

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 539**

51 Int. Cl.:
C12N 9/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02796618 .3**
96 Fecha de presentación: **12.12.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1456368**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.09.2004**

54 Título: **Nueva proteasa alcalina de Bacillus SP.(DSM 14392) y detergentes o agentes limpiadores que contienen esta nueva proteasa alcalina**

30 Prioridad:
22.12.2001 DE 10163884

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.05.2012

73 Titular/es:
**HENKEL AG & CO. KGAA
HENKELSTRASSE 67
40589 DÜSSELDORF, DE**

72 Inventor/es:
**WEBER, Angrit;
HELLEBRANDT, Angela;
SCHMITZ, Susanne;
MAURER, Karl-Heinz y
KOTTWITZ, Beatrix**

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

ES 2 381 539 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

Nueva proteasa alcalina de *Bacillus* SP.(DSM 14392) y detergentes o agentes limpiadores que contienen esta nueva proteasa alcalina

La presente invención se refiere a una nueva proteasa alcalina del tipo de la subtilisina de *Bacillus* sp. (DSM 14392) así como a las proteínas suficientemente afines y a sus derivados. Además hace referencia a los detergentes y agentes limpiadores con esta nueva proteasa alcalina del tipo de la Subtilisina, a las proteínas suficientemente afines y a sus derivados, al método correspondiente de lavado y limpieza y a su utilización en los productos de lavado y detergentes así como a otras posibilidades técnicas de empleo.

Las proteasas del tipo de la subtilisina (Subtilasas, subtilopeptidasas, EC 3.4.21.62), en particular las subtilisinas se atribuyen a serina-proteasas debido a la acción catalítica de los aminoácidos. Se han configurado de forma natural a partir de microorganismos, en particular de la especie *Bacillus*. Actúan como endopeptidasas poco específicas, es decir que hidrolizan cualquier enlace de amida ácida que se encuentra en el interior de péptidos o proteínas. Su pH óptimo se sitúa preferiblemente en una región claramente alcalina. El artículo "Subtilases: Subtilisin-like Proteases" de R. Siezen, páginas 75-95 en "Subtilisin enzymes", publicado por R. Bott y C. Betzel, New York 1996 da una ojeada sobre esta familia. Las subtilisinas son adecuadas en una multitud de posibilidades técnicas de aplicación, como componentes de cosméticos y en particular como sustancias activas de detergentes y productos de lavado.

Las enzimas son las sustancias activas de los detergentes y productos de lavado. Las proteasas actúan en el producto o materia de limpieza destruyendo impurezas que contienen proteínas, como por ejemplo en los tejidos o bien superficies duras. En el mejor de los casos se obtienen efectos de sinergia entre las enzimas y los componentes restantes del medio afectado. Por ejemplo, esto queda plasmado en la patente americana 6008178. Entre las proteasas para detergentes las subtilisinas ocupan un lugar preferente por sus propiedades enzimáticas como la estabilidad y el pH óptimo.

De la solicitud de patente internacional WO 9307276 procede, por ejemplo, una proteasa alcalina del tipo elastasa-Yab y su posibilidad de aplicación en los detergentes o productos de limpieza. En la publicación de Kaneko y cols (J. of Bacteriology, Bd. 171, Nr. 9, 1989, páginas 5232-5236) se ha descrito la clonación de la elastasa, el péptido precursor Ya-B de un género *Bacillus*.

Además en la publicación de Masui y cols (J. of Fermentation and Bioengineering, Bd. 85, Nr. 1, 1998, páginas 30-36) se describe la clonación de la serina-proteasa AprN alcalina y al mismo tiempo se publica una comparación de secuencias con otras subtilisinas y serina-proteasas.

Además en la solicitud de patente alemana DE 4411223 se informa sobre el uso de las proteasas de la familia de la subtilisina/elastasa en el procedimiento de lavado o limpieza.

El desarrollo de proteasas en detergentes se basa en las enzimas formadas de forma natural, preferiblemente microbiana. Dichas enzimas se optimizan por medio de un procedimiento conocido de mutagenia, por ejemplo, la mutagenia puntual, la eliminación, inserción o fusión con otras proteínas o partes de proteínas o bien por las diversas modificaciones para su empleo en medios de lavado o detergentes. Los distintos sectores de aplicación técnica requieren proteasas con distintas características, como por ejemplo, en lo referente a las condiciones de reacción, la estabilidad o la especificidad del sustrato. Las posibilidades técnicas de aplicación de las proteasas dependen de otros factores como la estabilidad del enzima a elevadas temperaturas, ante agentes oxidantes, su desnaturalización a causa de los tensoactivos, de los efectos de plegamiento o de sinergias inesperadas con otras sustancias.

Por lo tanto existe una gran necesidad de proteasas que se emplearán en el sector técnico y que debido a la gran diversidad de campos de aplicación deberán tener un espectro amplio de propiedades.

La base de ello se amplía con las nuevas proteasas que se pueden seguir desarrollando para sectores de aplicación muy especializados.

La presente invención tenía el cometido de hallar una proteasa todavía desconocida. La enzima natural o de referencia se debía caracterizar principalmente porque en su empleo en el medio correspondiente debía aproximarse al menos a las enzimas establecidas con esta finalidad. Interesaba una contribución importante en el sector de los detergentes.

Otros cometidos consistían en que debía disponer de ácidos nucleicos que se pudieran codificar para este tipo de proteasas, y disponer también de vectores, células huésped y un método de fabricación que pudieran ser útiles para la obtención de este tipo de proteasas. Además se debía disponer de los correspondientes medios de limpieza, detergentes, y de los métodos de limpieza pertinentes así como de las posibilidades de aplicación para este tipo de proteasas. Finalmente se tenían que definir las posibilidades técnicas de aplicación para las proteasas halladas.

La resolución del cometido consiste en las proteasas alcalinas del tipo subtilisina, tal como se definen en las reivindi-

caciones.

Otras soluciones del cometido, o bien soluciones de los cometidos parciales y por tanto objetivos propios de la invención son los ácidos nucleicos, cuyas secuencias son idénticas a la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO.1 o bien codifican para las proteasas conforme a la invención, en los correspondientes vectores, células huésped y métodos de fabricación. Además se dispone de los medios correspondientes, de los detergentes, de los procedimientos de lavado correspondientes así como de las correspondientes posibilidades de aplicación para este tipo de proteasas. Finalmente se definen las posibilidades técnicas de aplicación para las proteasas halladas.

Por una proteína se entiende en el sentido de la presente invención un polímero que adquiere una estructura principalmente tridimensional para ejercer su función, configurado linealmente, compuesto de aminoácidos naturales. En la presente invención se identifican los 19 L-aminoácidos de origen natural, proteínógenos con el código de 1 y 3 letras convencional internacional. La combinación de una de estas denominaciones con un número equivaldrá a una proteína correspondiente, cuyo radical aminoácido estará en la correspondiente posición. Para las mutaciones puntuales se establecen identificaciones análogas. Los datos sobre la posición se refieren, mientras no se indique lo contrario, a las formas maduras respectivas de las correspondientes proteínas, es decir sin los péptidos señalizadores (ver a continuación).

Por una enzima se entiende en el sentido de la presente invención una proteína que ejerce una determinada función bioquímica. Por ejemplo, por enzimas proteolíticas o enzimas con una función proteolítica se entiende en general aquellas enzimas que hidrolizan los enlaces amida de los ácidos de las proteínas, en particular aquellos que se encuentran en el interior de las proteínas y por eso se conocen también como endopeptidasas. Las subtilisina-proteasas son aquellas endopeptidasas que de forma natural están formadas por bacterias gram-positivas y básicamente son segregadas o bien derivan de éstas por métodos biológico-moleculares, y se pueden homologar por trozos, como regiones que tienen una función o forman una estructura con las subtilisina-proteasas naturales. Se conocen como subtilasas. Estas se han mostrado en el artículo "Subtilasas: Subtilisin-like Proteases" de R. Siezen, páginas 75-95 en "Subtilisin enzymes", publicado por R. Bott y C. Betzel, New York 1996. Numerosas proteínas se han formado como las llamadas preproteínas, es decir junto con un péptido señalizador. Se entiende con ello la parte N-terminal de la proteína, cuya función consiste principalmente en la extrusión de la proteína formada de la célula productora en el periplasma o bien en el medio que la rodea y/o garantizar su correcto plegamiento. Seguidamente el péptido señalizador se desprende en condiciones naturales de la proteína restante, de manera que ésta ejerce su propia actividad catalítica sin los aminoácidos N-terminales inicialmente existentes.

Para las aplicaciones técnicas se prefieren los péptidos maduros por su actividad enzimática, es decir las enzimas procesadas tras su fabricación frente a las preproteínas.

Las pro-proteínas son etapas previas inactivas de las proteínas. Sus precursores con secuencia señalizadora se conocen como preproteínas.

Por ácidos nucleicos se entiende en el sentido de la presente invención las moléculas que sirven de soportes de información, construidas a partir de nucleótidos de forma natural, que codifican para la secuencia lineal de aminoácidos en las proteínas o enzimas. Pueden presentarse como una rama única, como una rama complementaria a esta rama única o como una rama doble. Como soporte de información duradero natural se prefiere el ácido nucleico ADN para trabajos de biología molecular. Por el contrario para llevar a cabo la invención en un entorno natural, como por ejemplo en una célula manifestada o expresada, se forma un ARN, por lo que las moléculas de ARN esenciales de la invención equivalen asimismo a formas de ejecución de la presente invención. De ellas se pueden derivar, por ejemplo, moléculas de (c-)ADN a través de una transcripción invertida.

La unidad de información de un ácido nucleico correspondiente a una proteína se conoce también en el sentido de la presente invención como Gen. En el caso del ADN se tienen que tener en cuenta las secuencias de ambas ramas complementarias en todos los tres posibles esquemas de lectura. Además hay que tener en cuenta que se pueden codificar diferentes codones para los mismos aminoácidos, de manera que se puede derivar una secuencia determinada de aminoácidos de varias secuencias de nucleótidos distintos y a ser posible que presenten una mínima identidad (degeneración del código genético). Además los distintos organismos presentan diferencias en el uso de este codón. Por estos motivos tanto las secuencias de aminoácidos como también las secuencias de nucleótidos deben incluirse en la consideración del ámbito de protección y las secuencias de nucleótidos indicadas deben ser vistas únicamente como una codificación ejemplar para una determinada secuencia de aminoácidos.

Un experto puede en la actualidad, con ayuda de los métodos conocidos como, por ejemplo, la síntesis química o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) junto con métodos estándar de biología molecular y de química proteica, fabricar genes completos con ayuda de secuencias de aminoácidos y/o de ADN conocidas. Este tipo de métodos se conocen, por ejemplo, "del "Lexikon der Biochemie", Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, 1999, Band 1, S. 267-271 y Band 2, S. 227-229. Esto es posible cuando se puede recurrir a un género que se encuentra en una colección de géneros. Por ejemplo, con los iniciadores o cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), que son sintetizables con ayuda de una secuencia conocida, y/o por medio de moléculas aisladas de mRNA se pueden sintetizar, clonar y si se desea manipular de nuevo, por ejemplo someter a una mutagenia los correspondientes genes de

dichas especies o géneros,

Los cambios en la secuencia de nucleótidos, como por ejemplo los que puedan ser originados por métodos conocidos de biología molecular, se definen como mutaciones. Según el tipo de modificación se habla de mutaciones por eliminación, por inserción o por sustitución o bien aquellas, en las cuales se fusionan (suffling) genes distintos o partes de genes; se trata de mutaciones genéticas. Los organismos correspondientes se conocen como mutantes. Las proteínas derivadas de los ácidos nucleicos mutantes se conocen como variantes. Así, por ejemplo, las mutaciones por eliminación, inserción, sustitución o las fusiones conducen a genes de fusión, genes mutados por sustitución, por inserción o por eliminación y a nivel proteico a las correspondientes variantes por eliminación, inserción o sustitución o bien proteínas de fusión.

Por vectores se entiende en el sentido de la presente invención aquellos elementos que constan de ácidos nucleicos, que contienen un gen de interés como región de ácido nucleico identificativa. Pueden o son capaces de establecer o colocar a éste en una especie o en una estirpe celular sobre varias generaciones o divisiones celulares como elemento genético estable, que se replica independientemente del genoma restante. Los vectores son plásmidas especiales en la aplicación en bacterias, es decir, elementos genéticos circulares. En la técnica genética se distingue por un lado entre aquellos vectores que sirven para el almacenamiento y por tanto en cierto modo para el trabajo técnico del gen, los llamados vectores de clonación, y por otro lado, aquellos que cumplen la función de manipular el gen objeto de interés en la célula huésped, es decir, facilitar la expresión de la proteína correspondiente. Estos vectores se conocen como vectores de expresión.

