técnica constrói iniciadores de PCR que flanqueiam o elo de sítio ativo correspondente ao elo de sítio ativo (b) entre o resíduo de aminoácido de 95 a 25 103 em qualquer um dos grupos I-S1 ou I-S2, tais como a partir de BLSAVI. Usando-se tais iniciadores de PCR para amplificar o DNA de vários microorganismos diferentes, preferivelmente cepas diferentes de Bacilos, seguido pelo sequenciamento de DNA dos ditos fragmentos de PCR amplificados, será possível identificar cepas que produzam subtilases destes

grupos que compreendem uma região de sítio ativo mais longa, como comparada por exemplo, a BLSAVI, que corresponde à região de elo de sítio ativo das posições 95 a 103 e onde uma inserção pode ser considerada existir entre as posições 99 e 100. Tendo identificado a cepa e uma seqüência parcial de DNA de tal subtilase de interesse, é trabalho de rotina para uma pessoa habilitada na técnica completar a expressão e a purificação da clonagem de tal subtilase da invenção.

Entretanto, é considerado que uma enzima de subtilase da invenção predominantemente é uma variante de uma subtilase precursora.

Consequentemente, em uma modalidade da invenção diz respeito a uma enzima de subtilase isolada de acordo com o primeiro aspecto da invenção em que a dita enzima de subtilase é uma variante construída tendo um elo de sítio ativo (b) mais longo do que a sua enzima precursora tendo-se pelo menos uma inserção de aminoácido entre os resíduos de aminoácido 99 e 100.

As subtilases da invenção exibem excelente desempenho de lavagem em um detergente e se uma enzima é uma variante construída, um desempenho de lavagem melhorado em um detergente em comparação com a sua subtilase relacionada mais próxima, tal como subtilisina 309.

Diferentes produtos de subtilase exibirão um desempenho de lavagem diferente em diferentes tipos de composições de detergente. Uma subtilase da invenção tem desempenho de lavagem melhorado, quando comparada à sua relativa mais próxima em uma maioria de tais diferentes tipos de composições de detergente.

Preferivelmente uma enzima de subtilase da invenção tem desempenho de lavagem melhorado, quando comparada à sua relativa mais próxima na composição detergente mostrada no Exemplo 3 neste (vide abaixo).

De modo a determinar se uma dada seqüência de aminoácido

de subtilase (irrelevante se a dita seqüência de subtilase é uma precursora de seqüência de subtilase do tipo selvagem ou uma variante de seqüência de subtilase produzida por qualquer outro método além de pela mutagênese direcionada por sítio) está dentro do escopo da invenção, os seguintes
5 procedimentos podem ser usados:

i) o alinhamento da dita seqüência de subtilase com a seqüência de aminoácido da subtilisina BPN' (ver seção "Definições" neste (vide acima);

ii) com base no alinhamento realizado na etapa i) identificar o
10 elo de sítio ativo (b), na dita seqüência de subtilase que corresponde à região (b) de elo de sítio ativo da subtilisina BPN' que compreende a região (ambas as extremidades de aminoácido incluídas) entre o resíduo de aminoácido de 95 a 103;

iii) determinar se o laço de sítio ativo (b) na dita seqüência de
15 subtilase, identificada na etapa ii) é mais longo do que o laço de sítio ativo correspondente em BLSAVI e se a dita prolongação corresponde à inserção de pelo menos um resíduo de aminoácido entre as posições 99 e 100.

Se este for o caso a subtilase investigada é uma subtilase dentro do escopo da presente invenção.

20 O alinhamento realizado na etapa i) acima é realizado como descrito acima usando-se a rotina GAP.

Com base nesta descrição é rotina para uma pessoa habilitada na técnica identificar o laço de sítio ativo (b) em uma subtilase e determinar se a subtilase em questão está dentro do escopo da invenção. Se uma variante
25 é construída pela mutagênese direcionada por sítio, está claro que é conhecido de antemão se a variante de subtilase está dentro do escopo da invenção.

Uma variante de subtilase da invenção pode ser construída por técnicas padrão conhecidas no ramo tais como pela mutagênese direcionada

por sítio/randômica ou pelo rearranjo de DNA de diferentes sequências de subtilase. Ver a seção “PRODUÇÃO DE UMA VARIANTE DE SUBTILASE” e Material e métodos neste (vide abaixo) para mais detalhes.

Em outras modalidades a invenção diz respeito a

- 5 1. uma enzima de subtilase isolada de acordo com a invenção em que o dito pelo menos um resíduo de aminoácido inserido é selecionado do grupo que compreende: T, G, A e S;
2. uma enzima de subtilase isolada de acordo com a invenção em que o dito pelo menos um resíduo de aminoácido inserido é selecionado do grupo de resíduos carregados de aminoácido que compreende: D, E, H, K
10 e R, mais preferivelmente D, E, K e R;
3. uma enzima de subtilase isolada de acordo com a invenção em que o dito pelo menos um resíduo de aminoácido inserido é selecionado do grupo de resíduos de aminoácido que compreende: C, N, Q, S e T, mais
15 preferivelmente N, Q, S e T;
4. uma enzima de subtilase isolada de acordo com a invenção em que o dito pelo menos um resíduo de aminoácido inserido é selecionado do grupo de pequenos resíduos hidrofóbicos de aminoácido que compreende: A, G e V; ou
5. uma enzima de subtilase isolada de acordo com a invenção em que o dito pelo menos um resíduo de aminoácido é selecionado do grupo
20 de resíduos de aminoácido hidrofílicos grandes que compreende: F, I, L, M, P, W e Y, mais preferivelmente F, I, L, M e Y.

Em uma outra modalidade, a invenção diz respeito a uma enzima de subtilase isolada de acordo com a invenção em que a dita inserção
25 entre as posições 96 e 97 compreende pelo menos dois aminoácidos, quando comparado ao elo de sítio ativo correspondente no BLSAVI.

Em outras modalidades, a invenção diz respeito a uma enzima de subtilase isolada que compreende pelo menos uma inserção, selecionada do grupo que compreende (na numeração de BASBPN):

X99X{T, G, A, S)

X99X{D, E, K, R}

X99X{H, V, C, N, Q}

X99X{F, I, L, M, P, W, Y}

5 ou mais específico para a subtilisina 309 e as subtilases intimamente relacionadas, tais como BAALKP, BLSUBL e BSKSMK

S99SA

S99ST

S99SG

10 S99SS

S99SD

S99SE

S99SK

S99SR

15 S99SH

S99SV

S99SC

S99SN

S99SQ

20 S99SF

S99SI

S99SL

S99SM

S99SP

25 S99SW

S99SY

Além disso, a invenção diz respeito a subtilases que compreendem as seguintes inserções múltiplas na posição 99

S99SSG

ou qualquer uma das seguintes combinações

S99ASG+S101T

S99TG+S101G

- 5 É bem conhecido na técnica que uma assim chamada substituição conservativa de um resíduo de aminoácido para um resíduo de aminoácido similar é esperado produzir apenas uma mudança menor na característica da enzima.

A Tabela III abaixo lista grupos de substituições conservativas de aminoácido.

