(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 367 505**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/57 (2006.01)
C12N 9/54 (2006.01)
C11D 3/386 (2006.01)
A23K 1/165 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **05018139 .5**
(96) Fecha de presentación : **23.10.1998**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1612271**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **04.01.2006**

(54) Título: **Variantes de proteasa con sustituciones múltiples con carga neta alterada para usar en detergentes.**

(30) Prioridad: **23.10.1997 US 956323**
23.10.1997 US 956324
23.10.1997 US 956564

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.11.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.11.2011

(73) Titular/es: **DANISCO US Inc.**
925 Page Mill Road
Palo Alto, California 94304, US

(72) Inventor/es: **Poulose, Ayrookaran J.;**
Schellenberger, Volker;
Kellis, James T., Jr.;
Paech, Christian;
Nadherny, Joanne;
Naki, Donald P.;
Caldwell, Robert M. y
Collier, Katherine D.

(74) Agente: **De Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 367 505 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Variantes de proteasa con sustituciones múltiples con carga neta alterada para usar en detergentes.

Antecedentes de la Invención

Las serina–proteasas son un subgrupo de carbonil–hidrolasas. Las mismas comprenden una clase diversa de enzimas que tienen una extensa gama de especificidades y funciones biológicas. Stroud, R. Sci. Amer., **131**: 74–88. A pesar de su diversidad funcional, la maquinaria catalítica de las serina–proteasas ha sido abordada por al menos dos familias de enzimas genéticamente distintas: 1) las subtilisinas y 2) las serina–proteasas de mamífero afines a la quimotripsina y serina–proteasas bacterianas homólogas (v.g., tripsina y *S. gresius* tripsina). Estas dos familias de serina–proteasas exhiben mecanismos de catálisis notablemente similares. Kraut, J. (1977), Annu. Rev. Biochem., **46**: 331–358. Adicionalmente, aunque la estructura primaria no está emparentada, la estructura terciaria de estas dos familias de enzimas reúne una tríada catalítica conservada de aminoácidos constituida por serina, histidina y aspartato.

Las subtilisinas son serina–proteasas (PM aprox. 27.500) que son secretadas en grandes cantidades por una gran diversidad de especies de *Bacillus* y otros microorganismos. La secuencia proteínica de la subtilisina ha sido determinada a partir de al menos nueve especies diferentes de *Bacillus*. Markland, F.S., et al. (1983), Hoppe–Seyler's Z. Physiol. Chem., **364**: 1537–1540. La estructura cristalográfica tri–dimensional de las subtilisinas de *Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus licheniformis* y varias variantes naturales de *B. lentus* ha sido consignada. Estos estudios indican que aunque la subtilisina no está emparentada genéticamente con las serina–proteasas de mamífero, tiene una estructura de sitio activo similar. Las estructuras cristalinas de rayos X de inhibidores peptídicos unidos covalentemente que contienen subtilisina (Robertus, J.D., et al. (1972), Biochemistry, **11**: 2439–2449) o complejos de productos (Robertus. J.D., et al. (1976), J. Biol. Chem., **251**: 1097–1103) han proporcionado también información concerniente al sitio activo y a la hendidura supuesta de unión al sustrato de la subtilisina. Adicionalmente, se han consignado un gran número de estudios de modificación cinética y química para subtilisina; Svendsen, B. (1976). Carlsberg Res. Commun., **41**: 237–291; Markland, F.S. id.) así como al menos un informe en el cual la cadena lateral de la metionina en el residuo 222 de la subtilisina se convirtió con peróxido de hidrógeno en metionina–sulfóxido (Stauffer, D.C., et al. (1965), J. Biol. Chem., **244**: 5333–5338) y se ha llevado a cabo una mutagénesis orientada extensa (Wells y Estell (1988) TIBS 13: 291–297).

El documento WO9100345 describe un método para mejorar la eficiencia de las subtilisinas en detergentes mediante la sustitución de los residuos aminoácidos con un residuo más negativo o más positivo y midiendo la eficiencia de la enzima en relación con el pH de la disolución de lavado. El documento WO9523221 describe que sustituyendo los residuos por otros más negativos se puede incrementar la eficiencia de lavado de una subtilisina en un sistema detergente europeo. También el documento EP 328229 describe que cambiando la carga de un residuo aminoácido de la subtilisina se puede incrementar la eficiencia de lavado de la enzima en muchos detergentes.

Una cuestión común en el desarrollo de una variante de proteasa para uso en una formulación detergente es la diversidad de condiciones de lavado que incluyen formulaciones detergentes variables en las que podría utilizarse una variante de proteasa. Por ejemplo, formulaciones detergentes utilizadas en diferentes áreas tienen distintas concentraciones de sus componentes relevantes presentes en el agua de lavado. Por ejemplo, un sistema detergente europeo tiene por lo general aproximadamente 450–5000 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado, mientras que un sistema detergente japonés tiene por lo general aproximadamente 667 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado. En Norteamérica, particularmente en los Estados Unidos, un sistema detergente tiene por lo general aproximadamente 975 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado. Sorprendentemente, se ha desarrollado un método para el diseño racional de una variante de proteasa para uso en un sistema de baja concentración detergente, un sistema de alta concentración detergente, y/o un sistema de concentración detergente media así como para el uso en los tres tipos de sistemas de concentración detergente.

Sumario de la Invención

La presente invención proporciona un método de mejora de la eficiencia de una subtilisina en un sistema de baja, media y alta concentración detergente que tiene menos de aproximadamente 800 ppm, entre aproximadamente 800 ppm y aproximadamente 2.000 ppm, y por encima de aproximadamente 2.000 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado respectivamente:

a)sustituir un aminoácido en una o más posiciones de residuo en una subtilisina precursora para producir una variante de subtilisina en la cual la sustitución altera la carga en dicha posición haciendo la carga más positiva o menos negativa comparada con el precursor;

b)sustituir un aminoácido en una o más posiciones de residuo en una subtilisina precursora para producir una variante de subtilisina en la que la sustición altera la carga en esa posición para hacer que la carga sea más negativa o menos positiva comparada con la del precursor;

c)someter a ensayo la variante para determinar su eficacia comparada con la de la subtilisina precursora en un sistema de baja, media y alta concentración de detergente que tiene menos de aproximadamente 800 ppm, entre aproximadamente 800 ppm y aproximadamente 2.000 ppm, y por encima de aproximadamente 2.000 ppm, de componentes detergentes presentes en el agua de lavado respectivamente; y

d)repetir las etapas a)-c) tanto como sea necesario para producir una variante de subtilisina que sea más eficaz en un sistema de baja, media y alta concentración de detergente, que una proteasa precursora.

La precursora puede ser una subtilisina de *Bacillus*, tal como subtilisina de *Bacillus lentus*.

Se proporciona también un método de producción de una composición detergente que comprende, habiendo mejorado la eficiencia de una subtilisina por producción de una variante de subtilisina por un método de la invención, formular la variante de subtilisina en una composición detergente en polvo o líquida que tiene un pH entre 6,5 y 12,0 a aproximadamente 0,1 hasta 5% en peso.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figs. 1 A–C representan la secuencia de DNA y de aminoácidos para la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* y un mapa de restricción parcial de este gen.

La Fig. 2 representa los residuos de aminoácidos conservados entre las subtilisinas de *Bacillus amyloliquefaciens* (BPN') y *Bacillus lentus* (tipo salvaje).

Las Figs. 3A y 3B representan la secuencia de aminoácidos de cuatro subtilisinas. La línea superior representa la secuencia de aminoácidos de subtilisina de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* (a la que se hace referencia también en ocasiones como subtilisina BPN'). La segunda línea representa la secuencia de aminoácidos de la subtilisina de *Bacillus subtilis*. La tercera línea representa la secuencia de aminoácidos de subtilisina de *B. licheniformis*. La cuarta línea representa la secuencia de aminoácidos de subtilisina de *Bacillus lentus* (a la que se hace referencia también como subtilisina 309 en el documento PCT WO89/06276). El símbolo designa la ausencia de residuos de aminoácidos específicos en comparación con la subtilisina BPN'.

Descripción Detallada de la Invención

Como se ha indicado arriba, ciertas geografías tienen ciertas condiciones de lavado y, así, utilizan tipos de detergentes diferentes. Por ejemplo, Japón utiliza un sistema de baja concentración de detergente, mientras que Europa utiliza un sistema de alta concentración de detergente. Como se ha expuesto previamente, los Estados Unidos utilizan un sistema de concentración media de detergente. Los autores de la presente invención han encontrado que diferentes variantes de proteasa se comportan óptimamente en estas formulaciones de detergente diferentes. Sin embargo, como resultado de estas observaciones, se esperaría que fuera imposible encontrar una proteasa que funcionara bien en los tres tipos de detergentes. Sorprendentemente, este no es el caso. Se ha desarrollado un método para diseñar de manera racional una variante de proteasa que funcina en los tres sistemas de concentrtación de detergente.

Se ha encontrado que, para producir una variante de proteasa que es más eficaz en un sistema de baja concentración de detergente, es necesario reemplazar residuo(s) cargado(s) positivamente con residuo(s) cargado(s) negativamente o residuos neutros y/o residuo(s) neutro(s) con residuo(s) cargado(s) negativamente. En contraste, se ha observado que para producir una variante de proteasa que es más eficaz en un sistema con alta concentración de detergente, es necesario reemplazar residuo(s) cargado(s) negativamente sea con residuo(s) cargado(s) positivamente o residuo(s) neutro(s) y/o residuo(s) neutro(s) con residuo(s) cargado(s) positivamente. Además, los autores han encontrado que muchas de las variantes de proteasa útiles en el sistema de baja concentración de detergente y/o el sistema de alta concentración de detergente también son eficaces en un sistema de concentración de detergente media. Equilibrando estos cambios, es posible producir una variante de proteasa que funciona bien en los tres sistemas de concdentración de detergente.

La carga electrostática que cualquier cadena lateral de aminoácido ionizable con una función ácida o básica adquiere en solución acuosa es función del pH. Los residuos ácidos Glu y Asp, en un proceso de equilibrio, pierden un protón por disociación entre pH 3 y 6 adquiriendo con ello una carga negativa. De manera similar, His, Lys, y Arg se desprotonizan gradualmente entre pH 5 y pH 8, pH 8,5 y 11,5, y pH 11 y 14, respectivamente, perdiendo con ello una carga positiva. El protón de TyrOH se disocia crecientemente entre pH 8,5 y 11,5, con lo que Tyr adquiere una carga negativa. El intervalo de disociación para el término carboxi es pH 1 a 4, produciéndose una carga negativa, y para el término amino es pH 8 a 11, acompañado por la pérdida de la carga positiva. Los intervalos de disociación para las cadenas laterales de aminoácidos dados aquí son valores medios para muchas proteínas, pero se sabe que los mismos se ven afectados por configuraciones estructurales anómalas en algunas proteínas.