Tanto las células de las bacterias como las células eucarióticas, que contienen los mencionados vectores, se conocen en general como células, independientemente de sus diferencias. Dichas células que contienen un vector, en particular un vector de expresión y por tanto pueden ser excitadas para la expresión de un transgén, se conocen como células huésped, pues albergan el sistema genético correspondiente.

La homologización es la comparación de una secuencia de ácido nucleico o de aminoácido con la de los genes o proteínas conocidas. Por ejemplo se lleva a cabo por medio de una alineación. La medida para la homología es un porcentaje de identidad, como el que puede determinarse según el método indicado por D.J. Lipman y W.R. Pearson en Science 227(1985), S. 1435-1441. Esta indicación puede hacer referencia a toda la proteína o a una zona determinada aludida. Otro concepto de homología, la similitud, abarca también variaciones conservadas, es decir aminoácidos con actividad química similar, puesto que ejercen estas actividades químicas prácticamente similares dentro de la proteína. En el caso de ácidos nucleicos se conoce únicamente el porcentaje de identidad.

Mediante la homologización se pueden argumentar las funciones de cada una de las zonas de secuencias, de las secuencias de aminoácidos o nucleótidos, así como la actividad enzimática de la enzima considerada. Las zonas o regiones homológicas de distintas proteínas son aquellas con funciones comparables, que se pueden reconocer por la identidad o por los intercambios conservados en la secuencia primaria de aminoácidos. Incluyen aminoácidos aislados, las regiones más pequeñas, las llamadas secuencias, los pocos aminoácidos que son largos, hasta las zonas demasiado largas en la secuencia primaria de aminoácidos. Por funciones de las zonas homológicas se entienden por tanto también las funciones parciales más pequeñas de la función ejercida por toda la proteína, como por ejemplo la formación de cada uno de los enlaces tipo puentes de hidrógeno para acomplejar un sustrato o un complejo de transición. Otras regiones de la proteína, que no toman parte en la propia reacción enzimática, pueden ser modificadas cualitativa o cuantitativamente. Nos referimos, por ejemplo, a la estabilidad de los enzimas, la actividad, las condiciones de reacción o bien la especificidad del sustrato.

Bajo el concepto de una enzima proteolítica o de una proteasa se entiende por consiguiente además de las funciones de unos pocos radicales aminoácidos del centro catalíticamente activo todas las funciones como las que se obtienen por la acción del conjunto de proteínas restantes o de una parte o varias partes del resto de proteínas sobre las zonas catalíticamente activas. Incluso solas dichas funciones modificadoras o bien actividades parciales se considerarán como una actividad proteolítica en el sentido de la invención siempre que apoyen una reacción de proteólisis. A dichas funciones auxiliares o actividades parciales pertenecen, por ejemplo, la formación de un sustrato, de un producto final o intermedio, la activación o bien la inhibición o transmisión de un efecto regulador sobre la actividad hidrolítica. Por ejemplo, puede tratarse de la formación de un elemento estructural, que se encuentre lejos del centro activo. La segunda condición para que se trate de una proteína proteolítica conforme a la invención es que a través del procedimiento químico de los radicales activos solamente o bien por la acción de las partes modificantes se obtenga una hidrólisis de los enlaces peptídicos. Además es posible que también las actividades de otras proteasas se modifiquen cualitativa o cuantitativamente por una o varias partes, por ejemplo de la proteína conforme a la invención. Esta influencia de otros factores se considera asimismo actividad proteolítica. Las enzimas proteolíticamente activas son también aquellas proteasas, cuya actividad en un momento determinado, se queda bloqueada por la acción de un inhibidor. Resulta decisiva su capacidad o idoneidad inicial hacia la reacción de proteólisis correspondiente.

Por Fragmentos se entienden todas las proteínas o péptidos que son más pequeños que las proteínas naturales o bien aquellas que corresponden a genes completamente trasladables, y por ejemplo se pueden obtener también por vía sintética. Debido a sus secuencias de aminoácidos se pueden atribuir a las correspondientes proteínas comple-

tas. Por ejemplo, pueden tomar estructuras similares o ejercer actividades proteolíticas o actividades parciales. Los fragmentos y las variantes de eliminación de las proteínas de partida son en principio del mismo tipo; mientras que los fragmentos equivalen a pedazos más bien pequeños, a las mutantes de eliminación les faltan solamente unas zonas cortas, y por tanto algunas funciones parciales.

Por proteínas quiméricas o híbridas se entiende en el sentido de la presente invención aquellas proteínas que están compuestas de elementos que de forma natural proceden de distintas cadenas polipeptídicas del mismo organismo o de distintos organismos. Esta forma de actuar se conoce también como Shuffling o mutagénesis de fusión. El sentido de dicha fusión reside, por ejemplo, en el hecho de que con ayuda de una parte proteica conforme a la invención fusionada, se origina o bien modifica una función enzimática.

Por las proteínas que se obtienen por la mutación por inserción se entienden aquellas variantes que se obtienen mediante métodos conocidos por la adición de un fragmento de ácido nucleico o de proteína a la secuencia de partida. Se adjudican a su homogeneidad principal debido a las proteínas quiméricas. Se diferencian de éstas únicamente en la relación de tamaños de la parte de la proteína no alterada con respecto al tamaño de la proteína en su totalidad. En las proteínas mutadas por inserción la parte o proporción de proteína extraña es inferior a la de las proteínas quiméricas.

Mutagénesis por inversión, es decir una inversión parcial de la secuencia y se puede considerar como una forma especial equivalente a la anulación o a la inserción. Del mismo modo existe para una agrupación nueva de trozos de molécula distintos que difiere de la secuencia de aminoácidos original. Se puede considerar tanto como una variante de la anulación, como variante de la inserción, así como también variante Shuffling de la proteína original.

Por derivados en el sentido de la presente invención se entienden aquellas proteínas, cuya cadena de aminoácidos pura ha sido modificada químicamente. Dichas derivatizaciones se pueden efectuar, por ejemplo, biológicamente en relación con la biosíntesis proteínica a través del organismo huésped. Para ello se pueden emplear métodos biológico-moleculares, como la cotransformación con genes, que se ocupan de la modificación correspondiente. Sin embargo, las derivatizaciones pueden llevarse a cabo también de forma química, es decir a través de la reacción química de una cadena lateral de un aminoácido o bien por el enlace covalente de otro compuesto a la proteína. En el caso de dicho compuesto, se podrá tratar de otra proteína que por ejemplo se una a la proteína conforme a la invención a través de combinaciones químicas bifuncionales. Este tipo de modificaciones incluyen en la especificidad del sustrato o en la fuerza de enlace al sustrato o conducen a un bloqueo temporal de la actividad enzimática si se trata de un inhibidor de la sustancia acoplada. Esto es significativo e importante para el periodo de almacenamiento. Asimismo se entiende por derivatización el enlace covalente a un soporte macromolecular.

En el sentido de la presente invención se reúnen bajo el concepto genérico de proteínas todas las enzimas, fragmentos, proteínas de fusión y derivados, siempre que no sea preciso mencionarlos de forma explícita de otro modo.

Por la potencia o eficiencia de una enzima se entiende su actividad en el sector técnico considerado, preferiblemente en un ámbito de un medio dispuesto de la forma correspondiente. Esta se basa en la propia actividad enzimática, pero depende además de otros factores relevantes para el proceso correspondiente. Por ejemplo, podemos hablar de estabilidad, unión al sustrato, interacción con el material que soporta el sustrato o interacciones con unas sustancia, en particular sinergias.

Por la potencia de lavado o la potencia de limpieza de un detergente o producto para el lavado se entiende en el sentido de la presente invención aquel efecto, ejercido por el medio correspondiente sobre el artículo sucio, es decir, el tejido o el objeto con superficie dura. Cada uno de los componentes de dicho medio, por ejemplo cada una de las enzimas se evaluarán en lo que se refiere a su contribución en la potencia de limpieza o lavado del detergente o producto de lavado. Pues de las propiedades enzimáticas de una enzima se puede deducir sin más su contribución a la potencia de lavado de un medio. Aquí tienen un papel importante en la eliminación de las impurezas otros factores como la estabilidad, la unión al sustrato, el enlace al producto de limpieza o las interacciones con otras sustancias del detergente, en particular las sinergias.

Las proteasas alcalinas creadas de forma natural basadas en la presente invención y del tipo subtilisina, tal como se puede deducir con ayuda de los ejemplos, se obtienen del residuo del cultivo de la *Bacillus sp* (DSM 14392).

Esta especie, de acuerdo con el tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional de la Deposición o consignación de microorganismos del 28 de abril de 1977, fue depositada el 1.3.2001 en el Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig (<http://www.dsmz.de>). Tiene un número de entrada DSM 14392 y de identificación ID 01-193. Los datos principales sobre las propiedades de este material biológico, tal como se establecieron el 23.4.2001 por DSMZ, se recogen en la tabla 1 (ejemplo 1).

La presente solicitud de patente ha seguido la estrategia de buscar un microorganismo formado por una proteasa de un hábitat natural y por tanto una enzima formada de forma natural, que cumpla totalmente a ser posible los requisitos establecidos.

Dicha enzima se podría hallar con la proteasa alcalina de *Bacillus sp* (DSM 14392) tal como se describe en los ejemplos de la presente invención.

Esta especie segrega una actividad proteolítica tal como se ha constatado en la tabla 1 del ejemplo 1. Se ha investigado conforme a los ejemplos de la presente invención y se descrito del modo siguiente: Se trata de una proteína 26 kD según la electroforesis en poliacrilamida SDS, con un punto isoeléctrico determinado de 11 conforme al enfoque isoeléctrico. La actividad específica para el sustrato AAPF es de 9 U/mg.

La secuencia de nucleótidos de la nueva proteasa alcalina conforme a la invención de *Bacillus sp.*(DSM 14392) se indica en el protocolo de la secuencia de la presente invención bajo el código de SEQ ID NO.1. Comprende 1125 bp. La secuencia de aminoácidos derivada de la misma se indica en la SEQ ID NO.2. Comprende 374 aminoácidos, seguidos de un codón de terminación. De estos los primeros 105 aminoácidos probablemente no están contenidos en la proteína madura, de manera que para la proteína madura probablemente se obtiene una longitud de 269 aminoácidos.

Tal como se ha descrito en el ejemplo 2, se han comparado estas secuencias con las secuencias de proteasas que se obtienen de los bancos de datos accesibles en general Swiss-Prot (Geneva Bioinformatics (GeneBio) S.A., Genf, Schweiz; <http://www.genebio.com/sprot.html>) y GenBank (National Center for Biotechnology Information NCBI, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)

Además se han identificado como más parecidos a nivel de ADN los tres genes siguientes para todo el gen: (1) la elastasa alcalina de *Bacillus Ya-B*(ID ELYA_BACSP) con una identidad aproximada del 98%, (2) la subtilisina P92 de *Bacillus alkalophilus*(ID ELYA_BACAO) con una identidad del 80% y (3), la subtilisina Sendai de *Bacillus sendai* (ID Q45522) con una identidad del 69%.

A nivel de aminoácidos para toda la preproteína se han identificado como más parecidos: (1) la elastasa alcalina de *Bacillus Ya-B*(ID ELYA_BACSP) con una identidad aproximada del 98%, (2) la subtilisina P92 de *Bacillus alkalophilus*(ID ELYA_BACAO) con una identidad del 69% y (3), la subtilisina Sendai de *Bacillus sendai* (ID Q45522) con una identidad del 66%.

A nivel de aminoácidos para la proteína madura se han identificado como más parecidos: (1) la elastasa alcalina de *Bacillus Ya-B*(ID ELYA_BACSP) con una identidad aproximada del 99%, es decir con únicamente tres aminoácidos distintos en el sector codificado, (2) ambas subtilisinas, la P92 de *Bacillus alkalophilus*(ID ELYA_BACAO) y la subtilisina 308 (Savinasa) de *Bacillus lentus* (ID SUBS_BACLE) con una identidad correspondiente del 83% y (3), la proteasa alcalina de *Bacillus lentus* DSM 5483 (ID SUBB_BACLE) con una identidad del 82%.

Otras enzimas similares se reúnen en la tabla 2 en el ejemplo 2 y se comparan en la alineación de la figura 1 con respecto a las secuencias de aminoácidos de proteínas maduras con la proteasa alcalina de *Bacillus sp.*(DSM 14392).

Debido a las claras coincidencias y al parentesco con las otras subtilisinas indicadas la proteasa alcalina se ha considerado como una subtilisina.