10 TABELA III

Substituições conservativas de aminoácido

Propriedade Comum	Aminoácido
Básico (carga positiva)	K = lisina
	H = histidina
Ácido (carga negativa)	E = ácido glutâmico
	D = ácido aspártico
Polar	Q = glutamina
	N = asparagina
Hidrofóbico	L = leucina
	I = isoleucina
	V = valina
	M = metionina
Aromático	F = fenilalanina
	W = triptofano
	Y = tirosina
Pequeno	G = glicina
	A = alanina
	S = serina
	T = treonina

De acordo com este princípio as variantes de subtilase que compreendem substituições conservativas, tais como G97A+A98AS+S99G, G97S+A98AT+S99A são esperadas exibir características que não são drasticamente diferentes umas das outras.

5 Com base nas variantes de subtilase divulgadas e/ou exemplificadas aqui, é trabalho de rotina para uma pessoa habilitada na técnica identificar modificação(ões) conservativa(s) adequada(s) para estas variantes de modo a se obter outras variantes de subtilase exibindo similarmente desempenho melhorado de lavagem.

10 De acordo com a invenção as subtilases da invenção pertencem aos subgrupos I-S1 e I-S2, especialmente ao subgrupo I-S2, tanto para isolar novas enzimas da invenção a partir da criação natural ou a partir da criação artificial de diversidade e para planejar e produzir variantes a partir de uma subtilase precursora.

15 Em relação a variantes do subgrupo I-S1, é preferido selecionar uma subtilase precursora do grupo que compreende BSS168 (BSSAS, BSAPRJ, BSAPRN, BMSAMP), BASBPN, BSSDY, BLSCAR (BLKERA, BLSCA1, BLSCA2, BLSCA3), BSSPRC e BSSPRD ou variantes funcionais destas tendo retido as características do subgrupo I-S1.

20 Em relação às variantes do subgrupo I-S2 é preferido selecionar uma subtilase precursora do grupo que compreende BSAPRQ, BLS147 (BSAPRM, BAH101), BLSAVI (BSKSMK, BAALKP, BLSUBL), BYSYAB e BSAPRS ou variantes funcionais destas tendo retido as características de subgrupo I-S2.

25 Em particular a dita subtilase precursora é BLSAVI (SAVINASE® NOVO NORDISK A/S) e uma variante de subtilase preferida da invenção é conseqüentemente uma variante de SAVINASE®.

A presente invenção também compreende qualquer uma das subtilases da invenção mencionadas acima em combinação com qualquer

outra modificação para a sequência de aminoácido desta. Especialmente combinações com outras modificações conhecidas na técnica para fornecer propriedades melhoradas para a enzima são consideradas. A técnica descreve várias variantes de subtilase com diferentes propriedades melhoradas e várias destas são mencionadas na seção “Fundamentos da invenção” neste (vide acima). Estas referências são divulgadas aqui como referências para identificar uma variante de subtilase, que vantajosamente pode ser combinada com uma variante de subtilase da invenção.

Tais combinações compreendem as posições: 222 (melhora a estabilidade à oxidação), 218 (melhora a estabilidade térmica), substituições nos sítios de ligação de Ca estabilizando a enzima, por exemplo, a posição 76 e muitas outras evidentes da técnica anterior.

Em outras modalidades uma variante de subtilase da invenção pode ser vantajosamente combinada com uma ou mais modificação(ões) em qualquer uma das posições:
27, 36, 57, 76, 87, 97, 101, 104, 120, 123, 167, 170, 206, 218, 222, 224, 235 e 274.

Especificamente as seguintes variantes BLSAVI, BLSUBL, BSKSMK e BAALKP são consideradas apropriadas para a combinação:
K27R, *36D, S57P, N76D, S87N, G97N, S101G, S103A, V104A, V104I, V104N, V104Y, H120D, N123S, Y167, 8170, Q206E, N218S, M222S, M222A, T224S, K235L e T274A.

Além disso as variantes que compreende qualquer uma das variantes S101G+V104N, S87N+S101G+V104N, K27R+V104Y+N123S+T274A, N76D+S103A+V104Y ou N76D+V104A ou outras combinações destas mutações (V104N, S101G, K27R, V104Y, N123S, T274A, N76D, V104A) em combinação com qualquer uma ou mais das modificação(ões) mencionadas acima exibem propriedades melhoradas.

Ainda outras variantes de subtilase do(s) aspecto(s)

principal(is) da invenção são preferivelmente combinados com uma ou mais modificação(ões) em qualquer uma das posições 129, 131, 133 e 194, preferivelmente como modificações 129K, 131H, 133P, 133D e 194P e mais preferivelmente como modificações P129K, P131H, A133P, A133D e A194P. Qualquer uma destas modificações são esperadas fornecer um nível mais alto de expressão de uma variante de subtilase da invenção na produção desta.

Consequentemente, ainda uma outra modalidade da invenção diz respeito a uma variante de acordo com a invenção em que a dita modificação é selecionada do grupo que compreende:

PRODUZIR UMA VARIANTE DE SUBTILASE

Muitos métodos para clonar uma subtilase da invenção e para introduzir inserções nos genes (por exemplo, genes de subtilase) são bem conhecidos na técnica, conforme as referências citadas na seção “FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO”.

No geral, procedimentos padrão para a clonagem de genes e introdução de inserções (randômica e/ou direcionada por sítio) dentro dos ditos genes podem ser usados de modo a se obter uma variante de subtilase da invenção. Para a descrição adicional de técnicas adequadas, referência é feita aos Exemplos neste (vide abaixo) e (Sambrook *et al.* (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F. M. *et al.* (eds.) “Current protocols in Molecular Biology”. John Wiley and Sons, 1995; Harwood, C. R. e Cutting, S. M. (eds.) “Molecular Biological Methods for Bacillus”. John Wiley and Sons, 1990); e WO 96/34946.

Além disso, uma variante de subtilase da invenção pode ser construída por técnicas padrão para a criação artificial de diversidade, tais como por rearranjo de DNA de genes diferentes de subtilase (WO 95/22625; Stemmer WPC, Nature 370: 389 a 391 (1994)). O rearranjo de DNA por

exemplo, do gene que codifica a Savinase[®] com um ou mais sequências parciais de subtilases identificadas na natureza para compreender regiões de elo de sítio ativo (b) mais longas do que as do elo de sítio ativo (b) da Savinase[®], fornecerá, após avaliação subsequente quanto às variantes de desempenho de lavagem melhorada, as variantes de subtilase de acordo com a invenção.

VETORES DE EXPRESSÃO

Um vetor de expressão recombinante que compreende uma construção de DNA que codifica a enzima da invenção pode ser qualquer vetor que possa ser convenientemente submetido aos procedimentos de DNA recombinante.

A seleção de vetor dependerá freqüentemente da célula hospedeira dentro da qual deva ser introduzido. Assim, o vetor pode ser um vetor de replicação autônoma, isto é, um vetor que exista como uma entidade extracromossômica, a replicação do qual é independente da replicação do cromossoma, por exemplo, um plasmídeo. Alternativamente, o vetor pode ser um que na introdução em uma célula hospedeira é integrado no genoma da célula hospedeira em parte ou em sua totalidade e replicado junto com o(s) cromossoma(s) no(s) qual(is) foi/foram integrado(s).