El efecto acumulativo de todas las cargas determina si una proteína tiene una carga positiva neta o negativa neta a un pH dado. El pH al que las cargas positivas y negativas son igualmente eficaces y transmiten un estado electrostáticamente neutro a una proteína se denomina el punto isoeléctrico (pI). Una proteína perderá o ganará

carga cuando cambia el pH o cuando se añade o se elimina un aminoácido con un residuo de cadena lateral ionizable. Un aumento de carga positiva neta puede adquirirse sea por reemplazamiento de un residuo que a un pH dado está cargado negativamente con un residuo sin carga o cargado positivamente, conduciendo a un cambio formal de carga de +1 y +2, respectivamente. Por reemplazamiento de un residuo de cadena lateral sin carga con uno que está protonizado al pH dado, el cambio formal de carga sería +1. Análogamente, puede aumentarse una carga negativa neta reemplazando cadenas laterales cargadas positivamente y sin carga con cadenas laterales cargadas negativamente al pH de observación, conduciendo a una ganancia de aumento formal de carga negativa de –1 y –2, respectivamente.

Un sistema de baja concentración de detergente incluye detergentes en los cuales están presentes menos de aproximadamente 800 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado. Los detergentes japoneses se consideran típicamente sistemas de baja concentración de detergente, dado que los mismos tienen aproximadamente 667 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado.

Una concentración media de detergente incluye detergentes en los cuales están presentes entre aproximadamente 800 ppm y aproximadamente 2000 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado. Los detergentes de Norteamérica están considerados generalmente como sistemas de concentración media de detergente, dado que los mismos tienen aproximadamente 975 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado. Brasil tiene por regla general aproximadamente 1500 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado.

Un sistema de alta concentración de detergente incluye detergentes en los cuales están presentes más de aproximadamente 2000 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado. Los detergentes europeos se consideran generalmente como sistemas de alta concentración de detergente, dado que los mismos tienen aproximadamente 4500–5000 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado.

Los detergentes de Latinoamérica son generalmente detergentes con mejoradores de fosfato con altas jabonaduras, y la gama de detergentes utilizada en Latinoamérica puede caer tanto en las concentraciones de detergente medias como altas, dado que las mismas están comprendidas entre 1500 ppm y 6000 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado. Como se ha mencionado arriba, Brasil tiene por regla general aproximadamente 1500 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado. Sin embargo, otras geografías con detergentes mejoradores de fosfatos con altas jabonaduras, no limitadas a otros países de Latinoamérica, pueden tener sistemas de alta concentración de detergente hasta aproximadamente 6000 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado.

A la vista de lo que antecede, es evidente que las concentraciones de composiciones detergentes en las soluciones típicas de lavado en todo el mundo varían desde menos de aproximadamente 800 ppm de composición detergente ("geografías con baja concentración de detergente"), por ejemplo aproximadamente 667 ppm en Japón, hasta aproximadamente 800 ppm a aproximadamente 2000 ppm ("geografías con concentración media de detergente"), por ejemplo aproximadamente 975 ppm en EE.UU. y aproximadamente 1500 ppm en Brasil, hasta más de aproximadamente 2000 ppm ("geografías con alta concentración de detergente"), por ejemplo aproximadamente 4500 ppm a aproximadamente 5000 ppm en Europa y aproximadamente 6000 ppm en las geografías que emplean mejoradores de fosfato con altas jabonaduras.

Las concentraciones de las soluciones típicas de lavado se determinan empíricamente. Por ejemplo, en los EE.UU., una máquina lavadora típica contiene un volumen de aproximadamente 64,4 l de solución de lavado. De acuerdo con ello, para obtener una concentración de aproximadamente 975 ppm de detergente en la solución de lavado tienen que añadirse aproximadamente 62,79 g de composición detergente a los 64,4 l de solución de lavado. Esta cantidad es la cantidad típica dosificada en el agua de lavado por el usuario que utiliza la copa de dosificación proporcionada con el detergente.

Las proteasas son carbonil–hidrolasas que actúan generalmente para escindir enlaces peptídicos de proteínas o péptidos. Tal como se utiliza en esta memoria, "proteasa" significa una proteasa existente naturalmente o una proteasa recombinante. El término "proteasa" se utiliza intercambiablemente con el término "subtilisina", excepto en los casos en que el contexto exige otra cosa. Las subtilisinas se describen con mayor detalle más adelante.

La presente invención hace uso de enzimas proteasa que son variantes de carbonil–hidrolasa no existentes naturalmente que tienen una diferente actividad proteolítica, estabilidad, especificidad de sustrato, perfil de pH y/o características de eficiencia en comparación con el precursor del que se deriva la secuencia de aminoácidos de la variante. Específicamente, tales variantes de proteasa tienen una secuencia de aminoácidos que no se encuentra en la naturaleza, que se deriva por sustitución de una pluralidad de residuos de aminoácidos de una proteasa precursora con aminoácidos diferentes. La proteasa precursora puede ser una proteasa existente naturalmente o una proteasa recombinante.

Las variantes de proteasa útiles en esta invención abarcan la sustitución de cualquiera de los diecinueve L–aminoácidos existentes naturalmente en las posiciones de los residuos de aminoácidos designadas. Tales sustituciones pueden hacerse en cualquier subtilisina precursora (procariota, eucariota, etc.). A lo largo de esta

solicitud se hace referencia a diversos aminoácidos por los códigos comunes de una y tres letras. Dichos códigos están identificados en Dale, M.W. (1989), Molecular Genetics of Bacteria, John Wiley & Sons, Ltd., Apéndice B.

Las variantes de proteasas útiles en esta invención son variantes de subtilisina, y se derivan preferiblemente de una subtilisina de *Bacillus*. Más preferiblemente, las variantes de proteasas se derivan de subtilisina de *Bacillus lentus* y/o subtilisina 309.

Las subtilisinas son proteasas bacterianas o fúngicas que actúan generalmente para escindir enlaces peptídicos de proteínas o péptidos. Tal como se utiliza en esta memoria, "subtilisina" significa una subtilisina existente naturalmente o una subtilisina recombinante. Se conocen una serie de subtilisinas existentes naturalmente que son producidas y a menudo secretadas por diversas especies microbianas. Las secuencias de aminoácidos de los miembros de esta serie no son totalmente homólogas. Sin embargo, las subtilisinas de esta serie exhiben el mismo tipo o un tipo similar de actividad proteolítica. Esta clase de serina–proteasas comparte una secuencia de aminoácidos común que define una tríada catalítica que distingue las mismas de la clase de serina–proteasas afines a la quimotripsina. Las subtilisinas y las serina–proteasas afines a la quimotripsina tienen ambas una tríada catalítica que comprende aspartato, histidina y serina. En las proteasas afines a la subtilisina, el orden relativo de estos aminoácidos, leyendo desde el término amino al término carboxi, es aspartato–histidina–serina. En cambio, en las proteasas afines a la quimotripsina, el orden relativo es histidina–aspartato–serina. Por ello, el término subtilisina hace referencia en esta memoria a una serina–proteasa que tiene la tríada catalítica de las proteasas afines a la subtilisina. Ejemplos incluyen, pero sin carácter limitante, las subtilisinas identificadas en la Fig. 3 de esta memoria. Generalmente, y para los propósitos de la presente invención, la numeración de los aminoácidos en las proteasas corresponde a los números asignados en la secuencia de la subtilisina madura de *Bacillus amyloliquefaciens* presentada en la Fig. 1.

Las expresiones "subtilisina recombinante" o "proteasa recombinante" hacen referencia a una subtilisina o proteasa en la cual la secuencia de DNA que codifica la subtilisina o proteasa está modificada para producir una secuencia variante (o mutante) de DNA que codifica la sustitución, deleción o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos existente naturalmente. Métodos adecuados para producir dicha modificación, y que pueden combinarse con los expuestos en esta memoria, incluyen los expuestos en los documentos Patente U.S. RE 24.606; Patente U.S. 5.204.015 y Patente U.S. 5.185.258, Patente U.S. 5.700.676; Patente U.S. 5.801.038, y Patente U.S. 5.763.257.

"Subtilisinas no humanas" y el DNA que codifica las mismas se pueden obtener de muchos organismos procariotas y eucariotas. Ejemplos adecuados de organismos procariotas incluyen organismos gram–negativos tales como *E. coli* o *Pseudomonas* y bacterias gram–positivas tales como *Micrococcus* o *Bacillus*. Ejemplos de organismos eucariotas de los cuales se pueden obtener subtilisina y sus genes incluyen levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* y hongos tales como *Aspergillus* sp.

Una "variante de proteasa" tiene una secuencia de aminoácidos que se deriva de la secuencia de aminoácidos de una "proteasa precursora". Las proteasas precursoras incluyen proteasas existentes naturalmente y proteasas recombinantes. La secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa se "deriva" de la secuencia de aminoácidos de la proteasa precursora por la sustitución, deleción o inserción de uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos precursora. Dicha modificación es de la "secuencia de DNA precursora" que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteasa precursora más bien que de la manipulación de la enzima proteasa precursora *per se*. Métodos adecuados para dicha manipulación de la secuencia de DNA precursora incluyen métodos descritos en esta memoria, así como métodos conocidos por los expertos en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos EP 0 328299, WO89/06279 y patentes y solicitudes de los EE.UU. a las que se ha hecho referencia anteriormente en esta memoria).

Estos números de posición de aminoácidos se refieren a los asignados a la secuencia de subtilisina madura de *Bacillus amyloliquefaciens* presentada en Fig. 1. La invención, sin embargo, no está limitada a la mutación de esta subtilisina particular sino que se extiende a proteasas precursoras que contienen residuos de aminoácidos en posiciones que son "equivalentes" a los residuos particulares identificados en la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. En una realización preferida de la presente invención, la proteasa precursora es una subtilisina de *Bacillus lentus* y las sustituciones se hacen en las posiciones de los residuos de aminoácidos equivalentes en *B. lentus* correspondientes a las arriba enumeradas.

Una posición de residuo (aminoácido) de una proteasa precursora es equivalente a un residuo de subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* si la misma es homóloga (es decir, correspondiente en posición en la estructura primaria o terciaria) o análoga a un residuo o porción específico(a) de dicho residuo en la subtilisina de Bacillus *amyloliquefaciens* (es decir, que tiene la misma o similar capacidad funcional para combinarse, reaccionar, o interaccionar químicamente).