Un objetivo de la presente invención es por tanto que cada proteasa alcalina del tipo de la subtilisina con una secuencia de aminoácidos, sea idéntica a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO.2.

Tal como ya se ha mencionado, debido a una comparación de las secuencias N-terminales es probable que los aminoácidos 1 hasta 105 se consideren péptidos líderes y la proteína madura abarque probablemente desde las posiciones 106 hasta la 374 conforme a la SEQ ID NO.2. La posición 375 pasa a ser un codón de terminación, lo que no equivale a un aminoácido. Pero puesto que la información sobre la terminación de una región codificada puede ser considerada como componente importante de una secuencia de aminoácidos, se incluirá esta posición conforme a la invención en la región que corresponda a la proteína madura.

Una forma de ejecución de este objeto de la invención es por tanto cada proteasa alcalina del tipo de la subtilisina con una secuencia de aminoácidos, que es idéntica a la secuencia de aminoácidos que aparece en SEQ ID NO.2 en las posiciones 106 a 374.

Por ejemplo, a través de una secuenciación N-terminal de la proteína proteolítica liberada in vivo por el *Bacillus sp.*(DSM 14392), se podría constatar que el lugar de la escisión no se encuentra entre el aminoácido 105 y el 106 según la SEQ ID NO.2 sino que en otro lugar, por lo que estos datos hacen referencia a la verdadera proteína madura.

Una forma de ejecución de este objeto de la invención es cada proteasa alcalina del tipo subtilisina, que procede de una secuencia de nucleótidos, que es idéntica a la secuencia de nucleótidos indicada en la SEQ ID NO 1, en particular por la región parcial que ocupa las posiciones 106 hasta 374 conforme a la SEQ ID NO.2.

También aquí, como para todas las formas de ejecución siguientes resulta válido que estas indicaciones se refieran a la proteína realmente madura, en el caso de que se tuviera que constatar que el lugar de división de la proteína se encuentra en otro lugar distinto del anteriormente indicado.

Esta es una proteasa todavía no conocida en la tecnología actual. Es aislable, sintetizable y utilizable tal como se indica en los ejemplos. Se caracteriza tal como se ha documentado en los ejemplos, porque en su utilización en un medio determinado se aproxima o bien excede parcialmente el rendimiento de los enzimas establecidos con esta finalidad.

Para el desarrollo de proteasas aplicables en particular en detergentes esta proteasa puede servir como un enzima formado de forma natural, microbiano, que actúa como punto de partida para que se optimice sobre el mismo el conocido procedimiento de mutagénesis, por ejemplo, la mutagénesis puntual, fragmentación, delección, inserción o fusión con otras proteínas o partes de proteínas o bien sobre modificaciones del mismo para la aplicación deseada. Este tipo de optimizaciones puede consistir en adaptaciones a los cambios de temperatura, oscilaciones del valor del pH, condiciones redox y/o otras influencias, que son relevantes para los sectores técnicos de aplicación. Se desean, por ejemplo, una mejoría de la resistencia a la oxidación, de la estabilidad frente a los agentes desnaturizantes o de disgregación proteolítica, frente a las altas temperaturas, las condiciones ácidas o fuertemente alcalinas, una alteración de la sensibilidad frente a iones de calcio u otros cofactores, una disminución de la inmunogenicidad o del efecto alergénico.

Para ello se pueden modificar las cargas superficiales o los Loops que intervienen en la catálisis o en las uniones de sustratos, al aplicar la teoría de la WO 00/36069 mediante las mutaciones puntuales definidas. Finalmente se ha publicado por ejemplo en las WO 95/30011, WO 99/27082, WO 00/37599, WO 00/37621 hasta WO 00/37627 y WO 00/71683 hasta WO 00/71691. Otras modificaciones introducidas en particular a través de métodos genotécnicos son aplicables por ejemplo al emplear las teorías de las patentes WO 92/21760 y WO 95/23221. Un punto de partida es la alineación representada en la figura 1 de la presente patente. Esta facilita que se deriven de las enzimas conocidas interesantes posiciones para la proteasa de *Bacillus sp.* (DSM 14392) descritas en las mencionadas patentes, y que puedan variar según los métodos conocidos.

Los métodos de mutagénesis se basan en la correspondiente secuencia de nucleótidos, que se indica en la SEQ ID NO.1, que se representa a continuación como el objeto propio de la invención. Los métodos biológicos moleculares correspondientes se han descrito en la actualidad como por ejemplo en los manuales siguientes: Manual de Frisch, Sambrook y Maniatis "Molecular cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989.

En las configuraciones especialmente preferidas las mutagénesis puntuales conducen a mejoras en el rendimiento de determinadas proteasas, en particular para mejorar su contribución al rendimiento en el lavado de determinados medios. En los ejemplos de la presente invención se observa que la proteína conforme a la invención de *B. sp.* (DSM 14392) presenta mejores rendimientos que la enzima Savinasa y la proteasa alcalina *B. lentus*.

Tal como se puede deducir de la alineación de la figura 1, la proteasa de *B.sp.* (DSM 14392) se diferencia de la elastasa alcalina de *Bacillus Ya-B*, que no se ha descrito todavía para su empleo en medios de lavado y detergentes, en tres posiciones: en la posición 1 (conforme al recuento de aminoácidos de la proteasa conforme a la invención, como en SEQ ID NO.1) tiene una M; en la posición 65 una H en lugar de una Q; y en la posición 182 una S en lugar de una T.

Otras configuraciones de la presente invención son todas proteínas derivadas de una de las anteriormente descritas proteasas alcalinas conforme a la invención del tipo de la subtilisina por fragmentación o mutagénesis de delección o bien fragmentos con preferiblemente al menos 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 343, 350 y 360 aminoácidos que cuelgan de la molécula de partida.

De la alineación de la figura 1 se deduce que la secuencia de aminoácidos de la proteasa madura de *B.sp.* (DSM 14392) de las posiciones 2 hasta 66, 68 hasta 187 y 189 hasta 275 es idéntica a la de la elastasa alcalina de *Bacillus Ya-B*. Las proteínas o fragmentos derivados por fragmentación o mutagénesis de delección poseen consecuentemente regiones más grandes no idénticas a proteasa conocidas, que presentan los aminoácidos adecuados para la diferenciación M, H y/o S en las posiciones 1, 65 o 182, tras el recuento de la secuencia de aminoácidos en SEQ ID NO.1. Para ello deben tener como mínimo 40 aminoácidos tal como se deduce de la comparación con la Subtilisina P92 de *B.alaklophilus* (ELYA_BACAO). Pues esta proteasa que también presenta una S en la posición 188 en el recuento de la alineación, es idéntica en esta región en un total de 36 posiciones a la proteasa *B.sp.* (DSM 14392).

En los fragmentos y/o variantes de delección mencionados se trata preferiblemente de awwllos que corresponde a la región de aminoácidos 106 hasta 375 conforme a la SEQ ID.2, es decir a la proteína madura.

Por fragmentos conforme a la invención se entienden todas las proteínas o péptidos que son más pequeños que aquellas proteínas, que corresponden a la SEQ ID NO.2, pero coinciden con ellas en las correspondientes secuencias parciales. Dichos fragmentos se pueden fabricar de forma más económica, ya que no poseen determinadas características de la molécula de partida, como probablemente un mecanismo de regulación que reduce la actividad, o bien un perfil de actividad más adecuado. Este tipo de fragmentos se puede fabricar de forma no bio-sintética sino de forma química, por ejemplo, La síntesis química es preferible pues toda síntesis implica modificaciones químicas.

La mutagénesis de delección es especialmente importante para la eliminación de las zonas inhibitoras. Simultánea-

mente a la delección ocurre una especialización así como una ampliación del campo de aplicación de la proteína.

Como fragmentos que se forman de manera natural, o bien proteínas mutadas por delección se contemplan también las proteínas y los péptidos señal que se obtienen por descomposición de aminoácidos N-terminales. Dicho mecanismo de descomposición se puede emplear por ejemplo para predeterminar lugares específicos de descomposición en proteínas recombinantes con ayuda de regiones definidas de la secuencia que se reconocen por peptidasas señal. Se puede realizar la activación y/o desactivación in vitro de las proteínas conforme a la invención.

Una forma de ejecución preferida corresponde a la de todas aquellas proteínas, fragmentos de proteínas o proteínas de fusión configuradas hasta el momento que se caracterizan por que además son derivatizadas.

Por derivados se entienden aquellas proteínas, que se derivan de las proteínas configuradas debido a una modificación adicional. Este tipo de modificaciones puede influir en la estabilidad, la especificidad del sustrato y la fuerza de enlace al sustrato o bien en la actividad enzimática. Pueden servir también para que se reduzca la alergenicidad y/o inmunogenicidad de la proteína y por tanto aumente su tolerancia cutánea.

Dichas derivatizaciones pueden llevarse a cabo de forma biológica, es decir en relación con la síntesis proteínica a través del organismo huésped productor. Aquí se destacan los acoplamientos de compuestos de bajo peso molecular como de lípidos o bien oligosacáridos.

Pero las derivatizaciones pueden llevarse a cabo químicamente, es decir a través de la reacción química de una cadena lateral o por el enlace covalente de otro compuesto macromolecular, a una proteína. Una modificación química es lo que se describe en la solicitud de patente DE 4013142. Por ejemplo, el acoplamiento de aminas a los grupos carboxilo de un enzima para alterar el punto isoelectrico procede de la WO 95/26398. Por ejemplo, pueden unirse macromoléculas como las proteínas, a través de compuestos químicos bifuncionales a las proteínas conforme a la invención. Así por ejemplo, es posible al utilizar la teoría de la WO 99/7154 hasta WO 99/57159, WO 00/18865 y WO 00/57155, contemplar una proteína conforme a la invención sobre un enlazador con un dominio de enlace específico. Dichos derivados se caracterizan en particular por el empleo en detergentes. Análogamente al WO 00/01831 se pueden enlazar inhibidores de proteasa a través del enlazador, en particular aminoácido-enlazador a las proteínas conforme a la invención. Los acoplamientos con compuestos macromoleculares como el polietilenglicol mejoran la molécula en lo referente a otras propiedades como la estabilidad o tolerancia cutánea. Se ha descrito una modificación, por ejemplo, en la patente US5230891 para proteasas y se empleo en cosmética.

Por derivados de proteínas conforme a la invención se puede entender en el sentido más amplio también preparaciones de estas enzimas. Según la obtención, elaboración o preparación una proteína puede mezclarse con otras sustancias diversa, por ejemplo, del cultivo de microorganismos productores. Una proteína también se puede haber mezclado con alguna finalidad, por ejemplo para incrementar su estabilidad de almacenamiento, con otras sustancias. Por lo tanto existen también preparados de una proteína conforme a la invención. Esto es independiente de que se desarrolle o no en una determinada preparación esta actividad enzimática. Ya que se puede desear que no exista apenas ninguna actividad en el almacenamiento, y solamente en el momento de la aplicación se desencadene su función proteolítica. Esto se puede controlar, por ejemplo, con algunas sustancias concomitantes, como la preparación conjunta de proteasas con inhibidores de proteasas (WO 00/01826).

Una configuración preferida equivale a todas aquellas proteínas, fragmentos de proteínas o proteínas de fusión que se caracterizan por que además se estabilizan.

Por lo que su estabilidad aumenta en el almacenamiento y/o durante su uso, por ejemplo en el proceso de lavado, de manera que su actividad se mantiene y se intensifica. La estabilidad de las proteasas conforme a la invención se puede incrementar por el acoplamiento a polímeros. Dicho método se ha descrito en US 5230891. Se requiere que las proteínas antes de su empleo se unan en el medio correspondiente por medio de una etapa de acoplamiento químico con los polímeros pertinentes.

Se prefieren estabilizaciones que son posibles propiamente por la mutagénesis puntual de la molécula. Pues estas no requieren ninguna otra etapa de trabajo en la obtención de la proteína. Se conocen algunas de las mutagénesis adecuadas en la tecnología actual. De acuerdo con la US 6087315 y la US6110884 se pueden estabilizar proteasas, donde se intercambian determinados radicales de tirosina por otros.

Otras posibilidades son por ejemplo:

- El intercambio de determinados radicales de aminoácidos por Prolina conforme a EP 583339;
- La introducción de grupos polares o cargados a la superficie de la molécula conforme a EP 995801;
- Cambio del enlace de iones metálicos, en particular de posiciones de enlace de calcio, por ejemplo conforme a la teoría de las patentes WO 88/08028 y WO 88/08033.