O vetor é preferivelmente um vetor de expressão em que a sequência de DNA que codifica a enzima da invenção está operavelmente ligada a segmentos adicionais requeridos para a transcrição do DNA. No geral, o vetor de expressão é derivado de plasmídeo ou DNA viral ou pode conter elementos de ambos. O termo, “operavelmente ligado” indica que os segmentos estão arranjados de modo que funcionem de comum acordo com seus propósitos intencionados, por exemplo, inicia a transcrição em um promotor e prossegue através da sequência de DNA que codifica a enzima.

O promotor pode ser qualquer sequência de DNA que mostre atividade transcricional na célula hospedeira de seleção e pode ser derivada

de genes que codifiquem proteínas homólogas ou heterólogas à célula hospedeira.

Os exemplos de promotores adequados para o uso em células hospedeiras bacterianas incluem o promotor do gene da amilase maltogênica do *Bacillus stearothermophilus*, o gene da amilase alfa do *Bacillus licheniformis*, o gene da amilase alfa do *Bacillus amyloliquefaciens*, o gene da protease alcalina do *Bacillus subtilis* ou o gene de xilosidase do *Bacillus pumilus* gene ou o fago Lambda dos promotores P_R ou P_L ou os promotores lac, trp ou tac do *E. coli*.

10 A sequência de DNA que codifica a enzima da invenção também pode estar, se necessário, operavelmente conectada a um terminador adequado.

O vetor recombinante da invenção pode ainda compreender uma sequência de DNA que permita ao vetor replicar na célula hospedeira em
15 questão.

O vetor pode também compreender um marcador selecionável, por exemplo, um gene, o produto do qual complementa um defeito na célula hospedeira ou um gene que codifique a resistência a, por exemplo, antibióticos como a canamicina, o cloranfenicol, a eritromicina, a tetraciclina, a espectinomicina ou coisa parecida ou a resistência a metais pesados ou
20 herbicidas.

Para direcionar uma enzima da presente invenção no caminho secretor das células hospedeiras, uma sequência de sinal secretor (também conhecida como uma sequência líder, sequência prepro ou pré sequência)
25 pode ser fornecida no vetor recombinante. A sequência de sinal secretor é unida à sequência de DNA que codifica a enzima na matriz de leitura correta. As sequências de sinal secretor são comumente posicionadas em 5' em relação à sequência de DNA que codifica a enzima. A sequência de sinal secretor pode ser aquela normalmente associada com a enzima ou pode ser de

um gene que codifique uma outra proteína secretada.

Os procedimentos usados para ligar as sequências de DNA que codificam a presente enzima, o promotor e opcionalmente o terminador e/ou a sequência de sinal secretor, respectivamente ou para montar estas
5 sequências pelos esquemas adequados de amplificação por PCR e inseri-los em vetores adequados que contenham a informação necessária para a replicação ou integração, são bem conhecidos pelas pessoas habilitadas na técnica (conforme, por exemplo, Sambrook *et al.*, acima citado).

CÉLULA HOSPEDEIRA

10 A sequência de DNA que codifica a presente enzima introduzida na célula hospedeira pode ser homóloga ou heteróloga ao hospedeiro em questão. Se homóloga à célula hospedeira, isto é, produzida pela célula hospedeira na natureza, será típica e operavelmente conectada a uma outra sequência promotora ou, se aplicável, uma outra sequência de sinal
15 secretor e/ou sequência terminadora do que em seu ambiente natural. O termo “homólogo” é intencionado a incluir uma sequência de DNA que codifique uma enzima natural ao organismo hospedeiro em questão. O termo “heterólogo” é intencionado a incluir uma sequência de DNA não expressada pela célula hospedeira na natureza. Assim, a sequência de DNA pode ser de
20 um outro organismo ou pode ser uma sequência sintética.

A célula hospedeira na qual a construção de DNA ou o vetor recombinante da invenção é introduzido pode ser qualquer célula que seja capaz de produzir a presente enzima e inclui bactérias, leveduras, fungos e células eucarióticas superiores incluindo vegetais.

25 Os exemplos de células hospedeiras bacterianas que, no cultivo, são capazes de produzir a enzima da invenção são bactérias gram-positivas tais como as cepas de *Bacillus*, tais como as cepas de *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amiloliquefaciens*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus*, *B.*

megatherium ou *B. turingiensis* ou cepas de *Streptomyces*, tais como *S. lividans* ou *S. murinus* ou bactérias gram-negativas tais como *Echerichia coli*.

A transformação das bactérias pode ser efetuada pela transformação, eletroporação ou conjugação de protoplasto ou usando-se
5 células competentes de uma maneira conhecida por si (conforme, Sambrook *et al.*, acima).

Quando expressar a enzima em bactérias tais como *E. coli*, a enzima pode ser retida no citoplasma, tipicamente como grânulos insolúveis (conhecidos como corpos de inclusão) ou pode ser direcionada ao espaço
10 periplásmico por uma seqüência de secreção bacteriana. no caso precedente, as células são lisadas e os grânulos são recuperados e desnaturados após o que a enzima é redobrada diluindo-se o agente de desnaturação. No último caso, a enzima pode ser recuperada do espaço periplásmico pelo rompimento das células, por exemplo, por sonicação ou choque osmótico, para liberar os
15 conteúdos do espaço periplásmico e recuperar a enzima.

Quando expressar a enzima em bactérias gram-positivas tais como as cepas de *Bacillus* ou *Streptomyces*, a enzima pode ser retida no citoplasma ou pode ser direcionada ao meio extracelular por uma seqüência de secreção bacteriana. No último caso, a enzima pode ser recuperada do
20 meio como descrito abaixo.

MÉTODO DE PRODUZIR SUBTILASE

A presente invenção fornece um método de produzir uma enzima isolada de acordo com a invenção, em que uma célula hospedeira adequada, que foi transformada com uma seqüência de DNA que codifica a
25 enzima, é cultivada sob condições que permitam a produção da enzima e a enzima resultante é recuperada da cultura.

Quando um vetor de expressão que compreende uma seqüência de DNA que codifica a enzima é transformada dentro de uma célula hospedeira heteróloga é possível permitir a produção heteróloga

recombinante da enzima da invenção.

Deste modo, é possível fabricar uma composição de subtilase altamente purificada, caracterizada em ser isenta de impurezas homólogas.

5 Neste contexto impureza homóloga significa qualquer impureza (por exemplo, outros polipeptídeos que não a enzima da invenção) que se origine da célula homóloga onde a enzima da invenção é originalmente obtida.

10 O meio usado para cultivar as células hospedeiras transformadas pode ser qualquer meio convencional adequado para desenvolver as células hospedeiras em questão. A subtilase expressada pode ser convenientemente secretada no meio de cultura e pode ser recuperada deste por procedimentos bem conhecidos que incluem separar as células do meio por centrifugação ou filtração, precipitação de componentes proteináceos do meio por intermédio de um sal tal como sulfato de amônio, 15 seguido por procedimentos cromatográficos tais como a cromatografia de troca iônica, cromatografia de afinidade ou coisa parecida.