A fin de establecer homología de la estructura primaria, la secuencia de aminoácidos de una proteasa precursora se compara directamente con la secuencia primaria de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* y particularmente con una serie de residuos que se sabe son invariantes en subtilisinas para las cuales se conoce la secuencia. Por

ejemplo, la Fig. 2 de esta memoria muestra los residuos conservados entre subtilisina de *B. amyloliquefaciens* y *B. lentus*. Después de la alineación de los residuos conservados, permitiendo las inserciones y deleciones necesarias a fin de mantener la alineación (es decir, evitando la eliminación de residuos conservados por deleción e inserción arbitrarias), se definen los residuos equivalentes a aminoácidos particulares en la secuencia primaria de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. La alineación de los residuos conservados debería conservar preferiblemente el 100% de dichos residuos. Sin embargo, la alineación de más de 75% o de una proporción tan pequeña como 50% de los residuos conservados es también adecuada para definir residuos equivalentes. La conservación de la tríada catalítica, Asp32/His64/Ser221 debería mantenerse. Siezen et al. (1991) Protein Eng. **4(7)**: 719–737 muestra la alineación de un gran número de serina–proteasas. Siezen et al. hacen referencia a la agrupación como subtilasas o serina–proteasas semejantes a subtilisina.

Por ejemplo, en Fig. 3, la secuencia de aminoácidos de subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis* (*carlsbergensis)* y *Bacillus lentus* están alineadas para proporcionar el grado máximo de homología entre las secuencias de aminoácidos. Una comparación de estas secuencias muestra que hay varios residuos conservados contenidos en cada secuencia. Estos residuos conservados (como entre BPN' y *B. lentus*) se identifican en Fig. 2.

Así, estos residuos conservados pueden utilizarse para definir los residuos de aminoácidos equivalentes correspondientes de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* en otras subtilisinas tales como subtilisina de *Bacillus lentus* (publicación PCT No. WO89/06279 publicada el 13 de julio de 1989), la enzima precursora de proteasas preferida en esta invención, o la subtilisina a la que se hace referencia como PB92 (EP 0 328 299), que es altamente homóloga a la subtilisina preferida de *Bacillus lentus*. Las secuencias de aminoácidos de algunas de estas subtilisinas se alinean en las Figs. 3A y 3B con la secuencia de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* para producir la homología máxima de residuos conservados. Como se puede ver, existen varias deleciones en la secuencia de *Bacillus lentus* en comparación con la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. Así, por ejemplo, el aminoácido equivalente para Val165 en la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* en las otras subtilisinas es isoleucina para *B. lentus* y *B. licheniformis*.

Pueden definirse también "residuos equivalentes" por determinación de homología al nivel de la estructura terciaria para una proteasa precursora cuya estructura terciaria ha sido determinada por cristalografía de rayos X. Los residuos equivalentes se definen como aquéllos para los cuales las coordenadas atómicas de dos o más de los átomos de la cadena principal de un residuo de aminoácido particular de la proteasa precursora y la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* (N sobre N, CA sobre CA, C sobre C y O sobre O) están dentro de 0,13 nm y preferiblemente 0,1 nm después de la alineación. La alineación se consigue después que se ha orientado y posicionado el modelo óptimo para dar la superposición máxima de coordenadas atómicas de los átomos distintos de hidrógeno de las proteínas de la proteasa en cuestión respecto a la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. El modelo óptimo es el modelo cristalográfico que da el factor R mínimo para datos experimentales de difracción con la resolución más alta posible.

$$\text{Factor } R = \frac{\sum_h |Fo(h)| - |Fc(h)|}{\sum_h |Fo(h)|}$$

Los residuos equivalentes que son funcionalmente análogos a un residuo específico de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* se definen como aquellos aminoácidos de la proteasa precursora que pueden adoptar una conformación tal que los mismos alteran, modifican o contribuyen a la estructura de la proteína, la fijación de sustrato o la catálisis de una manera definida y atribuida a un sitio específico de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. Adicionalmente, los mismos son aquellos residuos de la proteasa precursora (para la cual se ha obtenido una estructura terciaria por cristalografía de rayos X) que ocupan una posición análoga en tal grado que, aunque los átomos de la cadena principal del residuo dado pueden no satisfacer los criterios de equivalencia basados en la ocupación de una posición homóloga, las coordenadas atómicas de al menos dos de los átomos de la cadena lateral del residuo están dentro de 0,13 nm de los átomos correspondientes de la cadena lateral de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. Las coordenadas de la estructura tri–dimensional de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* se exponen en la Publicación EPO No. 0 251 446 (equivalente a la Patente U.S. 5.182.204, cuya descripción se incorpora en esta memoria por referencia) y pueden utilizarse como se ha reseñado anteriormente para determinar residuos equivalentes al nivel de la estructura terciaria.

Algunos de los residuos identificados para sustitución son residuos conservados, mientras que otros no lo son. En el caso de los residuos que no se conservan, la sustitución de uno o más aminoácidos está limitada a sustituciones que producen una variante que tiene una secuencia de aminoácidos que no corresponde a una encontrada en la naturaleza. En el caso de los residuos conservados, dichas sustituciones no deberían dar como resultado una secuencia existente naturalmente. Las variantes de proteasa de la presente invención incluyen las formas maduras de variantes de proteasa, así como las formas pro y prepro de tales variantes de proteasa. Las formas prepro son la construcción preferida, dado que ésta facilita la expresión, secreción y maduración de las variantes de proteasa.

"Prosecuencia" hace referencia a una secuencia de aminoácidos unida a la porción N–terminal de la forma madura de una proteasa que, cuando se separa, da como resultado la aparición de la forma "madura" de la proteasa. Muchas enzimas proteolíticas se encuentran en la naturaleza como productos de traducción proenzimáticos y, en ausencia de procesamiento post–traduccional, se expresan de esta manera. Una prosecuencia preferida para producción de variantes de proteasa es la prosecuencia supuesta de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, aunque pueden utilizarse otras prosecuencias de proteasa.

Una "secuencia señal" o "presecuencia" hace referencia a cualquier secuencia de aminoácidos unida a la porción N–terminal de una proteasa o a la porción N–terminal de una proproteasa que puede participar en la secreción de las formas madura o pro de la proteasa. Esta definición de secuencia señal es una definición funcional, que tiene por objeto incluir todas aquellas secuencias de aminoácidos codificadas por la porción N–terminal del gen de proteasa que participan en la realización de la secreción de la proteasa en condiciones naturales. La presente invención utiliza dichas secuencias para efectuar la secreción de las variantes de proteasa como se definen en esta memoria. Una posible secuencia señal comprende los siete primeros residuos de aminoácidos de la secuencia señal de la subtilisina de *Bacillus subtilis* condensados al resto de la secuencia señal de la subtilisina de *Bacillus lentus* (ATCC 21536).

Una forma "prepro" de una variante de proteasa está constituida por la forma madura de la proteasa que tiene una prosecuencia enlazada operativamente al término amino de la proteasa y una secuencia "pre" o "señal" enlazada operativamente al término amino de la prosecuencia.

"Vector de expresión" hace referencia a una construcción de DNA que contiene una secuencia de DNA que está enlazada operativamente a una secuencia de control adecuada capaz de efectuar la expresión de dicho DNA en un hospedador adecuado. Tales secuencias de control incluyen un promotor para efectuar la transcripción, una secuencia operadora opcional para controlar dicha transcripción, una secuencia que codifica sitios adecuados de fijación de ribosoma en el mRNA y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. El vector puede ser un plásmido, una partícula de fago, o simplemente una inserción genómica potencial. Una vez transformado en un hospedador adecuado, el vector puede replicarse y funcionar independientemente del genoma hospedador, o puede, en algunos casos, integrarse en el genoma propiamente dicho. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se utilizan en ocasiones de modo intercambiable dado que el plásmido es la forma de vector utilizada más generalmente en la actualidad. Sin embargo, la invención tiene por objeto incluir tales otras formas de vectores de expresión que sirven para funciones equivalentes y que se conocen o puedan llegar a conocerse en la técnica.

Las "células hospedadoras" utilizadas en la presente invención son generalmente hospedadores procariotas o eucariotas que se han manipulado preferiblemente por los métodos descritos en la Patente U.S. RE 34.606 para hacerlos incapaces de secretar endoproteasa enzimáticamente activa. Una célula hospedadora preferida para expresión de proteasa es la cepa BG2036 de *Bacillus* que es deficiente en proteasa neutra y proteasa alcalina (subtilisina) enzimáticamente activas. La construcción de la cepa BG2036 se describe en detalle en la Patente U.S. 5.264.366. Otras células hospedadoras para la expresión de proteasa incluyen *Bacillus subtilis* I168 (descrito también en la Patente U.S. RE 34.606 y la Patente U.S. 5.264.366), así como cualquier cepa adecuada de *Bacillus* tal como *B. licheniformis, B. lentus*, etc.

Las células hospedadoras se transforman o transfectan con vectores construidos utilizando técnicas de DNA recombinante. Tales células hospedadoras transformadas son capaces de replicar vectores que codifican las variantes de proteasa o expresan la variante de proteasa deseada. En el caso de los vectores que codifican la forma pre o prepro de la variante de proteasa, dichas variantes, cuando se expresan, son secretadas típicamente por la célula hospedadora al medio de la célula hospedadora.

"Enlazado operativamente", cuando describe la relación entre dos regiones de DNA, significa simplemente que las mismas son afines funcionalmente una a otra. Por ejemplo, una presecuencia está enlazada operativamente a un péptido si la misma funciona como una secuencia señal, participando en la secreción de la forma madura de la proteína, lo que implica muy probablemente la escisión de la secuencia señal. Un promotor está enlazado operativamente a una secuencia codificante si el mismo controla la transcripción de la secuencia; un sitio de fijación de ribosoma está enlazado operativamente a una secuencia codificante si el mismo está posicionado de tal modo que permite la traducción.

Los genes que codifican la proteasa precursora existente naturalmente se pueden obtener de acuerdo con los métodos generales conocidos por los expertos en la técnica. Los métodos comprenden generalmente la síntesis de sondas marcadas que tienen secuencias supuestas que codifican regiones de la proteasa de interés, preparación de genotecas genómicas a partir de organismos que expresan la proteasa, y escrutinio de las genotecas respecto al gen de interés por hibridación a las sondas. Los clones que se hibridan positivamente se mapean y secuencian a continuación.