De acuerdo con el primero de estos escritos se deberían intercambiar uno o varios de los radicales de aminoácidos que toman parte en el enlace de calcio frente a aminoácidos con carga negativa; conforme a la teoría de la patente

WO 88/08033 se deberían introducir al mismo tiempo mutaciones puntuales en al menos una de las series de ambos radicales arginina/glicina para la estabilización por el enlace de calcio;

5 - Conforme a la patente US 5453372 se pueden proteger las proteínas mediante determinadas mutaciones en la superficie frente a la influencia de agentes desnaturalizantes como los tensoactivos.

Otras posibilidades comparativas se indican en las patentes US 5340735, US 5500364, US 5985639 y US 6136553.

10 Otra posibilidad para la estabilización frente a una temperatura elevada y frente a la acción de los tensoactivos sería si se aplica la teoría de la WO 92/21760 y la de las patentes todavía no publicadas DE 10121463 y DE 10153792, la estabilización por el intercambio de aminoácidos, que se encuentran próximos al término N, frente a aquellos que están en contacto por las interacciones no covalentes con el radical de la molécula y por tanto potencian el mantenimiento de la estructura globular.

15 Las formas preferidas son aquellas en las que la molécula es estabilizada de varias maneras. Por ejemplo, conforme a la WO 89/09819 de ello se puede deducir que diversas mutaciones estabilizantes actúan de forma aditiva.

20 En la configuración preferida todas las proteínas se caracterizan porque son de origen natural, en particular proceden de un microorganismo.

Puede tratarse de hongos o bacterias monocelulares. La mayoría se pueden obtener de forma simple y se manipulan como organismos pluricelulares o bien cultivos celulares derivados de muchas células; sin embargo, estas pueden equivaler a opciones útiles para formas de ejecución especiales y por tanto no se excluyen del objeto de la invención.

25 Es posible que los fabricantes puedan fabricar una enzima conforme a la invención, pero ésta únicamente se pueda expresar mínimamente y/o en el medio que la rodea en virtud de las condiciones inicialmente establecidas. Pero esto no excluye que las condiciones ambientales adecuadas o bien otros factores puedan ser determinados experimentalmente y que bajo su acción puedan ser estimulados a una producción útil desde el punto de vista económico de la proteína conforme a la invención. Dicho mecanismo de regulación puede ser empleado para la producción biotecnológica. En caso de que esto no fuera posible, siempre pueden servir para el aislamiento del gen correspondiente.

35 Se prefieren en particular las que proceden de bacterias gram-positivas.

Pues estas no poseen ninguna membrana externa y expulsan las proteínas segregadas directamente al medio que las rodea.

40 Se prefieren en particular las bacterias gram-positivas de la especie *Bacillus*.

45 Las proteasas- *Bacillus* presentan unas propiedades a priori adecuadas para diversas posibilidades de aplicación técnicas. Entre ellas se encuentra una cierta estabilidad frente a una temperatura elevada, agentes oxidantes o desnaturalizantes. Además se tiene una gran experiencia con proteasas microbianas en lo que se refiere a su producción biotecnológica, que por ejemplo concierne a la construcción de los vectores de clonación adecuados, a la elección de células huésped y condiciones de crecimiento o bien a la estimación de riesgos, como la alergenicidad. Los bacilos se establecen además como organismos de producción con un rendimiento de producción especialmente elevado en los procesos técnicos. El conjunto de experiencias que se han adquirido para la fabricación y el empleo de estas proteasas, favorece además los posteriores desarrollos de estas enzimas conforme a la invención. Esto hace referencia, por ejemplo, a su compatibilidad con otros compuestos químicos, como las sustancias de los detergentes o productos de lavado.

50 En la especie *Bacillus* se prefieren las especies *Bacillus sp.*, en particular la *Bacillus sp.* (DSM 14392).

55 De esta se ha obtenido inicialmente la forma definitiva de la enzima conforme a la invención. Sus secuencias se indican en el protocolo de secuencias y sus características enzimáticas se describen en los ejemplos. De esta o de las especies afines se pueden fabricar las variantes anteriormente descritas, en particular utilizando métodos estándar biológico moleculares, como por ejemplo la PCR y/o el procedimiento de mutagénesis puntual ya conocido.

60 Otra solución del cometido y por tanto un objetivo de la invención son los ácidos nucleicos que sirven para el desarrollo de la invención.

65 Los ácidos nucleicos constituyen el punto de partida de casi todas las investigaciones biológico moleculares y de los desarrollos así como de la producción de las proteínas. En particular, la secuenciación de los genes y la derivación de la secuencia correspondiente de aminoácidos, cada tipo de mutagénesis (ver antes) y la expresión de las proteínas.

La mutagénesis para el desarrollo de las proteínas con determinadas propiedades se conoce también como "ingeniería de las proteínas". Las propiedades se han indicado antes. Dicha mutagénesis puede llevarse a cabo con un objetivo específico o por métodos aleatorios, por ejemplo con un método de selección y/o detección dirigido a una actividad (screening y selección) en los genes clonados, como por hibridación con sondas de ácido nucleico, o bien en los productos del gen, las proteínas, es decir sobre su actividad. El posterior desarrollo de las proteasas conforme a la invención puede dirigirse en particular a las reflexiones planteadas en la publicación "protein engineering" de P.N. Bryan(2000) en Biochim. Biophys. Acta, tomo 1543, páginas 203-222.

Por lo tanto un objetivo de la presente invención es cada ácido nucleico codificado para una proteasa alcalina del tipo de la subtilisina, cuya secuencia nucleótida es idéntica a la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO.1, en particular por el segmento parcial que corresponde a las posiciones 316 hasta 1125.

Otros representantes de este objeto de la invención son todos los ácidos nucleicos que tienen un código para una de las proteínas anteriormente descritas, conforme a la invención.

Los ácidos nucleicos que codifican para las formas preferidas anteriormente mencionadas son los preferidos, en particular los ácidos nucleicos obtenidos por mutagénesis.

En particular los ácidos nucleicos que codifican para fragmentos de proteínas se incluyen de forma expresa en el campo de protección de la presente invención. En el caso de dichos oligonucleótidos se deben tener en cuenta todos los tres márgenes o esquemas de lectura tanto en una orientación codificante como no codificante. Pues se pueden emplear, en particular por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como puntos de partida para la síntesis de ácidos nucleicos afines, por ejemplo para la amplificación de genes afines de organismos naturales. También pueden servir para crear compuestos híbridos por un proceso de Shuffling basado en la PCR. Otro procedimiento de Shuffling como la Recombining Ligation Reaction (RIR) conforme a la patente WO 00/09679 se basa en los oligonucleótidos, que corresponden a proteína seleccionadas de forma aleatoria o definida. Los oligonucleótidos no codificantes pueden ser empleados, por ejemplo, también para la expresión-regulación.

Conforme a las datos planteados se prefieren los siguientes ácidos nucleicos conforme a la invención, anteriormente descritos :

- Aquellos que se caracterizan por que se obtienen de una fuente natural, en particular de un microorganismo.
- entre ellos, los que se caracterizan por que el microorganismo es una bacteria gram-positiva;
- entre ellos los que se caracterizan por que es una bacteria gram-positiva de la especie *Bacillus*; y
- y de ellos los que se caracterizan por que de la especie *Bacillus sp.* (DSM 14392).

Un objetivo único de la invención lo forman los vectores que contienen un segmento de ácido nucleico conforme a la invención, en particular, uno que tiene código para una proteína conforme a la invención de las mencionadas antes. Ya que para tratar con los ácidos nucleicos relevantes de la invención y por tanto preparar especialmente la producción de proteínas conforme a la invención, se necesitan vectores. Dichos vectores así como los métodos de trabajo correspondientes se han descrito en la técnica con todo detalle. Los vectores se obtienen en el comercio en gran número y margen de variación, tanto para la clonación como para la expresión. Por ejemplo, podemos hablar de vectores que proceden de plásmidos bacterianos, de bacteriófagos o de virus, o bien de vectores sintéticos. Además según los tipos de células en los que se pueden clasificar tendremos, por ejemplo, vectores para bacterias gram-negativas, gram-positivas, para hongos o para eucariontes superiores. Constituyen adecuados puntos de partida, por ejemplo, para las investigaciones biológico moleculares y bioquímicas así como para la expresión del gen correspondiente o de la proteína pertinente.

En una configuración se trata de vectores de clonación, que son vectores conforme a la invención.

Los vectores de clonación son adecuados además de para el almacenamiento, para la amplificación biológica o la selección del gen interesado para su caracterización biológico molecular. Al mismo tiempo representan formas transportables y almacenables de los ácidos nucleicos reivindicados y son también puntos de partida para técnicas biológico moleculares, que no están unidas a las células, como por ejemplo la PCR o el método de mutagénesis *in vitro*.

Preferiblemente se trata de vectores de expresión que a su vez son vectores conforme a la invención.

Este tipo de vectores de expresión son la base para que los correspondientes ácidos nucleicos se fabriquen en sistemas de producción biológicos y por tanto produzcan las correspondientes proteínas. Las configuraciones preferidas de este objeto de la invención son los vectores de expresión que llevan unos elementos genéticos necesarios para la expresión, por ejemplo, el promotor localizado originalmente ante este gen o bien un promotor de otro organismo. Estos elementos pueden, por ejemplo, estar distribuidos en forma de la llamada casete de expresión. Alternativamente, algunos o todos los elementos de regulación pueden ser facilitados por la correspondiente célula huésped. Se combinan preferiblemente los vectores de expresión en lo referente a otras propiedades, como por ejemplo el número de copias óptimo, el sistema de expresión elegido, en particular la célula huésped (ver más adelante).

- 5 Para una tasa o índice de expresión alto es preferible que el vector de expresión a ser posible únicamente contenga el gen correspondiente como Inserción y ningún segmento no codificado en las posiciones 5' ó 3' mayor. Dichas inserciones se obtendrán, por ejemplo, cuando tras el tratamiento estadístico del ADN cromosomal de la cepa de origen con un enzima de restricción, el fragmento obtenido tras la secuenciación antes de la integración en el vector de expresión se tenga que recortar de nuevo.
- 10 Un ejemplo de un vector de expresión es el pAWA22 empleado conforme al ejemplo 2 que se muestra en la figura 2 de la presente invención. Otros vectores están a disposición del experto y se comercializan en gran número.
- 15 Un objeto exclusivo de la invención lo forman las células, que contienen uno de los segmentos de ácido nucleico conforme a la invención, anteriormente mencionado, en particular uno que tiene el código para una proteína conforme a la invención anteriormente mencionada, preferiblemente sobre uno de los vectores conforme a la invención, mencionados antes.
- 20 Estas células contienen la información genética para la síntesis de una proteína conforme a la invención. Facilitan, por ejemplo, la amplificación de los genes correspondientes, pero también su mutagénesis o transcripción y traslación y finalmente la producción biotecnológica de la proteína correspondiente. Esta información genética puede presentarse fuera del cromosoma como elemento genético único, es decir en bacterias en el plásmido o bien estar integrada en un cromosoma. La elección de un sistema adecuado depende de preguntas como, por ejemplo, el tipo y la duración del almacenamiento del gen, o bien del organismo o del tipo de mutagénesis o de la selección. Así en la tecnología actual se describe, por ejemplo, la mutagénesis basada en los bacteriófagos y sus células huésped específicas y los procedimientos de selección para el desarrollo de los enzimas de los detergentes (WO 97/09446).
- 25 Preferiblemente se trata de células huésped que expresan una de las proteínas anteriormente descritas o bien pueden ser estimuladas para su expresión, especialmente mediante el empleo de uno de los segmentos de ácido nucleico conforme a la invención anteriormente mencionado, y en particular mediante el empleo de uno de los vectores de expresión antes indicado.
- 30 Ya que las células huésped formadoras de proteínas facilitan su producción biotecnológica. Para ello deben haber obtenido el gen correspondiente de forma apropiada con uno de los vectores antes descrito y ser capaces de lograr su transcripción, traslación y preferiblemente las etapas de modificación adicionales.
- 35 Como células huésped para la expresión proteica son en principio adecuados todos los organismos, es decir los procariontes, eucariontes o cianofitos. Se prefieren aquellas células huésped que se pueden manejar bien desde el punto de vista genético, lo que por ejemplo hace referencia a la transformación con el vector de expresión, su estabilización y la regulación de la expresión, por ejemplo hongos monocelulares o bacterias. Además las células huésped preferidas se caracterizan por una buena manejabilidad microbiológica y biotecnológica. Esto hace referencia, por ejemplo, a una capacidad sencilla de cultivo, elevadas tasas de crecimiento, mínimas exigencias en los medios de fermentación y buenas tasas o índices de producción y secreción para las proteínas externas. Se eligen preferiblemente especies de laboratorio que se dirigen a la expresión. Estas se obtienen por vía comercial o bien en bancos de genes convencionales. Cada proteína conforme a la invención se puede obtener de este modo, teóricamente a partir de una multitud de organismos huésped. De la totalidad de sistemas disponibles en la tecnología actual, se deben averiguar los sistemas de expresión óptimos para cada caso.
- 40 Se prefieren las células huésped que son proteasa-negativas y por tanto no desintegran las proteínas formadas. Se trata pues de la especie *Bacillus subtilis* DB 104 empleada en el ejemplo 2.
- 45 Las configuraciones preferidas son aquellas células huésped que son regulables en su actividad debido a los elementos genéticos. Por ejemplo, mediante la adición controlada de compuestos químicos, mediante la modificación de las condiciones de cultivo o bien dependiendo del grosor celular correspondiente. Esta expresión controlable permite una producción muy económica de las proteínas que interesan. Se compaginan de forma apropiada el gen, el vector de expresión y la célula huésped, en lo que por ejemplo se refiere a la expresión de elementos genéticos necesarios (lugar de unión de ribosomas, promotores, terminadores) o bien el uso del codón. Por último se puede optimizar que en el gen aquellos codones que sean mal trasladados del huésped correspondiente, sean sustituidos.
- 50 Se prefieren las células huésped que se caractericen por ser bacterias, en particular, las que segregan la proteína formada al medio que las rodea.
- 55 Las bacterias se caracterizan por tiempos cortos de generación y mínimas reivindicaciones en las condiciones de cultivo. De esta forma pueden establecerse métodos económicos. Además con las bacterias se dispone de un conjunto de experiencias rico en la técnica de fermentación. Para una producción especial pueden ser adecuadas bacterias gram-negativas o gram-positivas de fuentes muy diversas.
- 60 En el caso de bacterias gram-negativas, como por ejemplo la *E.coli* una multitud de proteínas son segregadas al espacio periplasmático. Esto puede ser preferible para aplicaciones especiales. Las bacterias gram-positivas como, por ejemplo, los bacilos descargan las proteína segregadas en seguida al medio nutritivo que rodea las células, del
- 65