USO DE UMA VARIANTE DE SUBTILASE DA INVENÇÃO

20 Uma variante de protease de subtilase da invenção pode ser usada para várias aplicações industriais, em particular dentro da indústria de detergente.

Além disso, a invenção diz respeito a uma composição de enzima, que compreende uma variante de subtilase da invenção.

Um resumo das aplicações industriais e das composições de enzima preferidas correspondentes está descrito abaixo.

25 Este resumo não é de nenhum modo intencionado a ser uma lista completa de aplicações adequadas de uma variante de subtilase da invenção. Uma variante de subtilases da invenção pode ser usada em outras aplicações industriais conhecidas na técnica por incluir o uso de uma protease, em particular de uma subtilase.

COMPOSIÇÕES DE DETERGENTE QUE COMPREENDEM AS ENZIMAS MUTANTES

A presente invenção compreende o uso das enzimas mutantes da invenção em composições de limpeza e detergentes e de tais composições
5 que compreendem as enzimas mutantes de subtilisina. Tais composições de limpeza e detergentes são bem descritos na técnica e referência é feita às WO 96/34946; WO 97/07202; WO 95/30011 para mais descrição de composições de limpeza e detergentes adequados.

Além disso, o(s) exemplo(s) abaixo demonstram as melhorias
10 no desempenho de lavagem para várias variantes de subtilase da invenção.

COMPOSIÇÕES DETERGENTES

A enzima da invenção pode ser adicionada e assim tornar-se um componente de uma composição detergente.

A composição detergente da invenção pode ser, por exemplo,
15 formulada como uma composição detergente de lavar roupas a mão ou a máquina incluindo uma composição aditiva de lavar roupas adequada para pré tratamento de tecidos tingidos e uma composição amaciante de enxágüe de tecido adicionada ou ser formulada como uma composição detergente para uso geral em operações domésticas de limpeza de superfícies duras ou ser
20 formulada para operações de lavar louças a mão ou a máquina.

Em um aspecto específico, a invenção fornece um aditivo de detergente que compreende a enzima da invenção. O aditivo de detergente bem como a composição detergente podem compreender uma ou mais outras enzimas tais como uma protease, uma lipase, uma cutinase, uma amilase, uma
25 carboidrase, uma celulase, uma pectinase, uma mananase, uma arabinase, uma galactanase, uma xilanase, uma oxidase, por exemplo, uma lacase e/ou uma peroxidase.

No geral, as propriedades da(s) enzima(s) selecionada(s) deve(m) ser compatível(is) com o detergente selecionado, (isto é, pH ótimo,

compatibilidade com os outros ingredientes enzimáticos e não enzimáticos, etc.) e a(s) enzima(s) deve(m) estar presente(s) em quantidades eficazes.

PROTEASES: As proteases adequadas incluem aquelas de origem animal, vegetal ou microbiana. A origem microbiana é preferida. Os
 5 mutantes quimicamente modificados ou de proteína engendrada são incluídos. A protease pode ser uma serina protease ou uma metalo protease, preferivelmente uma protease alcalina microbiana ou uma protease semelhante à tripsina. Os exemplos de proteases alcalinas são subtilisinas especialmente aquelas derivadas de *Bacillus*, por exemplo, a subtilisina
 10 Novo, a subtilisina Carlsberg, a subtilisina 309, a subtilisina 147 e a subtilisina 168 (descrita na WO 89/06279). Os exemplos de proteases semelhantes à tripsina são tripsina (por exemplo, de origem suína ou bovina) e a protease *Fusarium* descrita na WO 89/06270 e WO 94/25583.

Os exemplos de proteases utilizáveis são as variantes descritas
 15 nas WO 92/19729, WO 98/20115, WO 98/20116 e WO 98/34946 especialmente as variantes com substituições em uma ou mais das seguintes posições: 27, 36, 57, 76, 87, 97, 101, 104, 120, 123, 167, 170, 194, 206, 218, 222, 224, 235 e 274.

As enzimas de protease preferidas comercialmente disponíveis
 20 incluem Alcalase[®], Savinase[®], Primase[®], Duralase[®], Esperase[®] e Kannase[®] (Novo Nordisk A/S), Maxatase[®], Maxacal[®], Maxapem[®], Properase[®], Purafect[®], Purafect OxP[®], FN2[®] e FN3[®] (Genencor International Inc.).

LIPASES: As lipases adequadas incluem aquelas de origem bacteriana ou fúngica. Os mutantes quimicamente modificados ou de proteína
 25 engendrada são incluídos. Os exemplos de lipases utilizáveis incluem lipases de *Humicola* (sinônimo *Thermomyces*), por exemplo, de *H. lanuginosa* (*T. lanuginosus*) como descrito na EP 258 068 e EP 305 216 ou de *H. insolens* como descrito na WO 96/13580, uma *Pseudomonas* lipase, por exemplo, de *P. alcaligenes* ou *P. pseudoalcaligenes* (EP 218 272), *P. cepacia* (EP 331

376), *P. stutzeri* (GB 1.372.034), *P. fluorescens*, *Pseudomonas sp.* cepa SD 705 (WO 95/06720 e WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (WO 96/12012), uma *Bacillus* lipase, por exemplo, de *B. subtilis* (Dartois *et al.* (1993), *Biochemica et Biofisica Acta*, 1131, 253 a 360), *B. stearothermophilus* (JP 64/744992) ou
 5 *B. pumilus* (WO 91/16422).

Outros exemplos são variantes de lipase tais como aquelas descritas na WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407 225, EP 260 105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079 e WO 97/07202.

10 As enzimas de lipase preferidas comercialmente disponíveis incluem Lipolase® e Lipolase Ultra® (Novo Nordisk A/S).

AMILASES: As amilases adequadas (α e/ou β) incluem aquelas de origem bacteriana ou fúngica. Os mutantes quimicamente modificados ou de proteína engendrada são incluídos. As amilases incluem,
 15 por exemplo, α -amilases obtidas de *Bacillus*, por exemplo, uma cepa especial de *B. licheniformis*, descrito em mais detalhes na GB 1.296.839.

Os exemplos de amilases utilizáveis são as variantes descritas nas WO 94/02597, WO 94/18314, WO 96/23873 e WO 97/43424 especialmente as variantes com substituições em um ou mais das seguintes
 20 posições: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408 e 444.

As amilases comercialmente disponíveis são Duramil®, Termamil®, Fungamil® e BAN® (Novo Nordisk A/S), Rapidase® e Purastar® (da Genencor International Inc.).

25 CELULASES: As celulasas adequadas incluem aquelas de origem bacteriana ou fúngica. Os mutantes quimicamente modificados ou de proteína engendrada são incluídos. As celulasas adequadas incluem celulasas do gênero *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, por exemplo, as celulasas fúngicas produzidas a partir de

Humicola insolens, *Miceliothra thermophila* e *Fusarium oxysporum* divulgadas na US 4.435.307, US 5.648.263, US 5.691.178, US 5.776.757 e WO 89/09259.