La proteasa clonada se utiliza luego para transformar una célula hospedadora a fin de expresar la proteasa. El gen de proteasa se liga luego a un plásmido de alto número de copias. Este plásmido se replica en hospedadores en el

sentido de que contiene los elementos bien conocidos necesarios para replicación del plásmido: un promotor enlazado operativamente al gen en cuestión (que puede ser suministrado como el propio promotor homólogo del gen si el mismo es reconocido, es decir transcrito, por el hospedador), una región de terminación de la transcripción y poliadenilación (necesaria para estabilidad del mRNA transcrito por el hospedador a partir de gen de proteasa en ciertas células hospedadoras eucariotas) que es exógena o es suministrada por la región del terminador endógeno del gen de proteasa y, deseablemente, un gen de selección tal como un gen de resistencia a antibióticos que permite el mantenimiento continuo en cultivo de las células hospedadoras infectadas con el plásmido por crecimiento en medios que contienen antibiótico. Los plásmidos de número de copias alto contienen también un origen de replicación para el hospedador, permitiendo con ello que se generen grandes números de plásmidos en el citoplasma sin limitaciones cromosómicas. No obstante, está dentro del alcance de esta invención la integración de copias múltiples del gen de proteasa en el genoma hospedador. Esto es facilitado por organismos procariotas y eucariotas que son particularmente susceptibles de recombinación homóloga.

El gen puede ser un gen natural de *B. lentus*. Alternativamente, puede producirse un gen sintético que codifica una proteasa precursora existente naturalmente o mutante. En un enfoque de este tipo, se determina la secuencia de DNA y/o de aminoácidos de la proteasa precursora. Después de ello se sintetizan fragmentos múltiples solapantes de DNA sintético monocatenario que, por hibridación y ligación, producen un DNA sintético que codifica la proteasa precursora. Un ejemplo de construcción de un gen sintético se expone en el Ejemplo 3 de la Patente U.S. 5.204.015.

Una vez que el gen de la proteasa precursora existente naturalmente o sintético ha sido clonado, se realizan diversas modificaciones para aumentar el uso del gen más allá de la síntesis de la proteasa precursora existente naturalmente. Tales modificaciones incluyen la producción de proteasas recombinantes como se expone en la Patente U.S. RE 34.606 y la Publicación EPO No. 0 251 446, y la producción de las variantes de proteasa descritas en esta memoria.

Se puede utilizar el método siguiente de mutagénesis de casete para facilitar la construcción de las variantes de proteasa de la presente invención, aunque pueden utilizarse otros métodos. En primer lugar, se obtiene el gen existente naturalmente que codifica la proteasa y se secuencia total o parcialmente. Después de ello, se escanea la secuencia en busca de un punto en el cual se desee hacer una mutación (deleción, inserción o sustitución) de uno o más aminoácidos en la enzima codificada. Las secuencias que flanquean este punto se evalúan en cuanto a la presencia de sitios de restricción para reemplazar un segmento corto del gen con una agrupación de oligonucleótidos que, una vez expresada, codificará diversos mutantes. Tales sitios de restricción son preferiblemente sitios singulares dentro del gen de la proteasa a fin de facilitar el reemplazamiento del segmento de gen. Sin embargo, puede utilizarse cualquier sitio de restricción conveniente que no sea excesivamente redundante en el gen de proteasa, con tal que los fragmentos de gen generados por digestión de restricción puedan reensamblarse en la secuencia apropiada. Sí no están presentes sitios de restricción en localizaciones situadas dentro de una distancia conveniente del punto seleccionado (de 10 a 15 nucleótidos), tales sitios se generan por sustitución de nucleótidos en el gen de tal manera que ni el marco de lectura ni los aminoácidos codificados se cambien en la construcción final. La mutación del gen a fin de cambiar su secuencia para adaptarse a la secuencia deseada se realiza por extensión con el iniciador M13 de acuerdo con métodos conocidos generalmente. La tarea de localización de regiones flanqueantes adecuadas y evaluación de los cambios necesarios para llegar a dos secuencias de sitio de restricción convenientes se hace rutinaria por la redundancia del código genético, un mapa de enzimas de restricción del gen y el gran número de enzimas de restricción diferentes. Obsérvese que si está disponible un sitio de restricción flanqueante conveniente, el método anterior precisa ser utilizado sólo en conexión con la región flanqueante que no contiene un sitio.

Una vez que se ha clonado el DNA existente naturalmente o DNA sintético, los sitios de restricción que flanquean las posiciones a mutar se digieren con las enzimas de restricción cognadas y se ligan al gen una pluralidad de casetes de oligonucleótidos complementarias de los términos extremos. Por este método se simplifica la mutagénesis, dado que todos los oligonucleótidos pueden sintetizarse de tal modo que tengan los mismos sitios de restricción, y no son necesarios enlazadores sintéticos en ningún caso para crear los sitios de restricción.

Tal como se utiliza en esta memoria, la actividad proteolítica se define como la tasa de hidrólisis de enlaces peptídicos por miligramo de enzima activa. Existen muchos procedimientos bien conocidos para medir la actividad proteolítica (K.M. Kalisz, "Microbial Proteinases", Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, A. Fiechter, compilador, 1988). Además de o como alternativa a la actividad proteolítica modificada, las enzimas variantes pueden tener otras propiedades modificadas tales como K_m, k_{cat}, relación k_{cat}/K_m y/o especificidad de sustrato modificada y/o perfil de actividad de pH modificado. Estas enzimas pueden adaptarse para el sustrato particular cuya presencia se anticipa, por ejemplo, en usos de colada.

Se ha encontrado que variantes de proteasa que contienen sustituciones de los aminoácidos en una o más posiciones de residuos de tal modo que la sustitución altera la carga en dicha posición haciendo la carga más negativa o menos positiva en comparación con una proteasa precursora, son más eficaces en una concentración baja de detergente que una proteasa precursora.

Se ha encontrado que variantes de proteasa que contienen sustituciones de los aminoácidos en una o más posiciones de residuos de tal modo que la sustitución altera la carga en dicha posición haciendo la carga más positiva o menos negativa en comparación con una proteasa precursora son más eficaces en una concentración alta de detergente que una proteasa precursora.

Además, los autores han encontrado que muchas de la variantes de proteasa útiles en el sitema de baja concentración de detergente y/o el sistema de alta concentración de detergente también son eficaces en un sistema de concentración de detergente media.

Estas sustituciones se hacen preferiblemente en la subtilisina de *Bacillus lentus* (recombinante o de tipo nativo), aunque las sustituciones pueden hacerse en cualquier proteasa de *Bacillus,* preferiblemente subtilisinas de *Bacillus*.

Basándose en los resultados de escrutinio obtenidos con las proteasas variantes, las mutaciones indicadas en la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* son importantes para la actividad proteolítica, eficiencia y/o estabilidad de estas enzimas y la eficiencia limpiadora o de lavado de tales enzimas variantes.

Las variantes de proteasa descritas son útiles en la formulación de composiciones detergentes. Cierto número de compuestos conocidos son agentes tensioactivos adecuados en composiciones que comprenden tales mutantes de proteasas. Éstos incluyen detergentes no iónicos, aniónicos, catiónicos, o de ion dipolar, como se describe en los documentos U.S. 4.404.128 concedido a Barry J. Anderson y U.S. 4.261.868 concedido a Jiri Flora, et al. Una formulación detergente adecuada es la descrita en el Ejemplo 7 de la Patente U.S. 5.204.015. La técnica está familiarizada con las diferentes formulaciones que pueden utilizarse como composiciones de limpieza.

Las variantes descritas exhiben una eficiencia mejorada en una composición detergente (en comparación con el precursor). Tal como se utiliza en esta memoria, la eficiencia mejorada en un detergente se define como el aumento de limpieza de ciertas manchas sensibles a enzimas tales como grasa o sangre, como se determina por evaluación visual después de un ciclo de lavado estándar.

Las proteasas pueden formularse en detergentes conocidos en polvo y líquidos que tienen pH comprendido entre 6,5 y 12,0 a niveles de aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 5% (preferiblemente 0,1% a 0,5%) en peso. Estas composiciones detergentes de limpieza pueden incluir también otras enzimas tales como proteasas, amilasas, celulasas, lipasas o endoglicosidasas conocidas, así como mejoradores y estabilizadores.

La adición de las proteasas a composiciones de limpieza convencionales no crea ninguna limitación especial de uso. Dicho de otro modo, cualesquiera temperaturas y pH adecuados para el detergente son adecuados también para las presentes composiciones con tal que el pH esté dentro del intervalo arriba indicado, y la temperatura sea inferior a la temperatura de desnaturalización de la proteasa descrita. Adicionalmente, las proteasas pueden utilizarse en una composición de limpieza sin detergentes, sea, una vez más, solas o en combinación con mejoradores y estabilizadores.

La presente invención se refiere también a composiciones de limpieza que contienen variantes de proteasa. Las composiciones de limpieza pueden contener adicionalmente aditivos que se utilizan de modo habitual en composiciones de limpieza. Éstos pueden seleccionarse, pero sin carácter limitante, de blanqueantes, agentes tensioactivos, mejoradores, enzimas y catalizadores de blanqueo. Resultaría fácilmente evidente para una persona con experiencia ordinaria en la técnica qué aditivos son adecuados para inclusión en las composiciones. La lista proporcionada en esta memoria no es en modo alguno exhaustiva y debería tomarse sólo como ejemplos de aditivos adecuados. Será también inmediatamente evidente para una persona con experiencia ordinaria en la técnica utilizar sólo aquellos aditivos que son compatibles con las enzimas y otros componentes de la composición, por ejemplo, agentes tensioactivos.

Cuando está presente, la cantidad de aditivo existente en la composición de limpieza es de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 99,9%, con preferencia aproximadamente 1% a aproximadamente 95%, y de modo más preferible aproximadamente 1% a aproximadamente 80%.

Una composición detergente producida por los métodos de la presente invención puede utilizarse para tratar por ejemplo seda o lana como se describe en publicaciones tales como los documentos RD 216.034; EP 134.267; U.S. 4.533.359; y EP 344.259.

Lo que sigue se presenta a modo de ejemplo y no debe interpretarse como limitación del alcance de las reivindicaciones.

Ejemplo 1

Se produjeron y purificaron un gran número de variantes de proteasa utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Todas las mutaciones se realizaron en la subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*.

Las variantes de proteasa producidas se ensayaron respecto a eficiencia en dos tipos de detergente y condiciones de lavado utilizando un ensayo de ... descrito en "An improved method of assayen for a perferred enzyme and/or prefferred detergent composition", U.S. No. de serie 60/068796.

Las Tablas 1–13 enumeran las variantes de proteasas ensayadas y los resultados de los ensayos en dos detergentes diferentes. Todos los valores se dan como comparación a la primera proteasa que se muestra en la Tabla (es decir, un valor de 1,32 indica una capacidad para eliminar el 132% de la mancha en la posición al 100% de la primera variante incluida en la tabla).