cual se pueden purificar directamente las proteínas expresadas conforme a la invención siguiendo otra forma de ejecución preferida.

5 En la patente WO 01/81597 se publica un método, según el cual se consigue que también las bacterias gram negativas descarguen las proteínas expresadas. Dicho sistema es adecuado también para fabricar proteínas conforme a la invención. Como células huésped se prefieren las de la especie *Escherichia coli* o *klebsiella*, en particular las especies de *E. coli* JM 109, *E. coli* DH 100B, *E. coli* DH 12S o bien *klebsiella planticola* (Rf). Requieren las correspondientes modificaciones microbiológicas y/o los vectores adecuados descritos en esta patente para facilitar la liberación de las proteínas fabricadas.

10 Las bacterias preferidas como células huésped son aquellas que se caracterizan por que son bacterias grampositivas, en particular pertenecen a la especie *Bacillus*, muy especialmente a la especie *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus alcalophilus*.

15 Una forma de ejecución de la presente invención aprovecha la *B.sp.*, en particular la *B. sp* (DSM 14392) propiamente, para expresar proteínas conforme a la invención (homólogas). Sin embargo, se prefiere la expresión heterológica. Aquí se prefieren las bacterias de la especie *Bacillus*, porque son mejor caracterizadas desde el punto de vista técnico de producción. Se prefieren las de la especie *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus alcalophilus*. Con estas especies se tienen unas experiencias relevantes en lo referente a la fabricación de proteasas según la patente WO 91/02792. En esta patente se informa acerca de los posibles vectores de expresión. Estas especies afines disponen además de un codón similar y forman subtilisinas comparables, de manera que su aparato de síntesis de proteínas funciona de forma natural.

20 Otra ventaja reside en que mediante este método se puede obtener una mezcla de proteínas conforme a la invención con endógenas subtilisinas formadas de las cepas huésped. Dicha co-expresión se deduce asimismo de la patente WO 91/02792. Si no se deseara, entonces los genes de proteasa existentes de forma natural en la célula huésped deberían ser inactivados de forma temporal (ver antes).

25 Se prefieren las células huésped que se caracterizan por que son células eucarióticas, en particular aquellas que modifican la proteína postranslacional formada.

30 Ejemplos de los eucariotes adecuados son los hongos como los actinomicetos o las levaduras como la *Saccharomyces* o *Kluyveromyces*. Los sistemas de expresión fúngicos termófilos se han planteado en la WO 96/02653. Estos son especialmente adecuados para la expresión de variantes que dependen de la temperatura. En cuanto a las modificaciones, la unión de compuestos de bajo peso molecular como los oligosacáridos. Este tipo de modificaciones de oligosacáridos puede ser deseable para reducir la alergenicidad. Puede ser preferible también una co-expresión con las enzimas formadas de forma natural a partir de estas células, como por ejemplo, las celulasas.

35 Un objeto de la invención son los métodos para fabricar una proteína conforme a la invención.

40 Se requiere que cada procedimiento para la fabricación de una de las proteínas conforme a la invención, anteriormente descritas, se lleve a cabo empleando un ácido nucleico anteriormente descrito, conforme a la invención y/o un vector conforme a la invención, de los anteriormente descritos y/o empleando una de las células anteriormente descritas.

45 Entre ellos se encuentran los métodos de síntesis química, que son idóneos desde el punto de vista económico para fragmentos cortos.

50 Sin embargo se prefieren todos los métodos de fabricación biotecnológica, microbiológica, biológico moleculares indicados por la tecnología actual. Por ejemplo, se pueden sintetizar los correspondientes oligonucleótidos y oligopéptidos hasta los genes completos y proteínas de acuerdo con los métodos biológico moleculares conocidos y con ayuda de las secuencias de aminoácidos y ADN mencionadas, como las que se pueden derivar del proteocodo de secuencias, preferiblemente con ayuda de SEQ ID NO.1 y 2.

55 Partiendo de los microorganismos productores de subtilisina conocidos, se pueden por ejemplo identificar y aislar otros productores naturales de subtilisinas, de manera que se averigüen los genes de subtilisina y/o de las secuencias de aminoácidos y según ello se desarrolle la información preparada. Dichas especies de bacterias pueden ser cultivadas y empleadas incluso para los métodos de fabricación correspondientes. Análogamente se pueden desarrollar nuevos vectores de expresión según la imagen previa de los vectores publicados en WO 91/02792. Las formas de ejecución de la presente invención pueden ser también sistemas de expresión sin células basados en secuencias del ácido nucleico correspondiente. En estos la síntesis proteica se lleva a cabo in situ. Todos los elementos ya mencionados se podrán combinar para formar nuevos métodos de fabricación de proteínas conforme a la invención. Para cada proteína conforme a la invención hay una multitud de posibilidades de combinación en las etapas del proceso, de manera que el procedimiento óptimo para cada caso concreto se deba poder averiguar de forma experimental.

Un preciso objeto de la invención son los medios que se caracterizan por que contienen una proteína conforme a la invención de las descritas anteriormente.

5 Todo tipo de medios, en particular mezclas, recetas, soluciones, cuya aplicabilidad se mejora al añadir una de las proteínas anteriormente mencionadas conforme a la invención, se incluirán en el ámbito de protección de la presente invención. Según el sector de aplicación puede tratarse de mezclas sólidas, por ejemplo polvo con proteínas encapsuladas o liofilizadas, o bien de un medio líquido o en forma de gel. Las recetas preferidas contienen, por ejemplo, sustancias patrón, estabilizadores, medios de reacción y/o cofactores de las proteasas y/o otras sustancia sinérgicas con las proteasas. En particular se habla de estos medios a continuación. Otros campos de aplicación se explican con detalle en el manual "Industrial enzymes and their applications" de H. Uhlig, Wiley-Verlag, New York, 1998.

10 A este objeto de la invención se hace referencia cuando se habla del detergente o medio de lavado que contiene una de las proteínas conforme a la invención.

15 Ya que tal como se ha indicado en los ejemplos de la presente invención, se puede constatar sorprendentemente que la proteasa alcalina preferida de *B. sp* (DSM 14392), se caracteriza por que tiene una enzima de tipo natural que en el uso en un medio de lavado o detergente contribuye o mejora el rendimiento del lavado.

20 Entre los medios de lavado imaginables se encuentran tanto concentrados como medios no diluidos, que se emplean a nivel comercial, tanto en el lavado a máquina como en el lavado a mano. Entre estos se encuentran los detergentes para tejidos, alfombras o fibras naturales, en los cuales se emplea el término de detergente conforme a la presente invención. Se encuentran también entre ellos los detergentes para lavavajillas o bien concentrados para máquinas lavavajillas o los detergentes para superficies metálicas como metal, vidrio, porcelana, cerámica, azulejos, ladrillos, superficies lacadas, plásticos, madera o piel; para todos ellos se emplea el término de detergente conforme a la invención. Cualquier tipo de detergente o medio de lavado equivale a una forma de ejecución o configuración de la presente invención, siempre que se haya enriquecido con una proteína, fragmento proteínico, proteína de fusión o derivado conforme a la invención.

25 Las formas de ejecución de la presente invención incluyen todas las formas de presentación de los detergentes o productos de lavado conforme a la invención establecidos en la tecnología actual. Entre ellos se encuentran los medios pastosos, en forma de polvo, líquidos, sólidos o en forma de gel, que consten de varias fases, comprimidos o no comprimidos; entre estos se encuentran los extrudados, granulados, comprimidos en envases grandes o en porciones.

30 En una configuración preferida los detergentes o productos para el lavado conforme a la invención contienen las proteínas anteriormente descritas en una cantidad de 2 µg hasta 120 mg, en particular de 50 µg hasta 80 mg por gramo del medio.

35 La actividad de la proteasa en este tipo de medios se puede averiguar según el método descrito en Tenside, Band 7 (1970), págs. 125-132. Se indica en unidades de proteasa (PE).

40 Un detergente o producto para el lavado contiene además de proteínas, fragmentos, proteínas de fusión o derivados otras sustancias como estabilizadores enzimáticos, tensoactivos, por ejemplo, tensoactivos no iónicos, aniónicos y/o anfóteros, y/o medios blanqueantes y/o builder y otras sustancias convencionales.

45 Entre las sustancias convencionales se encuentran todas aquellas que contienen enzimas activas para el lavado.

50 Por lo tanto los detergentes o productos para el lavado que contienen además de proteínas, fragmentos, proteínas de fusión o derivados conforme a la invención otras enzimas se caracterizan por tener las configuraciones preferidas de la presente invención. Estamos hablando de proteasas, amilasas, celulasas, hemicelulasas, como por ejemplo β-glucanasas, óxidorreductasas, como por ejemplo, lacasas, cutinasas y/o lipasas pero también esterases y otras enzimas que se han descrito para este campo de aplicación.

55 Las enzimas como las proteasas, amilasas, lipasas o celulasas se emplean desde hace siglos como componentes activos en los detergentes o productos para el lavado. Su contribución en el rendimiento del lavado del medio correspondiente es en el caso de la proteasa la capacidad para desintegrar las impurezas que contienen proteínas, en el caso de la amilasa la disgregación de impurezas que contienen almidón y en el caso de la lipasa la actividad divisora o desintegrante de la grasa. Las celulasas se emplean preferiblemente en el lavado de tejidos por su acción sobre las fibras del material textil. Los correspondientes productos de la hidrólisis son atacados, disueltos, suspendidos por los restantes componentes del detergente de manera que los efectos de sinergia entre las enzimas y los componentes restantes actúen de la forma más eficaz posible.

60 Un efecto comparable a la contribución por parte de la celulasa en lo referente a la potencia en un lavado secundario lo pueden ejercer las proteasas sobre fibras naturales, en particular sobre lana o seda. Por su acción en la estructura superficial de dichos tejidos pueden tener un efecto o acción de alisamiento y por tanto contrarrestar el embrollado.

Otras enzimas amplían la potencia de limpieza de los medios correspondientes en lo que se refiere a su potencia enzimática específica. Entre ellas se destacan las hemicelulasas como, por ejemplo, las beta-glucanasas (WO 99/06515 y WO 99/06516), óxidoreductasas como por ejemplo las lacasas (WO 00/39306) o las enzimas que disuelven la pectina (WO 00/42145), que se emplean en particular en los detergentes especiales.