5 As celulasas especialmente adequadas são as celulasas alcalinas ou neutras tendo benefícios de cuidados com a cor. Os exemplos de tais celulasas são as celulasas descritas na EP 0 495 257, EP 0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940. Outros exemplos são as variantes de celulase tais como aquelas descritas na WO 94/07998, EP 0 531 315, US 5.457.046, US 5.686.593, US 5.763.254, WO 95/24471, WO 98/12307 e
10 PCT/DK98/00299.

As celulasas comercialmente disponíveis incluem Celluzyme® e Carezyme® (Novo Nordisk A/S), Clazinase® e Puradax HA® (Genencor International Inc.) e KAC-500 (B)® (Kao Corporation).

15 PEROXIDASES/OXIDASES: As peroxidases/oxidases adequadas incluem aquelas de origem vegetal, bacteriana ou fúngica. Os mutantes quimicamente modificados ou de proteína engendrada são incluídos. Os exemplos de peroxidases utilizáveis incluem peroxidases de *Coprinus*, por exemplo, de *C. cinereus* e suas variantes como aquelas descritas na WO 93/24618, WO 95/10602 e WO 98/15257.

20 As peroxidases comercialmente disponíveis incluem Guardzyme® (Novo Nordisk A/S).

A(s) enzima(s) detergente(s) pode(m) ser incluída(s) em uma composição detergente adicionando-se aditivos separados contendo uma ou mais enzimas ou adicionando-se um aditivo combinado que compreenda
25 todas destas enzimas. Um aditivo detergente da invenção, isto é, um aditivo separado ou um aditivo combinado, pode ser formulado por exemplo, como um granulado, um líquido, uma pasta, etc. As formulações aditivas detergentes preferidas são granulados, em particular granulados isentos de poeira, líquidos, em particular líquidos estabilizados ou pastas.

Os granulados isentos de poeira podem ser produzidos, por exemplo, como divulgados na US 4.106.991 e 4.661.452 e podem ser opcionalmente revestidos por métodos conhecidos na técnica. Os exemplos de materiais de revestimento cerosos são produtos de poli(óxido de etileno) (polietileno glicol, PEG) com pesos molares médios de 1000 a 20000; nonilfenóis etoxilados tendo de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; álcoois graxos etoxilados em que o álcool contém de 12 a 20 átomos de carbono e em que existem de 15 a 80 unidades de óxido de etileno; álcoois graxos; ácidos graxos; e mono e di e triglicerídeos de ácidos graxos. Os exemplos de materiais de revestimento formadores de película adequados para aplicação pelas técnicas de leito fluido são dados na GB 1483591. As preparações líquidas de enzima podem ser, por exemplo, estabilizadas pela adição de um poliol tal como propileno glicol, um açúcar ou álcool de açúcar, ácido láctico ou ácido bórico de acordo com métodos estabelecidos. As enzimas protegidas podem ser preparadas de acordo com o método divulgado na EP 238.216.

A composição detergente da invenção pode estar em qualquer forma conveniente, por exemplo, uma barra, um tablete, um pó, um grânulo, uma pasta ou um líquido. Um detergente líquido pode ser aquoso, tipicamente contendo até 70 % de água e de 0 a 30 % de solvente orgânico ou não aquoso.

A composição detergente compreende um ou mais tensoativos, que podem ser não iônicos incluindo semi-polares e/ou aniônicos e/ou catiônicos e/ou zwitteriônicos. Os tensoativos estão tipicamente presentes em um nível de 0,10 a 60 % em peso.

Quando incluídos nestes o detergente conterá usualmente de cerca de 1 % a cerca de 40 % de um tensoativo aniônico tal como alquilbenzenossulfonato linear, alfa-olefinsulfonato, alquil sulfato (sulfato de álcool graxo), etoxissulfato álcool, alcanossulfonato secundário, éster metílico de ácido graxo alfa-sulfo, ácido alquil ou alquenilsuccínico ou sabão.

Quando incluído neste o detergente conterá usualmente de cerca de 0,20 a cerca de 40 % de um tensoativo não iônico tal como etoxilato álcool, etoxilato de nonilfenol, alquilpoliglicosídeo, monoetanolamida de ácido graxo etoxilado de alquildimetilaminaóxido, monoetanolamida de ácido graxo, amida de ácido graxo de poliidroxi alquila ou derivados de N-acil N-alquila de glicosamina (“glucamidas”).

O detergente pode conter de 0 a 65 % de um reforçador de detergente ou agente de complexação tal como zeólito, difosfato, trifosfato, fosfonato, carbonato, citrato, ácido nitrilotriacético, ácido etilenodiaminotetraacético, ácido dietilenotriaminopentaacético, ácido alquil ou alquenilsuccínico, silicatos solúveis ou silicatos em camada (por exemplo, SKS-6 da Hoechst).

O detergente pode compreender um ou mais polímeros. Os exemplos são celulose carboximetílica, poli(vinilpirrolidona), poli(etileno glicol), poli(álcool vinílico), poli(vinilpiridina-N-óxido), poli(vinilimidazóis), policarboxilatos tais como poliacrilatos, copolímeros de ácido maléico/acrílico e copolímeros de lauril metacrilato/ácido acrílico.

O detergente pode conter um sistema de alvejamento que pode compreender uma fonte de H_2O_2 tal como perborato ou percarbonato que pode ser combinado com um ativador de alvejamento formador de perácido tal como tetraacetiletlenodiamina ou nonanoiloxibenzenossulfonato. Alternativamente, o sistema de alvejamento pode compreender peroxiácidos, por exemplo, do tipo amida, imida ou sulfona.

A(s) enzima(s) da composição detergente da invenção pode(m) ser estabilizada(s) usando-se agentes estabilizadores convencionais, por exemplo, um poliol tais como propileno glicol ou glicerol, um açúcar ou álcool de açúcar, ácido láctico, ácido bórico ou um derivado de ácido bórico, por exemplo, um éster aromático de borato ou um derivado de ácido fenil borônico tal como ácido 4-formilfenil borônico e a composição pode ser

formulada como descrito, por exemplo, na WO 92/19709 e WO 92/19708.

O detergente também pode conter outros ingredientes detergentes convencionais tais como por exemplo, condicionadores de tecido incluindo argilas, reforçadores de espuma, supressores de espuma de sabão, agentes anti-corrosão, agentes de suspensão de sujeira, agentes anti-redeposição de sujeira, corantes, bactericidas, abrillantadores óticos, hidrótropos, inibidores de mancha ou perfumes.

É atualmente considerado que nas composições detergentes qualquer enzima, em particular a enzima da invenção, pode ser adicionada em uma quantidade que corresponda a 0,01 a 100 mg de proteína de enzima por litro de líquido de lavagem, preferivelmente de 0,05 a 5 mg de proteína de enzima por litro de líquido de lavagem, em particular de 0,1 a 1 mg de proteína de enzima por litro de líquido de lavagem.

A enzima da invenção pode ser adicionalmente incorporada nas formulações de detergente divulgada na WO 97/07202 que é por meio desta incorporada como referência.

APLICAÇÕES INDUSTRIAIS EM COURO

Uma subtilase da invenção pode ser usada na indústria de couro, em particular para o uso na depilação de peles.