La columna A muestra la diferencia de carga de una variante. Para la columna B, el detergente era 0,67 g/l de Ariel Ultra filtrado (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, EE.UU.), en una solución que contenía 51,4 mg/l de dureza mixta Ca^{2+}/Mg^{2+}, y se utilizaron 0,3 ppm de enzima en cada pocillo a 25ºC (sistema con baja concentración de detergente). Para la columna C, el detergente era 3,38 g/l de Ariel Futur filtrado (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, EE.UU.), en una solución que contenía 256,8 mg/l de dureza mixta ca^{2+}/Mg^{2+}, y se utilizaron 0,3 ppm de enzima en cada pocillo a 40ºC (sistema con alta concentración de detergente).

Tabla 1

						A	B	C
N76D	S103A	V1041	Q109R				1,00	1,00
N76D	S103A	V104I	Q109R	Q245R		+1	0,48	1,41

Tabla 2

									A	B	C
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	Q245R				1,00	1,00
V68A	N76D	S103A	V1041	G159D	N204D	Q236H	Q245R		-1	1,11	0,03

Tabla 3

						A	B	C
V68A	N76D	S103A	V1041				1,00	1,00
T22K	V68A	N76D	S103A	V104I		+1	0,74	1,85

Tabla 4

							A	B	C
N76D	S103A	V104I	M222S					1,00	1,00
N76D	S103A	V104I	N173R	M222S			0	0,66	1,84
Q12R	N76D	S103A	V104I	M222S	Q245R		+1	0,41	5,84

Tabla 5

										A	B	C
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R					1,00	1,00
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R	N261D			-1	1,79	0,81
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	R170S	N185D	M222S	N243D	Q245R	-3	2,87	0,02

Tabla 6

											A	B	C
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H							1,00	1,00

											A	B	C
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	Q245R					+1	0,94	6,80
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K				+3	0,44	20,60

Tabla 7

										A	B	C
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R				1,00	1,00
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210R	A232V	Q236H	Q245R		+1	0,44	2,66

Tabla 8

										A	B	C
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K				1,00	1,00
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		-1	1,96	0,65

Tabla 9

									A	B	C
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R				1,00	1,00
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	K237E	Q245R		-2	1,27	0,12

Tabla 10

										A	B	C
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V				1,00	1,00
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V		1	1,56	0,48

Tabla 11

										A	B	C
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1,00	1,00
S103A	V104I	G159D	L217E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		-1	1,90	0,15

Tabla 12

											A	B	C
S103A	V104I	S101G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1,00	1,00
N76D	S103A	V104I	S101G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		-1	1,28	0,39

Tabla 13

											A	B	C
N620	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			1,00	1,00
N62D	S103A	V104I	Q109R	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	+1	0,40	1,74

Ejemplo 2

Se fabricaron las variantes de proteasa siguientes y se ensayaron como se indica en el Ejemplo 1.

Las variantes indicadas en la Tabla 14 son variantes de proteasa que tienen ambos tipos de sustituciones: aquéllas que alteran la carga en una posición haciendo la carga más negativa o menos positiva, y aquéllas que alteran la carga en una posición haciendo la carga más positiva o menos negativa en comparación con *B. lentus* GG36, así como sustituciones neutras que no afectan a la carga en una posición de residuo dada. Esto produce variantes de proteasa que se comportan mejor que un estándar tanto en sistemas con baja concentración de detergente (columna A; 0,67 g/l de Ariel Ultra filtrado (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, EE.UU.), en una solución que contenía 51,4 mg/litro de dureza mixta Ca^{2+}/Mg^{2+}, y se utilizaron 0,3 ppm de enzima en cada pocillo a 25ºC) y sistemas con alta concentración de detergente (columna B; 3,38 g/l de Ariel Futur filtrado (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, EE.UU.), en una solución que contenía 256,8 mg/litro de dureza mixta Ca^{2+}/Mg^{2+}, y se utilizaron 0,3 ppm de enzima en cada pocillo a 40ºC).

Tabla 14

											A	B
N76D	S103A	V104I									1,00	1,00
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K				1,41	1,85
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A		1,30	1,73
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2,77	1,20
V68A	S103A	V104I	N140D	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K			2,96	1,42
N43K	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R				2,05	1,78
N43D	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K			2,00	1,34
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A215R	A232V	Q236H	Q245R			1,67	1,45
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R			2,16	1,72
N76D	S103A	V104I	V147I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248S	K251R		1,35	1,29
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	S256R			2,01	1,72
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R			2,09	1,62
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1,44	1,41
G20R	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		1,81	1,72
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	L257R		1,51	1,41
V68A	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1,04	1,50
N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V				1,92	1,09

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Genencor International, Inc.

<120> VARIANTES DE PROTEASA CON SUSTITUCIONES MÚLTIPLES CON CARGA NETA ALTERADA PARA USAR EN DETERGENTES

<130> GRF/FP6304083

<140>
<141>

<150> 98955111.4
<151> 1998-10-23

<150> 08/956,323
<151> 1997-10-23

<150> 08/956,564
<151> 1997-10-23

<150> 08/956,324
<151> 1997-10-23

<160> 6.

<170> FastSEQ para Windows Versión 3.0

<210> 1
<211> 1497
<212> DNA
<213> B. Amyloliquefaciens

<220>
<221> CDS
<222> (96)...(1245)
<400> 1

```
ggtctactaa aatattattc catactatac aattaataca cagaataatc tgtctattgg      60
ttattctgca aatgaaaaaa aggagaggat aaaga gtg aga ggc aaa aaa gta        113
                                       Val Arg Gly Lys Lys Val
                                        1               5

tgg atc agt ttg ctg ttt gct tta gcg tta atc ttt acg atg gcg ttc       161
Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Ala Leu Ile Phe Thr Met Ala Phe
            10                  15                  20

ggc agc aca tcc tct gcc cag gcg gca ggg aaa tca aac ggg gaa aag       209
Gly Ser Thr Ser Ser Ala Gln Ala Ala Gly Lys Ser Asn Gly Glu Lys
        25                  30                  35

aaa tat att gtc ggg ttt aaa cag aca atg agc acg atg agc gcc gct       257
Lys Tyr Ile Val Gly Phe Lys Gln Thr Met Ser Thr Met Ser Ala Ala
    40                  45                  50

aag aag aaa gat gtc att tct gaa aaa ggc ggg aaa gtg caa aag caa       305
Lys Lys Lys Asp Val Ile Ser Glu Lys Gly Gly Lys Val Gln Lys Gln
 55                  60                  65                  70
```

```
ttc aaa tat gta gac gca gct tca gtc aca tta aac gaa aaa gct gta      353
Phe Lys Tyr Val Asp Ala Ala Ser Val Thr Leu Asn Glu Lys Ala Val
                 75                  80                  85

aaa gaa ttg aaa aaa gac ccg agc gtc gct tac gtt gaa gaa gat cac      401
Lys Glu Leu Lys Lys Asp Pro Ser Val Ala Tyr Val Glu Glu Asp His
            90                  95                 100

gta gca cat gcg tac gcg cag tcc gtg cct tac ggc gta tca caa att      449
Val Ala His Ala Tyr Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Val Ser Gln Ile
        105                 110                 115

aaa gcc cct gct ctg cac tct caa ggc tac act gga tca aat gtt aaa      497
Lys Ala Pro Ala Leu His Ser Gln Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys
    120                 125                 130

gta gcg gtt atc gac agc ggt atc gat tct tct cat cct gat tta aag      545
Val Ala Val Ile Asp Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asp Leu Lys
135                 140                 145                 150

gta gca agc gga gcc agc atg gtt cct tct gaa aca aat cct ttc caa      593
Val Ala Ser Gly Ala Ser Met Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Phe Gln
                155                 160                 165

gac aac aac tct cac gga act cac gtt gcc ggc aca gtt gcg gct ctt      641
Asp Asn Asn Ser His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu
            170                 175                 180

aat aac tca atc ggt gta tta ggc gtt gcg cca agc gca tca ctt tac      689
Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser Leu Tyr
        185                 190                 195

gct gta aaa gtt ctc ggt gct gac ggt tcc ggc caa tac agc tgg atc      737
Ala Val Lys Val Leu Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile
    200                 205                 210

att aac gga atc gag tgg gcg atc gca aac aat atg gac gtt att aac      785
Ile Asn Gly Ile Glu Trp Ala Ile Ala Asn Asn Met Asp Val Ile Asn
215                 220                 225                 230

atg agc ctc ggc gga cct tct ggt tct gct gct tta aaa gcg gca gtt      833
Met Ser Leu Gly Gly Pro Ser Gly Ser Ala Ala Leu Lys Ala Ala Val
                235                 240                 245

gat aaa gcc gtt gca tcc ggc gtc gta gtc gtt gcg gca gcc ggt aac      881
Asp Lys Ala Val Ala Ser Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn
            250                 255                 260

gaa ggc act tcc ggc agc tca agc aca gtg ggc tac cct ggt aaa tac      929
Glu Gly Thr Ser Gly Ser Ser Ser Thr Val Gly Tyr Pro Gly Lys Tyr
        265                 270                 275

cct tct gtc att gca gta ggc gct gtt gac agc agc aac caa aga gca      977
Pro Ser Val Ile Ala Val Gly Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arg Ala
    280                 285                 290

tct ttc tca agc gta gga cct gag ctt gat gtc atg gca cct ggc gta     1025
Ser Phe Ser Ser Val Gly Pro Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val
295                 300                 305                 310
```

```
tct atc caa agc acg ctt cct gga aac aaa tac ggg gcg tac aac ggt      1073
Ser Ile Gln Ser Thr Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly
                315                 320                 325

acg tca atg gca tct ccg cac gtt gcc gga gcg gct gct ttg att ctt      1121
Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu
            330                 335                 340

tct aag cac ccg aac tgg aca aac act caa gtc cgc agc agt tta gaa      1169
Ser Lys His Pro Asn Trp Thr Asn Thr Gln Val Arg Ser Ser Leu Glu
        345                 350                 355

aac acc act aca aaa ctt ggt gat tct ttg tac tat gga aaa ggg ctg      1217
Asn Thr Thr Thr Lys Leu Gly Asp Ser Leu Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu
    360                 365                 370

atc aac gta caa gcg gca gct cag taa a acataaaaaa ccggccttgg          1265
Ile Asn Val Gln Ala Ala Ala Gln  *
375                 380

ccccgccggt tttttattat ttttcttcct ccgcatgttc aatccgctcc ataatcgacg    1325
gatggctccc tctgaaaatt ttaacgagaa acggcgggtt gacccggctc agtcccgtaa    1385
cggccaactc ctgaaacgtc tcaatcgccg cttcccggtt tccggtcagc tcaatgccat    1445
aacggtcggc ggcgttttcc tgataccggg agacggcatt cgtaatcgga tc            1497
```