Para su empleo en los detergentes conforme a la invención se tienen en cuenta en primer lugar las enzimas que se obtienen de microorganismos como bacterias o bien hongos. Se obtienen de forma conocida a través de procesos de fermentación de los microorganismos adecuados, que por ejemplo se describen en las solicitudes de patente alemanas DE 1940488 y DE 2121397, en las solicitudes de patente americanas US 3623957, US 4264738, en la solicitud de patente europea EP 006638, así como en la solicitud de patente internacional WO 91/02792.

Una proteína conforme a la invención y/o otras proteínas contenidas se pueden proteger durante el almacenamiento por medio de estabilizadores, ante procesos como la desnaturalización, disgregación o inactivación o ante influencias físicas, el fenómeno de oxidación o el desdoblamiento proteolítico. Esto es válido para todos los medios conforme a la invención, en particular detergentes y productos para el lavado.

Un grupo de estabilizadores son los inhibidores reversibles de la proteasa, que se disocian al diluir los detergentes en el baño de lavado. Hablamos del clorhidrato de benzamidina y de la leupeptina. Frecuentemente se emplean borax, ácidos bóricos, ácidos de boro o sus sales o ésteres y sobre todo los derivados con grupos aromáticos, como los ácidos de boro fenílicos orto-sustituídos conforme a WO 95/12655, meta-sustituídos conforme a WO 92/19707 y para-sustituídos conforme a US 5972873 o bien sus sales o ésteres. En las patentes WO 98/13460 y EP 583534 se informa sobre aldehídos peptídicos, es decir oligopéptidos con un término C reducido, y aquellos de 2-50 monómeros, para la inhibición reversible de proteasas de detergentes o agentes de lavado. Entre los inhibidores reversibles peptídicos se encuentran los ovomucoides (WO 93/00418). Por ejemplo, con la solicitud WO 00/01826 se publican inhibidores de péptidos reversibles, específicos para la proteasa subtilisina que se utilizarán en los medios que contienen proteasa, y con la solicitud WO 00/01831 las proteínas de fusión correspondientes a base de proteasa e inhibidor.

Otros estabilizadores enzimáticos son los aminoalcoholes como el mono-, di-, trietanol-, y -propanolamina y sus mezclas, ácidos carboxílicos alifáticos hasta C₁₂, como por ejemplo los que se mencionan en las solicitudes EP 379261 y WO 97/05227, es decir el ácido succínico, otros ácidos dicarboxílicos o sales de los ácidos mencionados. Con la solicitud DE 19650537 se mencionan los amidaalcoxilatos de ácidos grasos con grupos terminales cerrados. Determinados ácidos orgánicos empleados como sustancias soporte permiten además que se establezca el enzima que contienen, tal como se describe en la WO 97/18287.

Los alcoholes alifáticos de bajo número de carbonos, pero sobre todo los polioles, como por ejemplo la glicerina, el etilenglicol, propilenglicol o sorbitol son otros estabilizadores enzimáticos frecuentemente empleados. Se emplean asimismo las sales de calcio, como por ejemplo el acetato de calcio o el formiato de calcio publicado con esta finalidad en la patente EP 028865, y las sales de magnesio, tal como se indica en la patente europea EP 378262.

Los oligómeros de poliamida (WO 99/43780) o bien los compuestos poliméricos como la lignina (WO 97/00932) son copolímeros de vinilo solubles en agua (EP 828762) o, tal como se publica en la EP 702712, el éter de celulosa, los polímeros acrílicos y/o las poliamidas estabilizan la preparación enzimática frente a las influencias física o las oscilaciones del valor del pH. Los polímeros que contienen poliamina-N-óxido (EP 587550 y EP 581751) actúan al mismo tiempo como estabilizadores enzimáticos y como inhibidores de la transmisión del color. Otros estabilizadores poliméricos son los polioxialquilenos C₈-C₁₈ lineales que aparecen junto a otros componentes en la WO 97/05227. Los poliglucósidos alquílicos podrían estabilizar los componentes enzimáticos del medio conforme a la invención tal como se indica en WO 97/43377 y WO/98/45396, e incrementar así su potencia. Los compuestos reticulados que contienen un N, tal como se indica en WO 98/17764, cumplen una función doble como agentes "soil-release" (que liberan la suciedad) y como estabilizadores enzimáticos. El polímero no iónico, hidrófobo, actúa en una mezcla con otros estabilizadores de acuerdo con la solicitud de patente WO 97/32958 de forma estabilizante sobre una celulosa, de manera que esos o bien otros componentes similares podrían ser adecuados para el enzima esencial en la invención.

Los medios de reducción y los antioxidantes incrementan, tal como se ha publicado en la EP 780466, la estabilidad de los enzimas frente a la disgregación oxidante. Los medios de reducción que contienen azufre son conocidos de las patentes EP 080748 y EP 080223. Otros ejemplos son el sulfito sódico (EP 533239) y el azúcar reductor (EP 656058).

Se emplean también muchas veces combinaciones de estabilizadores, por ejemplo de polioles, ácido bórico y/o bórax en la solicitud de patente WO 96/31589, de ácido bórico o borato, sales reductoras y ácido succínico o bien otros ácidos dicarboxílicos en la solicitud de patente EP 126505 o bien la combinación de ácido bórico o borato con polioles o compuestos de poliamino y con sales reductoras, tal como se publica en EP 080223. La acción de los estabilizadores de péptidos-aldehídos aumenta según la WO 98/13642 mediante la combinación con ácido bórico y/o derivados de ácido bórico y polioles y todavía aumenta más mediante el empleo adicional de iones de calcio, conforme a WO 98/13459.

Los medios con actividades enzimáticas estabilizadas representan las formas de ejecución preferidas de la presente invención. Se prefieren las que son estabilizadas con enzimas.

5 Puesto que los medios conforme a la invención se pueden presentar en todas las formas imaginables, las enzimas conforme a la invención, o bien las proteínas pueden presentarse en todas las fórmulas convenientes para los medios correspondientes de la presente invención. Hablaremos por ejemplo de fórmulas líquidas, granulados sólidos o cápsulas.

10 Otra configuración o forma de ejecución corresponde a los medios para el tratamiento y cuidado de tejidos, que se caracterizan por que contienen proteínas solas o bien junto a otras sustancias activas de una de las proteínas conforme a la invención antes descrita, en particular para tejidos o fibras con componentes naturales y en especial para aquellos que llevan lana o seda.

15 Las fibras naturales, como por ejemplo lana o seda, se caracterizan por una estructura superficial microscópica, característica. Esta puede conducir al afieltrado tal como se menciona en el ejemplo del artículo de R. Breier in Melliand Textilberichte del 1.4.2000 (pág. 263). Para evitar efectos como éste se tratan las materias primas naturales con los medios conforme a la invención, que contribuyan al alisado de la estructura superficial y a contrarrestar el afieltrado.

20 En una configuración preferida se ha concebido el medio con una proteasa conforme a la invención, que actúa como medio protector, por ejemplo, que se añade al proceso de lavado, se añade después del lavado o bien se aplica de forma independiente al lavado. El efecto deseado consiste en que se mantiene durante tiempo una estructura superficial lisa del tejido y se evitan y/o disminuyen las alteraciones del tejido.

25 Un objetivo de la invención son los procedimientos para la limpieza mecánica de los tejidos o de las superficies duras, que se caracterizan porque en al menos una de las etapas de los procedimientos se activa una proteína conforme a la invención, mencionada antes, en particular en una cantidad de 40 µg hasta 32 g, preferiblemente de 50 µg hasta 24 g, muy especialmente de de 100 µg hasta 16 g y muy especialmente de 200 µg hasta 8 g. Puede tratarse de procedimientos manuales y mecánicos, donde se prefiere el procedimiento mecánico por su manejabilidad precisa, en lo que concierne a las cantidades empleadas y a los tiempos de acción.

30 Los métodos para la limpieza de tejidos se caracterizan en general porque en varias etapas del proceso se aplican distintas sustancias activas en la limpieza y tras su periodo de actuación se eliminan, o bien se trata el medio a limpiar con un detergente o una solución del mismo de una forma determinada. Lo mismo es válido para la limpieza de otros materiales además de los tejidos como las superficies duras. Todos los métodos de limpieza imaginables se pueden enriquecer con las proteínas conforme a la invención en al menos una de las etapas del proceso y eso equivale a las configuraciones de la presente invención.

35 Puesto que los enzimas conforme a la invención preferidos poseen de forma natural una actividad que disuelve las proteínas que la desarrollan en los medios de lavado, que no poseen ninguna potencia de lavado, como por ejemplo en una solución tampón, una parte de un proceso de limpieza mecánico de los tejidos puede consistir en que se apliquen a un enzima conforme a la invención compuestos estabilizantes, sales o sustancias tampón como únicos componentes activos en la limpieza. Esto equivale a una configuración de la presente invención muy preferida.

40 En otra configuración preferida de dichos procedimientos se prepararán las correspondientes enzimas conforme a la invención como una de las recetas anteriormente indicadas para el medio conforme a la invención, preferiblemente un medio de lavado o limpieza conforme a la invención.

45 Las configuraciones preferidas de este objeto de la invención son métodos para el tratamiento de material textil o para el cuidado de tejidos, que se caracterizan por que en al menos una de las etapas del proceso se activa una de las proteínas antes mencionadas, en particular para tejidos, fibras o tejidos con componentes naturales y muy en particular con lana o seda.

50 Por ejemplo, puede tratarse de métodos en los cuales los materiales son manipulados para su incorporación a los tejidos, o de métodos que enriquezcan la limpieza de los tejidos soporte. Debido al efecto anteriormente descrito e las proteasas sobre materias primas naturales, que contienen proteínas, se trata en las configuraciones preferidas de métodos para el tratamiento de materias primas textiles, fibras o tejidos con componentes naturales, en particular con lana o seda.

55 Un objetivo de la invención es el uso de una proteína conforme a la invención, antes descrita para el lavado o la limpieza de tejidos o superficies duras.

Preferiblemente los márgenes de concentración anteriormente mencionados sirven para esta aplicación.

60 Pues las proteínas conforme a la invención pueden ser utilizadas en lo que se refiere a las propiedades antes descritas y a los métodos antes descritos, para eliminar de los tejidos o de las superficies duras las impurezas que contie-

nen proteínas. Las formas de hacerlo serán mediante el lavado manual o la eliminación manual de manchas de tejidos o superficies duras o bien mediante el uso de un procedimiento mecánico.

5 En una configuración preferida de esta aplicación se preparan las enzimas conforme a la invención según una de las recetas o fórmulas antes indicadas para los detergentes o agentes de lavado.

10 Otra forma de proceder de este objetivo de la invención equivale a la utilización de una proteína conforme a la invención de las anteriormente descritas, para la activación o desactivación de sustancias contenidas en los detergentes.

15 Pues como bien se sabe los componentes proteínicos de los detergentes o agentes de lavado pueden ser inactivados por la acción de una proteasa. Un objetivo de esta invención es emplear este efecto no deseado con una finalidad determinada. Asimismo es posible, tal como se ha descrito antes, que mediante la proteólisis se active primero otro componente, es decir, como lo que ocurre en la solicitud WO 00/01831, con la proteína híbrida de la propia proteína y el inhibidor correspondiente. Las proteínas conforme a la invención pueden por tanto ser empleadas para reacciones de inactivación, activación o liberación, en particular en medios de varias fases.

20 A continuación se recopilan otros métodos técnicos externos a la problemática del lavado y de la limpieza, aplicaciones y medios relacionados independientemente de su diversidad, que sean objeto de la invención, y cuya característica sea una proteína conforme a la invención. Esta agrupación no se entiende como un recuento definitivo sino que reúne las posibilidades de aplicación más importantes, reconocibles hasta el momento de las proteasas conforme a la invención. Los puntos de partida para otras posibilidades de aplicación se recogen en el manual "Industrial enzymes and their applications" de H. Uhlig, Wiley-Verlag, New York, 1998. Se quiere indicar con ello que se han podido desarrollar otros sectores técnicos y se incluyen en el campo de la protección de la presente invención.

25 Una forma de ejecución de este objetivo de la invención consiste en el empleo de una proteína conforme a la invención para el análisis bioquímico o para la síntesis de compuestos de bajo peso molecular o proteínas.

30 Preferiblemente esta aplicación se lleva a cabo en lo que se refiere a los métodos o medios correspondientes. De acuerdo con la invención y según Römpp, "Lexikon Chemie"(versión 2.0, Stuttgart/New York:Georg Thieme Verlag, 1999) se entiende por análisis enzimático aquella analítica bioquímica, que sirve a enzimas o sustratos específicos, para determinar por un lado los sustratos en su identidad o su concentración o por otro lado enzimas en su identidad o actividad. Los campos de aplicación son todos los sectores de trabajo relacionados con la bioquímica, en particular la biología molecular y la química de las proteínas. Esta utilización se lleva a cabo preferiblemente en el ámbito de un método de análisis enzimático. Una aplicación preferida del objeto de esta invención corresponde al empleo de un análisis secuencial para la determinación de grupos finales.