Na dita aplicação uma variante de subtilase da invenção é preferivelmente usada em uma composição de enzima que ainda compreende uma outra protease.

Para uma descrição mais detalhada de outras proteases adequadas ver a seção que diz respeito às enzimas adequadas para o uso em uma composição detergente (vide acima).

APLICAÇÕES INDUSTRIAIS EM LÃ

Uma subtilase da invenção pode ser usada na indústria de lã, em particular para o uso na limpeza de roupas que compreendem lã.

Na dita aplicação uma variante de subtilase da invenção é

preferivelmente usada em uma composição de enzima que ainda compreende uma outra protease.

Para uma descrição mais detalhada de outras proteases adequadas ver a seção que diz respeito às enzimas adequadas para o uso em
5 uma composição detergente (vide acima).

A invenção é descrita em mais detalhes nos seguintes exemplos que não são de qualquer modo intencionados a limitar o escopo da invenção como reivindicado.

MATERIAIS E MÉTODOS

10 **CEPAS:**

B. subtilis DN1885 (Diderichsen *et al.*, 1990).

B. lentus 309 e 147 são cepas específicas de *Bacillus lentus*, depositado com a NCIB e registrado os números de acesso NCIB 10309 e 10147 e descritas na Patente US Nº 3.723.250 incorporada aqui por
15 referência.

E. coli MC 1000 (M. J. Casadaban e S. N. Cohen (1980); J. Mol. Biol. 138 179 a 207), foi feita r⁻, m⁺ por métodos convencionais e também está descrita no Pedido de Patente US Série Nº 039.298.

PLASMÍDEOS:

20 pJS3: vetor de transporte de *E. coli* - *B. subtilis* contendo um gene sintético que codifica a subtilase 309. (Descrito por Jacob Schimdt *et al.* em Protein and Peptide letters 3: 39 a 44 (1996)).

pSX222: vetor de expressão de *B. subtilis* (Descrito na WO 96/34946).

25 **MÉTODOS GERAIS DE BIOLOGIA MOLECULAR:**

A menos que de outro modo mencionado as manipulações e transformações de DNA foram realizadas usando-se métodos padrão de biologia molecular (Sambrook *et al.* (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F. M. *et*

al. (eds.) “Current protocols in Molecular Biology”. John Wiley and Sons, 1995; Harwood, C. R. e Cutting, S. M. (eds.) “Molecular Biological Methods for Bacillus”. John Wiley and Sons, 1990).

5 As enzimas para manipulações de DNA foram usadas de acordo com as especificações dos fornecedores.

ENZIMAS PARA MANIPULAÇÕES DE DNA

A menos que de outro modo mencionado todas as enzimas para manipulações de DNA, tais como por exemplo, endonucleases de restrição, ligases, etc., são obtidas da New England Biolabs, Inc.

10 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

No contexto desta invenção a atividade proteolítica é expressada em unidades de Kilo NOVO Protease (KNPU). A atividade é determinada relativamente a uma enzima padrão (SAVINASE®) e a determinação é fundamentada na digestão de uma solução de dimetil caseína (DMC) pela enzima proteolítica em condições padrão, isto é, 50 °C, pH 8,3, 9 min. de tempo de reação, 3 min. de tempo de medição.

Um folheto AF 220/1 é disponibilizado sob requisição pela Novo Nordisk A/S, Dinamarca, cujo folheto é aqui incluído por referência.

20 Um GU é uma Unidade de Glicina, definida como a atividade de enzima proteolítica que, sob condições padrão, durante uns 15 minutos de incubação a 40° C, com N-acetil caseína como substrato, produz uma quantidade de grupo NH₂ equivalente a 1 mmol de glicina.

A atividade de enzima também pode ser medida usando-se o ensaio de PNA, de acordo com reação com o substrato solúvel de succinil-alanina-alanina-prolina-fenil-alanina-para-nitro-fenol, que é descrito no Journal of American Oil Chemists Society, Rothgeb, T. M., Goodlander, B. D., Garrison, P. H. e Smith, L. A., (1988).

FERMENTAÇÃO:

As fermentações para a produção de enzimas de subtilase

foram realizadas a 30° C em uma mesa de agitação rotativa (300 r.p.m.) em frascos Erlenmeyer de 500 ml com chicanas contendo 100 ml de meio BPX por 5 dias.

Consequentemente de modo a fazer, por exemplo, 2 litros de caldo, 20 frascos Erlenmeyer foram simultaneamente fermentados.

MEIO:

Composição do meio BPX (por litro):

	Amido de batata	100 g
	Cevada moída	50 g
10	Farinha de soja	20 g
	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	9 g
	Plurônico	0,1 g
	Caseinato de sódio	10 g

O amido no meio é liqüefeito com α -amilase e o meio é esterilizado aquecendo-se a 120° C por 45 minutos. Após a esterilização o pH do meio é ajustado para 9 pela adição de NaHCO₃ a 0,1 M.

EXEMPLO 1

Construção e expressão de variantes de enzima:

Mutagênese direcionada a sítio:

As variantes de subtilase 309 direcionadas a sítio da invenção que compreendem inserções específicas no elo de sítio ativo (b) entre as posições 99 e 100 foram fabricadas pela clonagem tradicional de fragmentos de DNA (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor, 1989) produzidos pela PCR de oligos contendo as inserções desejadas (ver abaixo).

O DNA plasmídico padrão foi pJS3 ou um análogo deste contendo uma variante de Subtilase 309.

As inserções foram introduzidas por mutagênese oligodirecionada para a construção de variantes de inserção S99SX (X =

qualquer resíduo de aminoácido inserido entre as posições 99 e 100) resultando em variantes de subtilase 309 S99SX.

As variantes de subtilase 309 foram transformadas no *E. coli*. O DNA purificado de uma cultura durante a noite destes transformantes foi transformado dentro do *B. subtilis* pela digestão de endonuclease de restrição, purificação de fragmentos de DNA, ligação, transformação de *B. subtilis*.

A Transformação de *B. subtilis* foi realizada como descrito por Dubnau *et al.*, 1971, J. Mol. Biol. 56, pp. 209 a 221.

MUTAGÊNESE RANDÔMICA LOCALIZADA DE MODO A INSERIR INSERÇÕES RANDÔMICAS EM UMA REGIÃO LOCALIZADA:

A estratégia global usada para realizar a mutagênese localizada randômica foi:

Um iniciador mutagênico (oligonucleotídeo) foi sintetizado correspondendo à seqüência de DNA que flanqueia o sítio de inserção, separado pelos pares de base de DNA que definem a inserção.

Subseqüentemente, o iniciador mutagênico resultante foi usado em uma reação de PCR com um iniciador oposto adequado. O fragmento de PCR resultante foi purificado e prolongado em uma segunda reação de PCR, antes de ser digerido pelas endonucleases e clonado no vetor de transporte do *E. coli* - *B. subtilis* (ver abaixo).

Alternativamente e se necessário, o fragmento de PCR resultante é usado em uma segunda reação de PCR como um iniciador com um segundo iniciador oposto adequado para permitir a digestão e a clonagem da região de mutagênese dentro do vetor de transporte. As reações de PCR são realizadas sob condições normais.