<210> 2
<211> 1497
<212> PRT
<213> B. amyloliquefaciens

<400> 2

```
Gly Gly Thr Cys Thr Ala Cys Thr Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Thr
 1               5                  10                  15
Ala Thr Thr Cys Cys Ala Thr Ala Cys Thr Ala Thr Ala Cys Ala Ala
            20                  25                  30
Thr Thr Ala Ala Thr Ala Cys Ala Cys Ala Gly Ala Ala Thr Ala Ala
        35                  40                  45
Thr Cys Thr Gly Thr Cys Thr Ala Thr Thr Gly Gly Thr Thr Ala Thr
    50                  55                  60
Thr Cys Thr Gly Cys Ala Ala Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala
65                  70                  75                  80
Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Thr Ala Ala Ala Gly Ala Gly
                85                  90                  95
Thr Gly Ala Gly Ala Gly Gly Cys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Thr
            100                 105                 110
Ala Thr Gly Gly Ala Thr Cys Ala Gly Thr Thr Thr Gly Cys Thr Gly
        115                 120                 125
Thr Thr Thr Gly Cys Thr Thr Thr Ala Gly Cys Gly Thr Thr Ala Ala
    130                 135                 140
Thr Cys Thr Thr Thr Ala Cys Gly Ala Thr Gly Gly Cys Gly Thr Thr
145                 150                 155                 160
Cys Gly Gly Cys Ala Gly Cys Ala Cys Ala Thr Cys Cys Thr Cys Thr
                165                 170                 175
Gly Cys Cys Cys Ala Gly Gly Cys Gly Gly Cys Ala Gly Gly Gly Ala
            180                 185                 190
Ala Ala Thr Cys Ala Ala Ala Cys Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala
        195                 200                 205
Gly Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Thr Gly Thr Cys Gly Gly Gly
```

210 215 220
Thr Thr Thr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Ala Cys Ala Ala Thr Gly Ala
225 230 235 240
Gly Cys Ala Cys Gly Ala Thr Gly Ala Gly Cys Gly Cys Cys Gly Cys
245 250 255
Thr Ala Ala Gly Ala Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ala Thr Gly Thr Cys
260 265 270
Ala Thr Thr Thr Cys Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Cys Gly
275 280 285
Gly Gly Ala Ala Ala Gly Thr Gly Cys Ala Ala Ala Ala Gly Cys Ala
290 295 300
Ala Thr Thr Cys Ala Ala Ala Thr Ala Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys
305 310 315 320
Gly Cys Ala Gly Cys Thr Thr Cys Ala Gly Thr Cys Ala Cys Ala Thr
325 330 335
Thr Ala Ala Ala Cys Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Cys Thr Gly Thr
340 345 350
Ala Ala Ala Ala Gly Ala Ala Thr Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala
355 360 365
Gly Ala Cys Cys Cys Gly Ala Gly Cys Gly Thr Cys Gly Cys Thr Thr
370 375 380
Ala Cys Gly Thr Thr Gly Ala Ala Gly Ala Ala Gly Ala Thr Cys Ala
385 390 395 400
Cys Gly Thr Ala Gly Cys Ala Cys Ala Thr Gly Cys Gly Thr Ala Cys
405 410 415
Gly Cys Gly Cys Ala Gly Thr Cys Cys Gly Thr Gly Cys Cys Thr Thr
420 425 430
Ala Cys Gly Gly Cys Gly Thr Ala Thr Cys Ala Cys Ala Ala Ala Thr
435 440 445
Thr Ala Ala Ala Gly Cys Cys Cys Cys Thr Gly Cys Thr Cys Thr Gly
450 455 460
Cys Ala Cys Thr Cys Thr Cys Ala Ala Gly Gly Cys Thr Ala Cys Ala
465 470 475 480
Cys Thr Gly Gly Ala Thr Cys Ala Ala Ala Thr Gly Thr Thr Ala Ala
485 490 495
Ala Gly Thr Ala Gly Cys Gly Gly Thr Thr Ala Thr Cys Gly Ala Cys
500 505 510
Ala Gly Cys Gly Gly Thr Ala Thr Cys Gly Ala Thr Thr Cys Thr Thr
515 520 525
Cys Thr Cys Ala Thr Cys Cys Thr Gly Ala Thr Thr Thr Ala Ala Ala
530 535 540
Gly Gly Thr Ala Gly Cys Ala Ala Gly Cys Gly Gly Ala Gly Cys Cys
545 550 555 560
Ala Gly Cys Ala Thr Gly Gly Thr Thr Cys Cys Thr Thr Cys Thr Gly
565 570 575
Ala Ala Ala Cys Ala Ala Ala Thr Cys Cys Thr Thr Thr Cys Cys Ala
580 585 590
Ala Gly Ala Cys Ala Ala Cys Ala Ala Cys Thr Cys Thr Cys Ala Cys
595 600 605
Gly Gly Ala Ala Cys Thr Cys Ala Cys Gly Thr Thr Gly Cys Cys Gly
610 615 620
Gly Cys Ala Cys Ala Gly Thr Thr Gly Cys Gly Gly Cys Thr Cys Thr
625 630 635 640
Thr Ala Ala Thr Ala Ala Cys Thr Cys Ala Ala Thr Cys Gly Gly Thr
645 650 655
Gly Thr Ala Thr Thr Ala Gly Gly Cys Gly Thr Thr Gly Cys Gly Cys
660 665 670
Cys Ala Ala Gly Cys Gly Cys Ala Thr Cys Ala Cys Thr Thr Thr Ala
675 680 685

Cys Gly Cys Thr Gly Thr Ala Ala Ala Ala Gly Thr Thr Cys Thr Cys
690 695 700
Gly Gly Thr Gly Cys Thr Gly Ala Cys Gly Gly Thr Thr Cys Cys Gly
705 710 715 720
Gly Cys Cys Ala Ala Thr Ala Cys Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Thr
725 730 735
Cys Ala Thr Thr Ala Ala Cys Gly Gly Ala Ala Thr Cys Gly Ala Gly
740 745 750
Thr Gly Gly Gly Cys Gly Ala Thr Cys Gly Cys Ala Ala Ala Cys Ala
755 760 765
Ala Thr Ala Thr Gly Gly Ala Cys Gly Thr Thr Ala Thr Thr Ala Ala
770 775 780
Cys Ala Thr Gly Ala Gly Cys Cys Thr Cys Gly Gly Cys Gly Gly Ala
785 790 795 800
Cys Cys Thr Thr Cys Thr Gly Gly Thr Thr Cys Thr Gly Cys Thr Gly
805 810 815
Cys Thr Thr Thr Ala Ala Ala Ala Gly Cys Gly Gly Cys Ala Gly Thr
820 825 830
Thr Gly Ala Thr Ala Ala Ala Gly Cys Cys Gly Thr Thr Gly Cys Ala
835 840 845
Thr Cys Cys Gly Gly Cys Gly Thr Cys Gly Thr Ala Gly Thr Cys Gly
850 855 860
Thr Thr Gly Cys Gly Gly Cys Ala Gly Cys Cys Gly Gly Thr Ala Ala
865 870 875 880
Cys Gly Ala Ala Gly Gly Cys Ala Cys Thr Thr Cys Cys Gly Gly Cys
885 890 895
Ala Gly Cys Thr Cys Ala Ala Gly Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Gly
900 905 910
Gly Cys Thr Ala Cys Cys Cys Thr Gly Gly Thr Ala Ala Ala Thr Ala
915 920 925
Cys Cys Cys Thr Thr Cys Thr Gly Thr Cys Ala Thr Thr Gly Cys Ala
930 935 940
Gly Thr Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly Thr Thr Gly Ala Cys Ala
945 950 955 960
Gly Cys Ala Gly Cys Ala Ala Cys Cys Ala Ala Ala Gly Ala Gly Cys
965 970 975
Ala Thr Cys Thr Thr Thr Cys Thr Cys Ala Ala Gly Cys Gly Thr Ala
980 985 990
Gly Gly Ala Cys Cys Thr Gly Ala Gly Cys Thr Thr Gly Ala Thr Gly
995 1000 1005
Thr Cys Ala Thr Gly Gly Cys Ala Cys Cys Thr Gly Gly Cys Gly Thr
1010 1015 1020
Ala Thr Cys Thr Ala Thr Cys Cys Ala Ala Ala Gly Cys Ala Cys Gly
1025 1030 1035 104
Cys Thr Thr Cys Cys Thr Gly Gly Ala Ala Ala Cys Ala Ala Ala Thr
1045 1050 1055
Ala Cys Gly Gly Gly Gly Cys Gly Thr Ala Cys Ala Ala Cys Gly Gly
1060 1065 1070
Thr Ala Cys Gly Thr Cys Ala Ala Thr Gly Gly Cys Ala Thr Cys Thr
1075 1080 1085
Cys Cys Gly Cys Ala Cys Gly Thr Thr Gly Cys Cys Gly Gly Ala Gly
1090 1095 1100
Cys Gly Gly Cys Thr Gly Cys Thr Thr Thr Gly Ala Thr Thr Cys Thr
1105 1110 1115 112
Thr Thr Cys Thr Ala Ala Gly Cys Ala Cys Cys Cys Gly Ala Ala Cys
1125 1130 1135
Thr Gly Gly Ala Cys Ala Ala Ala Cys Ala Cys Thr Cys Ala Ala Gly
1140 1145 1150
Thr Cys Cys Gly Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr Thr Thr Ala Gly Ala

```
        1155                1160                1165
Ala Ala Ala Cys Ala Cys Cys Ala Cys Thr Ala Cys Ala Ala Ala Ala
    1170                1175                1180
Cys Thr Thr Gly Gly Thr Gly Ala Thr Thr Cys Thr Thr Thr Gly Thr
1185                1190                1195                120
Ala Cys Thr Ala Thr Gly Gly Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Cys Thr
                1205                1210                1215
Gly Ala Thr Cys Ala Ala Cys Gly Thr Ala Cys Ala Ala Gly Cys Gly
            1220                1225                1230
Gly Cys Ala Gly Cys Thr Cys Ala Gly Thr Ala Ala Ala Ala Cys Ala
        1235                1240                1245
Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Cys Cys Gly Gly Cys Cys Thr Thr Gly
    1250                1255                1260
Gly Cys Cys Cys Cys Gly Cys Cys Gly Gly Thr Thr Thr Thr Thr Thr
1265                1270                1275                128
Ala Thr Thr Ala Thr Thr Thr Thr Thr Cys Thr Thr Cys Cys Thr Cys
                1285                1290                1295
Cys Gly Cys Ala Thr Gly Thr Thr Cys Ala Ala Thr Cys Cys Gly Cys
            1300                1305                1310
Thr Cys Cys Ala Thr Ala Ala Thr Cys Gly Ala Cys Gly Gly Ala Thr
        1315                1320                1325
Gly Gly Cys Thr Cys Cys Cys Thr Cys Thr Gly Ala Ala Ala Ala Thr
    1330                1335                1340
Thr Thr Thr Ala Ala Cys Gly Ala Gly Ala Ala Ala Cys Gly Gly Cys
1345                1350                1355                136
Gly Gly Gly Thr Thr Gly Ala Cys Cys Cys Gly Gly Cys Thr Cys Ala
                1365                1370                1375
Gly Thr Cys Cys Cys Gly Thr Ala Ala Cys Gly Gly Cys Cys Ala Ala
            1380                1385                1390
Cys Thr Cys Cys Thr Gly Ala Ala Ala Cys Gly Thr Cys Thr Cys Ala
        1395                1400                1405
Ala Thr Cys Gly Cys Cys Gly Cys Thr Thr Cys Cys Cys Gly Gly Thr
    1410                1415                1420
Thr Thr Cys Cys Gly Gly Thr Cys Ala Gly Cys Thr Cys Ala Ala Thr
1425                1430                1435                144
Gly Cys Cys Ala Thr Ala Ala Cys Gly Gly Thr Cys Gly Gly Cys Gly
                1445                1450                1455
Gly Cys Gly Thr Thr Thr Thr Cys Cys Thr Gly Ala Thr Ala Cys Cys
            1460                1465                1470
Gly Gly Gly Ala Gly Ala Cys Gly Gly Cys Ala Thr Thr Cys Gly Thr
        1475                1480                1485
Ala Ala Thr Cys Gly Gly Ala Thr Cys
    1490                1495
```