35 Otra forma de ejecución de este objeto de la invención es la utilización de una proteína anteriormente descrita para la preparación, limpieza o síntesis de sustancias naturales o material biológico.

40 Esta utilización se lleva a cabo preferiblemente lo que se refiere a los métodos o medios correspondientes. Así puede ser necesario en el transcurso de la limpieza de sustancias naturales o material biológico, que se deban eliminar impurezas proteínicas. Por ejemplo en el caso de compuestos de bajo peso molecular. Esto se puede realizar a escala de laboratorio, así como en grandes dimensiones, por ejemplo, tras la fabricación biotecnológica de un material.

45 La utilización de una enzima proteolítica conforme a la invención para la síntesis de proteínas o de otros compuestos químicos de bajo peso molecular se produce en la inversión de la reacción catalizada de forma natural por ellos, por ejemplo, cuando los fragmentos proteínicos se acoplan unos con otros o bien no se pueden enlazar a un compuesto de aminoácidos formado no predominantemente por proteínas. Este tipo de posibilidades de aplicación son posibles apoyándose en la solicitud EP 380362.

50 Otra forma de ejecución de este objeto de la invención consiste en la utilización de una proteína anteriormente descrita, conforme a la invención, para el tratamiento de materias primas naturales, en particular para el tratamiento de superficies, en especial en un método para el tratamiento de cuero.

55 Esta aplicación se realiza preferiblemente en lo que se refiere a los métodos o medios correspondientes. Así es necesaria cuando se deben liberar materias primas naturales de impurezas proteínicas. En primera línea se habla de materias primas no microbiológicas, es decir del sector agrícola, pero también sustancias fabricadas a través de fermentaciones por vía biotecnológica, como los antibióticos.

60 Una forma de ejecución preferida corresponde al empleo en el tratamiento de superficies y en particular en un método para el tratamiento del cuero. Así se describe en Römpp, "Lexikon Chemie"(versión 2.0, Stuttgart/New York:Georg Thieme Verlag, 1999) en particular en el apartado de aguas blandas alcalinas, donde la proteína soluble en agua se disuelve por medio de una enzima proteolítica. Para ello son especialmente apropiadas las proteasas que requieren la presencia de unas condiciones alcalinas y/o agentes desnaturalizantes.

65

Otra forma de ejecución de este objetivo de la invención es la utilización de una proteína conforme a la invención para obtener o tratar materias primas o productos intermedios en la fabricación de los tejidos, en particular para eliminar las capas protectoras de los tejidos.

5 Un ejemplo para obtener o tratar materias primas o productos intermedios en la fabricación de los tejidos es la manipulación de algodón, que debe ser liberado en un proceso definido como acabado, de los componentes de la cápsula; otro sería el tratamiento de la lana; similar a ellos es la manipulación de la seda cruda. Los métodos enzimáticos, o bien las aplicaciones se consideran procedimientos químicos comparables, en particular en lo que se refiere a su tolerancia ambiental.

10 En una forma de ejecución preferida se emplean las proteínas conforme a la invención, para eliminar las capas de protección de los tejidos, en particular los productos intermedios o bien para alisar su superficie, antes de que éstos sufran una posterior etapa de tratamiento.

15 Otra forma de ejecución de este objeto de la invención consiste en la utilización de una proteína anteriormente descrita, conforme a la invención, para el tratamiento de materias primas para tejidos, en particular para el tratamiento de lana o seda o bien tejidos mixtos que contengan lana o seda.

20 Esta aplicación se lleva a cabo e realiza preferiblemente en lo que se refiere a los métodos o medios correspondientes. Así los tejidos se liberan de las impurezas mediante las proteasas; además las propiedades que protegen y alisan la superficie de la enzima proteolítica se benefician en parte del material compuesto por la proteína. Por este motivo se abarca también el cuidado del material correspondiente. En particular se reivindica el tratamiento superficial de lanas o sedas o tejidos que contienen lana o seda. Esto es válido tanto para la fabricación de este tipo de tejidos como para el cuidado durante su uso, por ejemplo en relación a la limpieza de los tejidos (ver antes).

25 Otra forma de ejecución de este objeto de la invención consiste en la utilización de una proteína anteriormente descrita, conforme a la invención, para el tratamiento de películas fotográficas, en particular para la eliminación de capas protectoras que contienen gelatina o sustancias similares.

30 Esta aplicación se lleva a cabo preferiblemente en lo que se refiere a los métodos o medios correspondientes. Con dichas capas protectoras, en especial las formadas por emulsiones de gelatina que contienen sal de plata, se recubren películas como por ejemplo películas o láminas de rayos X. Estas capas deben ser disueltas tras la exposición del material soporte y para ello se emplean las proteasas conforme a la invención en unas condiciones de reacción alcalinas o ligeramente desnaturizantes.

35 Otra forma de ejecución de este objeto de la invención consiste en la utilización de una proteína anteriormente descrita, conforme a la invención, para la fabricación de alimentos o piensos.

40 Esta aplicación se lleva a cabo preferiblemente en lo que se refiere a los métodos o medios correspondientes. Así las proteasas se emplean desde hace tiempo para fabricar alimentos. Un ejemplo de ello es la utilización de Lab para el proceso de maduración del queso u otros productos lácteos. Dichos procesos pueden enriquecerse con una proteína conforme a la invención. Los alimentos ricos en hidratos de carbono o las materias brutas de los alimentos para fines no nutrientes, como por ejemplo, la harina de cereales o la dextrina, pueden ser tratados con las proteasas correspondientes, para liberarlas de las proteínas que las acompañan. Una proteasa es adecuada para ello, en particular cuando se trabaja en unas condiciones alcalinas o ligeramente desnaturizantes.

45 Lo mismo sirve para la fabricación de piensos. Aquí puede ser de interés además de una liberación completa de proteínas, el tratar un tiempo breve las sustancias de partida que contienen proteínas o las mezclas de sustancias con proteasas, para que los animales domésticos puedan digerirlas más fácilmente. Dicho tratamiento también se puede emplear por ejemplo para la fabricación de componentes de medios, es decir para la fermentación de microorganismos.

Ejemplos

55 Todas las etapas de trabajo biológico moleculares siguen unos métodos estándar, como por ejemplo los que se indican en el manual de Fritsch, Sambrook y Maniatis "Molecular cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989, o bien obras comparables. Las enzimas y los kits se emplean conforme a las indicaciones del fabricante.

60 Ejemplo 1

Aislamiento e identificación de una cepa bacteriana activa proteolíticamente

65 0,1 g de una muestra del suelo se suspenden en 1 ml de solución de NaCl estéril al 0,9% y se colocan en placas de agar que contienen polvo láctico (1,5% agar, 0,5% NaCl, 0,1% K₂HPO₄, 0,1% extracto de levadura, 2% peptona (Empresa ICN, Eschwede, art. nr. 104808), 1% polvo láctico (leche desnatada; Firma Difco, Heidelberg, art.-

nr.232100), pH 10). Tras una incubación de 72 horas a 30°C se observaban colonias en el agar lechoso. A continuación se extraían colonias individuales y se cultivaban en un medio Horikoshi (0,1% K₂HPO₄, 0,5% extracto de levadura, 1% peptona, 0,02% MgSO₄, 0,3% Na₂CO₃, pH 9) en un matraz Erlenmeyer a 37°C y agitando a 200 rpm.

5 Una de estas clonas se depositaba el 1.3.2001 en la Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Maschroder Weg 1b, 38124 Braunschweig (DSMZ). Allí tiene el código de ID 01-193 y el número de entrada DSM 14392. Las indicaciones pertinentes sobre las características de este material biológico, tal como han sido estipuladas por la DSMZ el 23.4.2001, se recogen en la tabla 1 siguiente. Parece que se trata de un *Bacillus* alcalifilo.

10

Tabla 1: Propiedades microbiológicas del *Bacillus* sp. (DSM 14392). (según la DSMZ del 23.4.2001)

Característica	Resultado
Forma celular Anchura (µm) Longitud (µm)	Bacilos 0,8-1,0 2,0-3,0
Esporas Sporangium inflado	Positivo, oral Negativo
Crecimiento CASO, pH 7 Crecimiento DSM-Med. 31, pH 9,7	Positivo Positivo
Pruebas alcalinas: NaCl 2% 5% 7% 10% 12% 14% 16%	Positivo Positivo Positivo Positivo Positivo Positivo Positivo
Hidrólisis de Tween 40 Tween 60 Tween 80	Negativo Negativo Negativo
Crecimiento en (DSM-Med. 31) 10°C 40°C 45°C	Positivo Positivo Positivo
Muestra de ácidos grasos celulares	Típica del género <i>Bacillus</i>
Secuenciación parcial de 16 S-rDNA	98,3% similitud a <i>B. sp.</i> DSM 8717 (Microbiology, 1995, Band 141, págs. 1745-1751)

15 Ejemplo 2

Clonación y secuenciación de proteasas maduras

20 El ADN cromosomal de *Bacillus* sp. (DSM 14392) se ha preparado según métodos estándar, ha sido tratado con la enzima de restricción *Sau* 3A y los fragmentos obtenidos se han clonado en el vector pAWA22. Por tanto se trata de un vector de expresión derivado de pBC16 para su empleo en la especie *Bacillus* (Bernhard y cols (1978). J. Bacteriol., Band 133(2), págs 897-903). Este vector se ha transformado en la Proteasa-cepa huésped negativa *Bacillus subtilis* .DB 104(Kawamura y Doi(1984), J. Bacteriol., tomo 160(1), págs 442-444).

25 Los transformantes se regeneraban inicialmente en el medio DM3 (8 g/l agar, ácido succínico 0,5M, 3,5 g/l K₂HPO₄, 1,5 g/l KH₂PO₄, MgCl₂20 mM, 5 g/l de casiaminoácidos, 5 g/l de extracto de levadura, 6 g/l de glucosa, 0,1 g/l de BSA) y luego se inoculaban en placas de TBY-Skimmilk (10 g/l peptona, 10 g/l polvo láctico (ver antes), 5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l NaCl, 15 g/l agar). Las clonas activas proteolíticamente eran identificadas con ayuda de sus halos de lisis. De las clonas activas obtenidas proteolíticamente se ha elegido una (p/A1), se ha aislado su plásmido y se ha secuenciado el inserto siguiendo métodos estándar.

30

El inserto de aproximadamente 3,1 kb de tamaño contenía un marco de lectura abierto de aprox. 1 kb. Esta secuencia aparece en el protocolo de secuencias bajo la denominación SEQ ID NO.1. Comprende 1125 pb. La secuencia de aminoácidos derivada de la misma comprende 374 aminoácidos, seguidos de un codón de parada. Aparece en el protocolo de secuencias bajo la denominación SEQ ID NO.2. Del mismo los primeros 105 aminoácidos no están

35

contenidos en una proteína madura, de manera que se deduce que para la proteína madura es previsible una longitud de 269 aminoácidos

5 Estas secuencias se compararon en agosto de 2001 con las secuencias de proteasas que se obtenían de los bancos de datos accesibles en general Swiss-Prot (Geneva Bioinformatics (GeneBio) S.A., Genf, Schweiz; <http://www.genebio.com/sprot.html>) y Genbank (National Center for Biotechnology Information NCBI, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Las recogidas en la tabla 2 se identificaron como las enzimas más similares.