Seguindo-se esta estratégia uma biblioteca randômica localizada foi construída no SAVINASE em que as inserções foram introduzidas na região de elo de sítio ativo entre as posições 99 e 100.

As mutações foram introduzidas pelos iniciadores

mutagênicos (ver abaixo), de modo que todos os 20 aminoácidos são representados (N = 25 % de A, T, C e G; ao passo que S = 50 % de C e G. O fragmento de PCR produzido foi prolongado na direção do terminal N de Savinase por uma outra rodada de PCR pela combinação de uma seqüência de sobreposição com um fragmento de PCR produzido pela amplificação por PCR com os iniciadores; 5' CTA AAT ATT CGT GGT GGC GC 3' (sentido) e 5' GAC TTT AAC AGC GTA TAG CTC AGC 3' (anti-sentido). Os fragmentos de DNA prolongados foram clonados nos sítios Hind III e Mlu I do plasmídeo modificado pJS3 (ver acima) e depois as colônias de *E. coli* randomicamente selecionadas foram seqüenciadas para confirmar as mutações planejadas.

O iniciador mutagênico (5' GTT AAA GTC CTA GGG GCG AGC NNS GGT TCA GGT TCG GTC AGC TCG 3' (sentido)) foi usado em uma reação de PCR com um iniciador oposto de anti-sentido adequado, situado a jusante do sítio Mlu I no pJS3 (por exemplo, 5'- CCC TTT AAC CGC ACA GCG TTT -3' (anti-sentido)) e o plasmídeo pJS3 como padrão. Este produto de PCR resultante foi clonado dentro do vetor de transporte pJS3 usando-se as enzimas de restrição Hind III e Mlu I.

A biblioteca randômica foi transformada no *E. coli* por técnicas bem conhecidas.

A biblioteca preparada conteve aproximadamente 100.000 clones individuais/biblioteca.

Depois as colônias randomicamente selecionadas foram seqüenciadas para confirmar as mutações planejadas.

De modo a purificar uma variante de subtilase da invenção, o plasmídeo de expressão pJS3 do *B. subtilis* que compreende uma variante da invenção foi transformada dentro de uma cepa competente do *B. subtilis* e foi fermentado como descrito acima em um meio contendo 10 µg/ml de Cloranfenicol (CAM).

EXEMPLO 2

Purificação de variantes de enzima

Este procedimento diz respeito à purificação de uma fermentação em escala de 2 litros para a produção das subtilases da invenção
5 em uma célula hospedeira de *Bacillus*.

Aproximadamente 1,6 litros do caldo de fermentação foi centrifugado a 5000 rpm por 35 minutos em béqueres de 1 litro. Os sobrenadantes foram ajustados ao pH 6,5 usando-se 10 % de ácido acético e filtrados em placas de filtro Seitz Supra S100.

10 Os filtrados foram concentrados a aproximadamente 400 ml usando-se uma unidade Amicon CH2A UF equipada com um cartucho Amicon S1Y10 UF. O concentrado UF foi centrifugado e filtrado antes da absorção na temperatura ambiente em uma coluna de afinidade de Bacitracin no pH 7. A protease foi eluída da coluna de Bacitracin na temperatura
15 ambiente usando-se 25 % de 2-propanol e cloreto de sódio 1 M em uma solução tampão com ácido dimetilglutárico 0,01, ácido bórico 0,1 M e cloreto de cálcio ajustado ao pH 7.

As frações com atividade de protease da etapa de purificação de Bacitracin foram combinadas e aplicadas a uma coluna Sefadex G25 de
20 750 ml (5 cm de diâmetro) equilibrada com um tampão contendo ácido dimetilglutárico 0,01, ácido bórico 0,2 M e cloreto de cálcio 0,002 M ajustado ao pH 6,5.

As frações com atividade proteolítica da coluna Sefadex G25 foram combinadas e aplicadas a uma coluna de troca catiônica CM Sefarose
25 CL 6B de 150 ml (5 cm de diâmetro) equilibrada com um tampão contendo ácido dimetilglutárico 0,01 M, ácido bórico 0,2 M e cloreto de cálcio 0,002 M ajustado ao pH 6,5.

A protease foi eluída usando-se um gradiente linear de 0 a 0,1 M de cloreto de sódio em 2 litros do mesmo tampão (0 a 0,2 M de cloreto de

sódio no caso da Subtilisina 147).

Em uma protease da etapa final de purificação contendo frações da coluna CM Sefarose foram combinadas e concentradas em uma célula Amicon de ultrafiltração equipada com uma membrana GR81PP (da Danish Sugar Factories Inc.).

Usando-se as técnicas do Exemplo 1 para a construção e fermentação e o procedimento de isolamento acima as seguintes variantes da subtilisina 309 foram produzidas e isoladas:

	S99ST
10	S99SS
	S99SD
	S99SE
	S99SP
	S99SG
15	S99SH
	S99SI
	S99SA
	S99SP
	S99SK
20	S99SN
	S99SQ
	S99SR
	S99SSG
	S99ST+Y167A
25	S99TG+S101G
	S99ASG+S101T
	S99TC+S101C
	A98G+S99SQ

Estas variantes exibiram melhor desempenho de lavagem do

que a Savinase em um ensaio preliminar.

EXEMPLO 3

Desempenho de lavagem de composições detergentes que compreendem variantes de enzima

- 5 Os seguintes exemplos fornecem resultados de vários testes de lavagem que foram conduzidos sob as condições indicadas

MINI LAVAGEM

Condições de lavagem:

	Europa	Detergente 95	US
Dosagem de Detergente	4 g/l	3 g/l	1 g/l
Temperatura de lavagem	30° C	15 ° C	25° C
Tempo de lavagem	30 minutos	15 minutos	10 minutos
Dureza da água	18° dH (Ca ²⁺ /Mg ²⁺ - 5:1)	6° dH	6° dH (Ca ²⁺ /Mg ²⁺ - 2:1)
pH	Não ajustado	10,5	Não ajustado
Concentração da Enzima	1, 2, 5, 10, 30 nM		1, 2, 5, 10, 30 nM
Sistema de Teste	Béqueres de vidro de 150 ml com uma vareta de agitação	10 nm	Béqueres de vidro de 150 ml com uma vareta de agitação
Têxtil/volume	5 peças de têxtil (Ø 2,5 cm) em 50 ml de detergente	5 peças de têxtil (Ø 2,5 cm) em 50 ml de detergente	5 peças de têxtil (Ø 2,5 cm) em 50 ml de detergente
Material de Teste	EMPA116	EMPA117	EMPA117

DETERGENTES:

- 10 Os detergentes usados foram um detergente modelo, denominado Detergente 95 ou obtidos de supermercados na Dinamarca (OMO, folha informativa ED-9745105) e nos USA (Wisk, folha informativa ED-9711893), respectivamente. Antes de usar, toda a atividade enzimática nos detergentes foi inativada por tratamento com micro onda.