<210> 3
<211> 275
<212> PRT
<213> B. amyloliquefaciens

<400> 3

Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Val Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu
1 5 10 15
His Ser Gln Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp
20 25 30
Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asp Leu Lys Val Ala Gly Gly Ala
35 40 45
Ser Met Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Phe Gln Asp Asn Asn Ser His
50 55 60
Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly

65 70 75 80
Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu
85 90 95
Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu
100 105 110
Trp Ala Ile Ala Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
115 120 125
Pro Ser Gly Ser Ala Ala Leu Lys Ala Ala Val Asp Lys Ala Val Ala
130 135 140
Ser Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Thr Ser Gly
145 150 155 160
Ser Ser Ser Thr Val Gly Tyr Pro Gly Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala
165 170 175
Val Gly Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val
180 185 190
Gly Pro Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr
195 200 205
Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly Ala Tyr 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
Trp Thr Asn Thr Gln Val Arg Ser Ser Leu Glu Asn Thr Thr Thr Lys
245 250 255
Leu Gly Asp Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala
260 265 270
Ala Ala Gln
275

<210> 4
<211> 275
<212> PRT
<213> B. subtilis

<400> 4

Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Ile Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu
1 5 10 15
His Ser Gln Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp
20 25 30
Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asp Leu Asn Val Arg Gly Gly Ala
35 40 45
Ser Phe Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Tyr Gln Asp Gly Ser Ser His
50 55 60
Gly Thr His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly
65 70 75 80
Val Leu Gly Val Ser Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu
85 90 95
Asp Ser Thr Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu
100 105 110
Trp Ala Ile Ser Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
115 120 125
Pro Thr Gly Ser Thr Ala Leu Lys Thr Val Val Asp Lys Ala Val Ser
130 135 140
Ser Gly Ile Val Val Ala Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Ser Ser Gly
145 150 155 160
Ser Thr Ser Thr Val Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Pro Ser Thr Ile Ala
165 170 175
Val Gly Ala Val Asn Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Ala
180 185 190
Gly Ser Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr
195 200 205
Leu Pro Gly Gly Thr Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr
210 215 220
Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Thr
225 230 235 240
Trp Thr Asn Ala Gln Val Arg Asp Arg Leu Glu Ser Thr Ala Thr Tyr
245 250 255
Leu Gly Asn Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala
260 265 270
Ala Ala Gln
275

<210> 5
<211> 274
<212> PRT
<213> B. licheniformis

<400> 5

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

<210> 6
<211> 269
<212> PRT
<213> B. lentus

<400> 6

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

REIVINDICACIONES

1. Método de mejora de la eficiencia de una subtilisina en un sistema de baja, media y alta concentración detergente que tiene menos de aproximadamente 800 ppm, entre aproximadamente 800 ppm y aproximadamente 2.000 ppm, y por encima de aproximadamente 2.000 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado respectivamente:

a)sustituir un aminoácido en una o más posiciones de residuo en una subtilisina precursora para producir una variante de subtilisina en la cual la sustitución altera la carga en dicha posición haciendo la carga más positiva o menos negativa comparada con el precursor;

b)sustituir un aminoácido en una o más posiciones de residuo en una subtilisina precursora para producir una variante de subtilisina en la que la sustición altera la carga en esa posición para hacer que la carga sea más negativa o menos positiva comparada con la del precursor;

c)someter a ensayo la variante para determinar su eficacia comparada con la de la subtilisina precursora en un sistema de baja, media y alta concentración de detergente que tiene menos de aproximadamente 800 ppm, entre aproximadamente 800 ppm y aproximadamente 2.000 ppm, y por encima de aproximadamente 2.000 ppm, de componentes detergentes presentes en el agua de lavado respectivamente; y

d)repetir las etapas a)-c) tanto como sea necesario para producir una variante de subtilisina que sea más eficaz en un sistema de baja, media y alta concentración de detergente, que una proteasa precursora.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el precursor es una subtilisina de *Bacillus*.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el cual el precursor es una subtilisina de *Bacillus lentus*.

4. Un método de producción de una composición detergente que comprende, habiendo mejorado la eficiencia de una subtilisina por producción de una variante de subtilisina por un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, formular dicha variante de subtilisina en una composición detergente en polvo o líquida que tiene un pH entre 6,5 y 12,0 para aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 5,0% en peso.