- 15 O Detergente 95 é uma formulação modelo simples. O pH é ajustado a 10,5, que está dentro da faixa normal para um detergente em pó. A composição de detergente modelo 95 é como segue:

25 % STP (Na₅P₃O₁₀)

25 % Na₂SO₄

- 20 10 % Na₂CO₃

	20 %	LAS (Nansa 80S)
	5,0 %	tensídeo não iônico (Dobanol 25-7)
	5,0 %	Na ₂ Si ₂ O ₅
	0,5 %	Celulose carboximetilica
5	9,5 %	Água

AMOSTRAS DE PANO:

As amostras de pano usadas foram EMPA116 e EMPA117, obtidas da EMPA Testmaterialen, Movenstrasse 12, CH-9015 St. Gall, Suíça.

REFLECTÂNCIA:

- 10 A medição de refletância (R) no material de teste foi feita a 460 nm usando-se um fotômetro Macbeth ColorEye 7000. As medições foram feitas de acordo com o protocolo dos fabricantes.

AVALIAÇÃO:

- 15 A avaliação do desempenho de lavagem de uma subtilase é determinada pelo fator melhoria ou pelo fator desempenho para a subtilase investigada.

- O fator melhoria, $IF_{Dose/resposta}$ é definido como a relação entre as inclinações das curvas de desempenho de lavagem para um detergente contendo a subtilase investigada e o mesmo detergente contendo uma subtilase de referência na concentração assintótica da subtilase indo a zero
- 20

$$IF_{Dose/resposta} = a/a_{ref}$$

O desempenho de lavagem é calculado de acordo com a formula I:

$$R = R_0 + \frac{a \cdot \Delta R_{max} \cdot c}{\Delta R_{max} + a \cdot c} \quad (I);$$

onde:

- 25 R é o desempenho de lavagem em unidades de refletância; R_p é a intercepção da curva apropriada com o eixo y (cego); a é a inclinação da curva apropriada quando $c \rightarrow 0$; c é a concentração da enzima; e ΔR_{max} é o efeito teórico máximo da lavagem quando $c \rightarrow \infty$.

O fator de desempenho, P, é calculado de acordo com a fórmula

II

$$P = \frac{R_{\text{Variante}} - R_{\text{Branco}}}{R_{\text{Savinase}} - R_{\text{Branco}}} \quad (\text{II})$$

onde

R_{variante} é a refletância do material de teste lavado com 10 nM de variante;

5 R_{savinase} é a refletância do material de teste lavado com 10 nM de Savinase;

R_{branco} é a refletância do material de teste lavado com nenhuma enzima.

Detergente Modelo 95

Variante	P
S99ASG+S101T	1,4
S99TG+S101G	1,3

US (detergente: US Wisk, amostra de tecido: EMPA117)

Variante	P
S99SA,	1,4
S99SP,	1,1
S99SK,	1,0
S99SN,	1,7
S99SR,	1,1
S99SQ,	1,5
S99SSG,	2,3
S99ASG+S101T	2,1
S99TC+S101C	0,7
S99TG+S101G	1,5*
A98G+S99SQ	1,2

*P calculado em $[E] = 5 \text{ nM}$

10

As subtilases da invenção são assim observadas exibir desempenho de lavagem melhorado em comparação com a Savinase®.

REIVINDICAÇÕES

1. Enzima de subtilase isolada da SEQ ID NO: 1 tendo um resíduo de aminoácido adicional na posição 99 da região (b) de elo de sítio ativo da posição 95 a 103, caracterizada pelo fato de que dita enzima de subtilase compreende uma modificação selecionada do grupo consistindo de:

5 S99SA,
S99SP,
S99SK,
S99SN,
10 S99SR,
S99SQ,
S99SC,
S99SG,
S99SE,
15 S99SD,
S99SH,
S99ST, e
S99SSG.

2. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende uma enzima de subtilase isolada como definida na reivindicação 1.

3. Composição de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que compreende adicionalmente uma celulase, lipase, cutinase, oxidoredutase, uma outra protease ou uma amilase.

4. Composição de acordo com as reivindicações 2 ou 3, caracterizada pelo fato de que a composição é uma composição detergente.

5. Uso de uma enzima de subtilase isolada como definida na reivindicação 1 ou de uma composição de enzima como definida nas reivindicações 2 ou 3, caracterizado pelo fato de ser em um detergente de lavar roupas e/ou um detergente de lavar louças.

RESUMO

“ENZIMA DE SUBTILASE ISOLADA, COMPOSIÇÃO, E, USO DE UMA ENZIMA DE SUBTILASE ISOLADA OU DE UMA COMPOSIÇÃO DE ENZIMA”.

- 5 Enzimas de subtilase dos subgrupos I-S1 e I-S2 tendo um resíduo de aminoácido adicional na posição 99 da região (b) de elo de sítio ativo da posição 95 a 103. As variantes de subtilases exibem desempenho de lavagem melhorado em um detergente em comparação com a sua enzima precursora.

LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS

<110> Novo Nordisk A/S
 <120> Enzimas de subtilase dos subgrupos I-S1 e I-S2 tendo um
 5 resíduo de aminoácido adicional em uma região de elo de sítio
 ativo.
 <130> 5794.204
 <140>
 <141>
 <160> 2
 10 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 275
 <212> PRT
 <213> *Bacillus licheniformis*
 15 <400> 1
 Ala Gln Thr Val Pro Tyr Gly Ile Pro Leu Ile Lys Ala Asp Lys Val
 1 5 10 15
 Gln Ala Gln Gly Phe Lys Gly Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp
 20 25 30
 Thr Gly Ile Gln Ala Ser His Pro Asp Leu Asn Val Val Gly Gly Ala
 35 40 45
 Ser Phe Val Ala Gly Glu Ala Tyr Asn Thr Asp Gly Asn Gly His Gly
 50 55 60
 Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asp Asn Thr Thr Gly Val
 65 70 75 80
 Leu Gly Val Ala Pro Ser Val Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Asn
 85 90 95
 Ser Ser Xaa Gly Ser Gly Thr Tyr Ser Gly Ile Val Ser Gly Ile Glu
 100 105 110
 Trp Ala Thr Thr Asn Gly Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
 115 120 125
 Pro Ser Gly Ser Thr Ala Met Lys Gln Ala Val Asp Asn Ala Tyr Ala

130	135	140
Arg Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Ser Ser Gly		
145	150	155 160
Asn Thr Asn Thr Ile Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Asp Ser Val Ile Ala		
	165	170 175
Val Gly Ala Val Asp Ser Asn Ser Asn Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val		
	180	185 190
Gly Ala Glu Leu Glu Val Met Ala Pro Gly Ala Gly Val Tyr Ser Thr		
	195	200 205
Tyr Pro Thr Ser Thr Tyr Ala Thr Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser		
	210	215 220
Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn		
	225	230 235 240
Leu Ser Ala Ser Gln Val Arg Asn Arg Leu Ser Ser Thr Ala Thr Tyr		
	245	250 255
Leu Gly Ser Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Glu Ala		
	260	265 270
Ala Ala Gln		
	275	
<210>	2	
<211>	270	
<212>	PRT	
<213>	<i>Bacillus lentus</i>	
5 <400>	2	
Ala Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala		
1	5	10 15
His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp		
	20	25 30
Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser		
	35	40 45
Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr		
	50	55 60

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