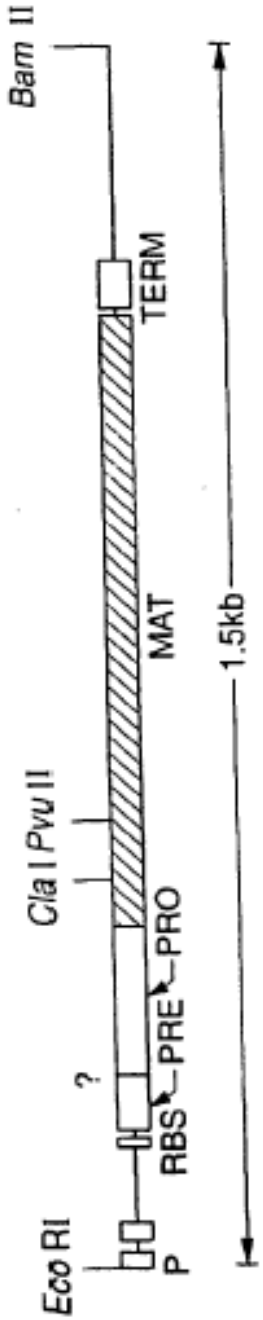


FIG._1A

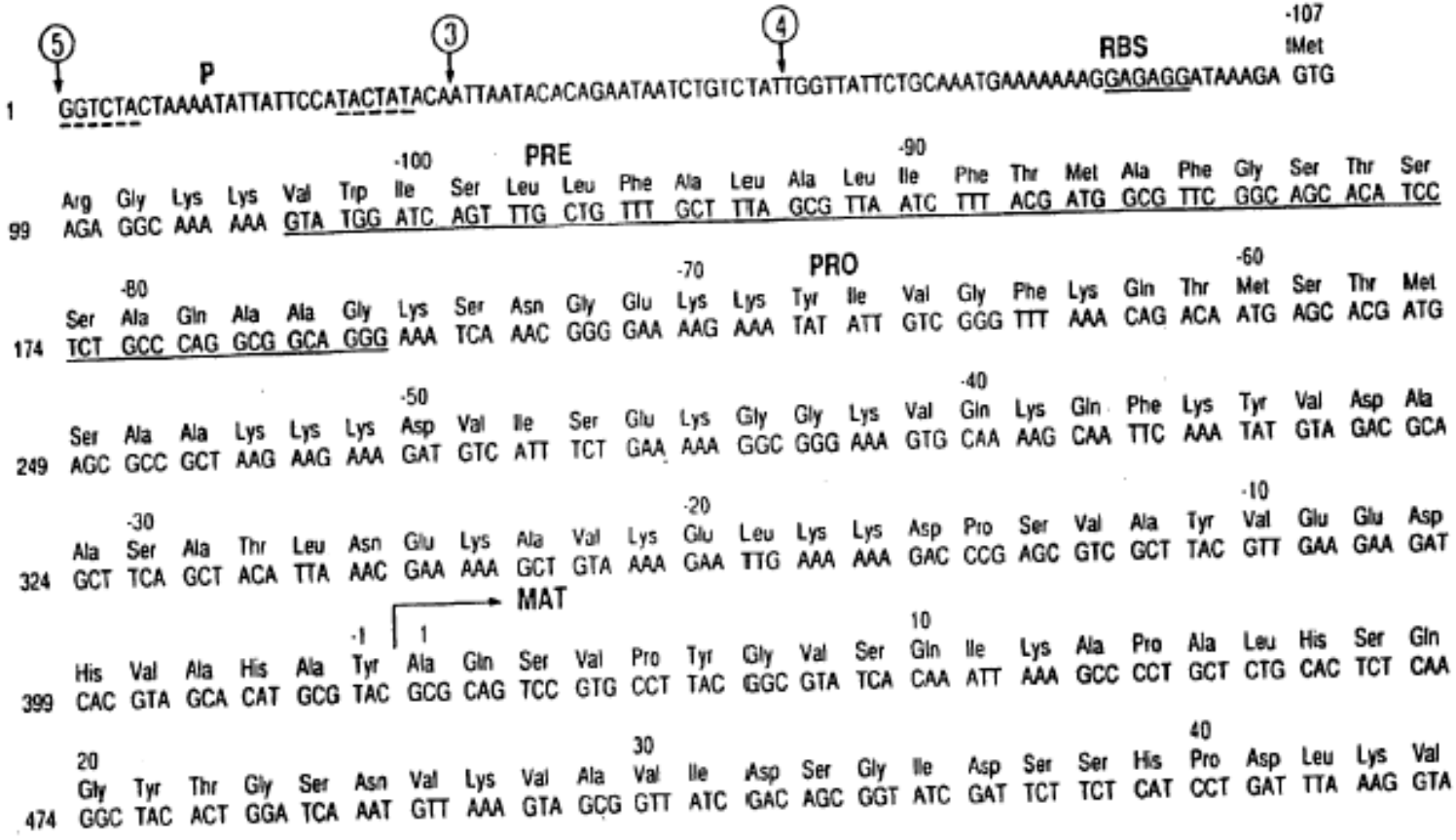

5
3
4
P
RBS
-107
fMet
1 GGTCTACTAAAATATTATTCCATACTATACAATTAATACACAGAATAATCTGTCTATTGGTTATTCTGCAAATGAAAAAAAGGAGAGGATAAAGA GTG
PRE
-100
-90
99 Arg Gly Lys Lys Val Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Ala Leu Ile Phe Thr Met Ala Phe Gly Ser Thr Ser
AGA GGC AAA AAA GTA TGG ATC AGT TTG CTG TTT GCT TTA GCG TTA ATC TTT ACG ATG GCG TTC GGC AGC ACA TCC
PRO
-80
-70
-60
174 Ser Ala Gln Ala Ala Gly Lys Ser Asn Gly Glu Lys Lys Tyr Ile Val Gly Phe Lys Gln Thr Met Ser Thr Met
TCT GCC CAG GCG GCA GGG AAA TCA AAC GGG GAA AAG AAA TAT ATT GTC GGG TTT AAA CAG ACA ATG AGC ACG ATG
-50
-40
249 Ser Ala Ala Lys Lys Lys Asp Val Ile Ser Glu Lys Gly Gly Lys Val Gln Lys Gln Phe Lys Tyr Val Asp Ala
AGC GCC GCT AAG AAG AAA GAT GTC ATT TCT GAA AAA GGC GGG AAA GTG CAA AAG CAA TTC AAA TAT GTA GAC GCA
-30
-20
-10
324 Ala Ser Ala Thr Leu Asn Glu Lys Ala Val Lys Glu Leu Lys Lys Asp Pro Ser Val Ala Tyr Val Glu Glu Asp
GCT TCA GCT ACA TTA AAC GAA AAA GCT GTA AAA GAA TTG AAA AAA GAC CCG AGC GTC GCT TAC GTT GAA GAA GAT
MAT
-1
1
10
399 His Val Ala His Ala Tyr Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Val Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu His Ser Gln
CAC GTA GCA CAT GCG TAC GCG CAG TCC GTG CCT TAC GGC GTA TCA CAA ATT AAA GCC CCT GCT CTG CAC TCT CAA
20
30
40
474 Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asp Leu Lys Val
GGC TAC ACT GGA TCA AAT GTT AAA GTA GCG GTT ATC GAC AGC GGT ATC GAT TCT TCT CAT CCT GAT TTA AAG GTA

FIG._1B-1

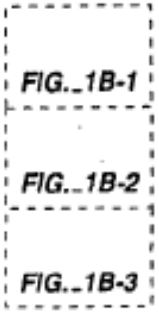
						50						Pro	Asn			60	Asp									
	Ala	Gly	Gly	Ala	Ser	Met	Val	Pro	Ser	Glu	Thr	Asn	Pro	Phe	Gln	Asp	Asn	Asn	Ser	His	Gly	Thr	His	Val	Ala
549	GCA	GGC	GGA	GCC	AGC	ATG	GTT	CCT	TCT	GAA	ACA	AAT	CCT	TTC	CAA	GAC	AAC	AAC	TCT	CAC	GGA	ACT	CAC	GTT	GCC
	70										80								Ser	Ala	90					
	Gly	Thr	Val	Ala	Ala	Leu	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	GGT	GTA	TTA	GGC	GTT	GCG	CCA	AGC	GCA	TCA	CTT	TAC	GCT	GTA	AAA
				Asp	Ala	100										110									
	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	AGC	TGG	ATC	ATT	AAC	GGA	ATC	GAG	TGG	GCG	ATC	GCA	AAC	AAT	ATG
	120										130										140				
	Asp	Val	Ile	Asn	Met	Ser	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Gly	Ser	Ala	Ala	Leu	Lys	Ala	Ala	Val	Asp	Lys	Ala	Val	Ala
774	GAC	GTT	ATT	AAC	ATG	AGC	CTC	GGC	GGA	CCT	TCT	GGT	TCT	GCT	GCT	TTA	AAA	GCG	GCA	GTT	GAT	AAA	GCC	GTT	GCA
						150								Ser	Thr	160									
	Ser	Gly	Val	Val	Val	Val	Ala	Ala	Ala	Gly	Asn	Glu	Gly	Thr	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Thr	Val	Gly	Tyr	Pro	Gly
849	TCC	GGC	GTC	GTA	GTC	GTT	GCG	GCA	GCC	GGT	AAC	GAA	GGC	ACT	TCC	GGC	AGC	TCA	AGC	ACA	GTG	GGC	TAC	CCT	GGT
	170										180										190				
	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	GTT	GAC	AGC	AGC	AAC	CAA	AGA	GCA	TCT	TTC	TCA	AGC	GTA	GGA	CCT
						200										210									
	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	ACG	CTT	CCT	GGA	AAC	AAA	TAC	GGG	GCG	TAC	AAC	GGT
	220										230										240				
	Thr	Ser	Met	Ala	Ser	Pro	His	Val	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Leu	Ile	Leu	Ser	Lys	His	Pro	Asn	Trp	Thr	Asn	Thr
1074	ACG	TCA	ATG	GCA	TCT	CCG	CAC	GTT	GCC	GGA	GCG	GCT	GCT	TTG	ATT	CTT	TCT	AAG	CAC	CCG	AAC	TGG	ACA	AAC	ACT

FIG._1B-2

```
                                 250 Gln                                                 260
     Gln  Val  Arg  Ser  Ser  Leu  Glu  Asn  Thr  Thr  Thr  Lys  Leu  Gly  Asp  Ser  Phe  Tyr  Tyr  Gly  Lys  Gly  Leu  Ile  Asn
1149 CAA  GTC  CGC  AGC  AGT  TTA  GAA  AAC  ACC  ACT  ACA  AAA  CTT  GGT  GAT  TCT  TTC  TAC  TAT  GGA  AAA  GGG  CTG  ATC  AAC

     270                      275
     Val  Gln  Ala  Ala  Ala  Gln  OC                    TERM
1224 GTA  CAG  GCG  GCA  GCT  CAG  TAA  AACATAAAAAACCGGCCTTGGCCCCGCCGGTTTTTATTTTTCTTCCTCCGCATGTTCAATCCGCTCC

1316 ATAATCGACGGATGGCTCCCTCTGAAAATTTTAACGAGAAACGGCGGGTTGACCCGGCTCAGTCCCGTAACGGCCAAGTCCTGAAACGTCTCAATCGCCG

1416 CTTCCCGGTTTCCGGTCAGCTCAATGCCGTAACGGTCGGCGGCGTTTTCCTGATACCGGGAGACGGCATTCGTAATCGGATC
```

FIG._1B-3

FIG._1B



RESIDUOS CONSERVADOS EN SUBSTILISINAS 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 F 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

COMPARACIÓN DE SECUENCIAS DE SUBTILISINA DE:

```
B.amyloliquefaciens
B.subtilis
B.licheniformis
B.lentus

01                  10                  20                  30
A Q S V P Y G V S Q I K A P A L H S Q G Y T G S N V K V A V I D S G I D S S H P
A Q S V P Y G I S Q I K A P A L H S Q G Y T G S N V K V A V I D S G I D S S H P
A Q T V P Y G I P L I K A D K V Q A Q G F K G A N V K V A V L D T G I Q A S H P
A Q S V P W G I S R V Q A P A A H N R G L T G S G V K V A V L D T G I S T * H P

41                  50                  60                  70
D L K V A G G A S M V P S E T N P F Q D N N S H G T H V A G T V A A L N N S I G
D L N V R G G A S F V P S E T N P Y Q D G S S H G T H V A G T I A A L N N S I G
D L N V V G G A S F V A G E A Y N * T D G N G H G T H V A G T V A A L D N T T G
D L N I R G G A S F V P G E * P S T Q D G N G H G T H V A G T I A A L N N S I G

81                  90                  100                 110
V L G V A P S A S L Y A V K V L G A D G S G Q Y S W I I N G I E W A I A N N M D
V L G V S P S A S L Y A V K V L D S T G S G Q Y S W I I N G I E W A I S N N M D
V L G V A P S V S L Y A V K V L N S S G S G S Y S G I V S G I E W A T T N G M D
V L G V A P S A E L Y A V K V L G A S G S G S V S S I A Q G L E W A G N N G M H

121                 130                 140                 150
V I N M S L G G P S G S A A L K A A V D K A V A S G V V V V A A A G N E G T S G
V I N M S L G G P T G S T A L K T V V D K A V S S G I V V A A A A G N E G S S G
V I N M S L G G A S G S T A M K Q A V D N A Y A R G V V V V A A A G N S G N S G
V A N L S L G S P S P S A T L E Q A V N S A T S R G V L V V A A S G N S G A G S
```

FIG._3A

```
161                 170                 180                 190
S S S T V G Y P G K Y P S V I A V G A V D S S N Q R A S F S S V G P E L D V M A
S T S T V G Y P A K Y P S T I A V G A V N S S N Q R A S F S S A G S E L D V M A
S T N T I G Y P A K Y D S V I A V G A V D S N S N R A S F S S V G A E L E V M A
* * * * I S Y P A R Y A N A M A V G A T D Q N N N R A S F S Q Y G A G L D I V A

201                 210                 220                 230
P G V S I Q S T L P G N K Y G A Y N G T S M A S P H V A G A A A L I L S K H P N
P G V S I Q S T L P G G T Y G A Y N G T S M A T P H V A G A A A L I L S K H P T
P G A G V Y S T Y P T N T Y A T L N G T S M A S P H V A G A A A L I L S K H P N
P G V N V Q S T Y P G S T Y A S L N G T S M A T P H V A G A A A L V K Q K N P S

241                 250                 260                 270
W T N T Q V R S S L E N T T T K L G D S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q
W T N A Q V R D R L E S T A T Y L G N S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q
L S A S Q V R N R L S S T A T Y L G S S F Y Y G K G L I N V E A A A Q
W S N V Q I R N H L K N T A T S L G S T N L Y G S G L V N A E A A T R
```

FIG._3B

FIG._3