10 **Tabla 2:** Homología de la proteasa alcalina de *Bacillus sp.* (DSM 14392) a las proteínas más similares y a otras proteínas representativas (los valores en porcentajes se han redondeado)

De lo que se deduce que:

15 ID Los números de registro en los bancos de datos Genbank y Swiss-Prot;
 ident. ADN identidad a nivel de ADN en %;
 Ident. Proprä Identidad a nivel de aminoácidos, respecto a la propproteína, en %;
 Ident. mat.Prot. identidad a nivel de aminoácido, respecto a a proteína madura, en %
 n. no indicado en los bancos de datos

Enzima	Organismo	ID	Ident.ADN	Ident. Proprä.	Ident. mat. Prot.
Elastasa alcalina	<i>Bacillus Ya-B</i>	ELYA_BACSP	98	98	99
Subtilisina p92	<i>Bacillus alkalophilus</i>	ELYA_BACAO	69	80	83
Subtilisina 309 (Savinase®)	<i>Bacillus lentus</i>	SUBS_BACLE	n.	59	83
B.lentus-proteasa alcalina)	<i>Bacillus lentus DSM 5483</i>	SUBS_BACLE	n.	59	82
Subtilisina Sendai	<i>Bacillus Sendai</i>	Q45522	66	69	79
Subtilisina AprQ	<i>Bacillus sp.</i>	Q45523	56	48	60
Subtilisina Carlsberg	<i>Bacillus Licheniformis</i>	SUBT-BACLI	54	48	60
Subtilisina Novo BPN'	<i>Bacillus amiloliquefaciens</i>	SUBT-BACAM	n.	46	56
Subtilisina DY	<i>Bacillus subtilis DY</i>	SUBT-BACSD	n.	41	56
Subtilisina AprN	<i>Bacillus subtilis var. natto</i>	SUBN_BACNA	54	46	55
Subtilisina	<i>Bacillus amilosacchariticus</i>	SUBT_BACSA	54	46	55
Subtilisina	<i>Bacillus pumilus</i>	SUBT_BACPU	n.	40	55
Subtilisina J	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	SUBT_BACST	54	45	55
Subtilisina E	<i>Bacillus subtilis</i>	SUBT_BACSU	54	46	55

20 Las secuencias de aminoácidos de estas proteasas se comparan también unas con otras en la alineación de la figura 1.

Ejemplo 3

25 Limpieza y caracterización de la proteasa alcalina

En un matraz erlenmeyer de 500 ml se introducían de medio Horikoshi (ver arriba), se inoculaba con una colonia del género *Bacillus* transformada según el ejemplo 2 y se dejaba que actuara durante 72 h a 37°C, hasta conseguir la fase de crecimiento estacionaria.

30 Del residuo de este cultivo se podía obtener una enzima proteolítica singular tras sucesivas etapas de limpieza: Diálisis del residuo frente a tampón HEPES/NaOH 20 mM, pH 7,6; cromatografía negativa de intercambio de aniones en Q-Sepharose® (Firma Pharmacia-Amersham Biotech, Schweden); cromatografía de intercambio de cationes de la ruptura en S-Sepharose® (Firma Pharmacia-Amersham) en la elución con un tampón de gradientes de HEPES/NaOH, NaCl 0-1 M, pH 7,6. La proteasa se eluía en NaCl 0,2M y se concentraba luego con una cromatografía de intercambio de cationes en Resource S® (Firma Pharmacia-Amersham) y HEPES/NaOH (pH 7,6) como eluyente.

40 De este modo se obtenía una electroforesis en gel SDS y una coloración Coomassie de proteína pura.

Ejemplo 4

Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y enfoque isoeléctrico

En una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS desnaturalizante en un sistema PHAST® de la Firma Pharmacia-Amersham Biotech, Suecia, la proteasa alcalina de *B. sp.* (DSM 14392) obtenida según los ejemplos 2 y 3, presenta un peso molecular de 26 kD. Según el enfoque isoeléctrico, y usando asimismo el sistema PHAST® de la Firma Pharmacia-Amersham Biotech el punto isoeléctrico de la proteasa alcalina de *B. sp.* (DSM 14392) es 11.

Ejemplo 5

Características enzimáticas

Actividad específica

La actividad específica de la proteasa alcalina de *B. sp.* (DSM 14392) limpiada conforme a los ejemplos 2 y 3 se averiguaba con el sustrato Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida (AAPF; Firma Bachem Biochemica GmbH, Heidelberg). Durante 5 minutos de incubación a pH 8,6 y 25°C se observaba una actividad de 9 U/mg. Lo que correspondió a 1U 1µmol de sustrato disociado por minuto.

Ejemplo 6

Contribución a la potencia de lavado

Para este ejemplo se empleaban tejidos estándar con impurezas que habían sido tratados por el centro confederado de ensayos y pruebas de material, St. Gallen, Suiza (EMPA) o bien por el centro de investigación de productos lavados, Krefeld. Se habían empleado las siguientes impurezas y tejidos: A(sangre/leche/hollín en algodón), B(sangre, leche, tinta negra en algodón), C(sangre/leche/tinta negra en un tejido mixto de poliéster-algodón), D(sangre en algodón).

Con este material de ensayo se investigaban distintas fórmulas de detergentes de forma launderométrica respecto a su potencia de lavado. Para ello se empleaba un baño con un porcentaje 1:12 y se efectuaba el lavado durante 30 min a una temperatura de 40°C. La dosis era de 5,88 g del medio correspondiente por litro de baño. La dureza del agua era de 16°.

Como detergente de control se empleaba una fórmula básica de detergente de la siguiente composición (todos los datos en porcentaje en peso): Benzolsulfonato de alquilo 4% lineal (sal sódica), 4% de C₁₂-C₁₈-sulfato de alcohol graso (sal sódica), 5,5% C₁₂-C₁₈-alcohol graso con 7 EO , 1% jabón de sodio, 11% carbonato sódico, 2,5% disilicato sódico amorfo, 20% perborato sódico-tetrahidratado, 5,5% TAED, 25% zeolita A, 4,5% policarboxilato, 0,5% fosfonato, 2,5% granulado inhibidor de espuma, 5% sulfato sódico, resto: agua, blanqueador óptico, sales. Esta se mezclaba para las diferentes series de ensayos con las proteasas siguientes, de manera que se obtenía una concentración final de 2.250 PE en actividad proteolítica por litro de baño: *B. lentus*-Proteasa alcalina F 49 (WO 95/23221); Fabricante: Firma Biozym, Kundl, Austria), Savinase® (Firma Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca), o bien la proteasa conforme a la invención de *B. sp.* (DSM 14392).

Tras el lavado se medía el grado de blancura del tejido lavado en comparación con el de sulfato de bario, que se había normalizado al 100%. La medición se efectuaba en un espectrómetro Datacolor SF500-2 a 460 nm (filtro UV 3), diafragma 30 mm, sin brillo, tipo de luz D65, 10°, d/8°. Los resultados obtenidos se recogían en la siguiente tabla 3 como porcentaje de remisión, es decir como valores porcentuales en comparación con el sulfato de bario con los correspondientes valores iniciales. Se indican los valores medios de 4 mediciones. Se obtiene así una conclusión directa sobre el aporte del enzima contenido para la potencia de lavado del medio empleado.

Tabla 3:

Detergente básico con	A	B	C	D
Valor inicial	15,8	14,3	11,8	19,9
Control sin proteasa	21,7	22,2	14,7	67,9
Proteasa conforme a la invención de <i>B.sp</i> (DSM 14392)	29,9	40,1	32,0	73,0
<i>B. lentus</i> - proteasa alcalina F49	29,3	30,2	25,2	70,8
Savinasa®	30,0	32,1	29,1	68,8
Desviación estándar	1,0	1,1	1,2	0,5

Se observa que la proteasa conforme a la invención de *B.sp* (DSM 14392) en todas las impurezas analizadas muestra una potencia claramente mayor que las proteasas *B.lentus*-proteasa alcalina F49 y Savinasa® o bien al menos próxima a ellas.

Ejemplo 7

Contribución a la potencia de limpieza en caso de emplear una actividad baja

Los recipientes con superficies lisas, duras se rellenaban de forma estandarizada con almidón mixto (E) y leche(F) y se lavaban en la lavaplatos convencional. La muestra E se lavaba a 45°C con el programa normal de lavaplatos tipo Miele® G 676 y la muestra F a 55°C con el programa normal de lavaplatos tipo Bosch ®SGS 4002. Por proceso de lavado se empleaban 20g de detergente. La dureza del agua era de 16° alemanes.

Como detergente se empleaba la fórmula base siguiente (todos los datos en porcentajes en peso): 55% tripolifosfato sódico (calculado como anhidro), 4% disilicato sódico amorfo (calculado como anhidro), 22% carbonato sódico, 9% perborato sódico, 2% TAED, 2% tensoactivo no iónico, resto: agua, colorantes, perfume. Esta fórmula de base se empleaba para los distintos ensayos con las distintas proteasas *B. lentus*-proteasa alcalina F49, Properasa®, o bien la proteasa conforme a la invención de *B.sp* (DSM 14392), que daba una actividad de 10.000 PE por proceso de lavado. Esto equivalía respectivamente a aprox. 0,1 mg de proteasa-proteína por g de detergente concentrado.

Tras el lavado se averiguaba el porcentaje de suciedad E. Para ello se calculaba la diferencia del peso del recipiente sucio y a continuación lavado y del peso inicial del recipiente en relación con la diferencia en peso del recipiente no lavado respecto al peso inicial. Esta relación puede expresarse como porcentaje. Para la suciedad F se efectuaba una valoración visual tras el lavado según una escala de 0 (=inalterada, es decir suciedad muy fuerte) hasta 10 (= ninguna suciedad reconocible). Los resultados obtenidos se recogían en la tabla 4 siguiente. Se pueden ver los valores medios de las 8 mediciones. Se puede sacar una conclusión directa de la contribución de la enzima a la potencia de lavado del medio empleado:

Tabla 4:

Detergente básico con	E	F
Proteasa conforme a la invención de <i>Bacillus sp.</i> (DSM 14392)	58,1	8,1
<i>B.lentus</i> -proteasa alcalina F49	60,6	7,8
Properasa®	56,5	8,2

Estos resultados demuestran que la proteasa conforme a la invención de *B.sp* (DSM 14392) es al menos de igual calidad en lo referente a su potencia en las lavadoras automáticas que las otras proteasas analizadas; y esto para una actividad comparativamente baja.

Ejemplo 8

Contribución a la potencia de limpieza para una actividad elevada

Tal como se ha visto en el ejemplo 7 se empleaban recipientes tipo estándar con suciedades de albúmina (G), huevo/leche(H) y leche(I) y del mismo modo se lavaban con las respectivas fórmulas de detergentes. Las muestras G y H se lavaban a 55°C con el programa normal de lavaplatos y la muestra I a 45°C con el programa normal de lavaplatos tipo Miele® G 676. La única diferencia con respecto al ejemplo 7 consistía en que se empleaban 20.000 PE de las correspondientes proteasas. Esto equivalía a unos 0,2 mg de proteasa en un detergente concentrado.

Los resultados para las muestras G y H se determinaban gravimétricamente como en el ejemplo 7 y los correspondientes a la suciedad I por medio de una evaluación visual conforme a una escala 0 (=inalterada, es decir suciedad muy fuerte) hasta 10 (= ninguna suciedad reconocible). Los resultados obtenidos se recogían en la tabla 5 siguiente. En ella se indican los valores medios de las 8 mediciones correspondientes.

Tabla 5:

Detergente básico con	G	H	I
Proteasa conforme a la invención de <i>Bacillus sp.</i> (DSM 14392)	19,7	21,0	6,6
<i>B.lentus</i> -proteasa alcalina F49	52,4	81,0	6,1
Properasa®	17,3	16,9	6,1

Incluso para las actividades superiores de proteasa se observa una contribución superior o al menos comparable de la proteasa conforme a la invención a la potencia de limpieza global del correspondiente medio o detergente, frente a las proteasas establecidas para lavaplatos proteasa *B.lentus* -proteasa alcalina F49 y Properasa®.

Descripción de las figuras

Figura 1: Alineación de las secuencias de aminoácidos de la proteasa de *B.sp* (DSM 14392) conforme a la invención con las subtilisinas conocidas más importantes resumidas en la tabla 2, respectivamente en la forma madura, es decir procesada.

Los números siguientes corresponden a las proteasas siguientes (en paréntesis las ID de la entrada del banco de datos; comparar también la tabla 2 en el ejemplo 2):

1	Proteasa conforme a la invención de <i>B.sp</i> (DSM 14392)	
2	Elastasa alcalina	de <i>B. Ya-B</i> (ELYA_BACSP)
3	Subtilisina P92 (ELYA_BACAO)	de <i>B. alkatophilus</i>
4	Savinase® (SUBS_BACLE)	de <i>B. lentus</i>
5	5 Subtilisina BL (SUBB_BACLE)	de <i>B. lentus</i>
6	6 Subtilisina Sendai AprS	de <i>B. sp.</i> (Q45522)
7	7 Subtilisina AprQ	de <i>B. sp.</i> (Q45523)
8	8 Subtilisina Carlsberg	de <i>B. licheniformis</i> (SUBT_BACLI)
9	9 Subtilisina Novo BPN` (SUBT_BACAM)	de <i>B. amyloliquefaciens</i>
10	10 Subtilisina DY	de <i>B. subtilis DY</i> (SUBT_BACSD)
11	11 AprN (SUBN_BACNA)	de <i>B. subtilis var. natto</i>
12	12 Subtilisina (SUBT_BACSA)	de <i>B. amylosacchariticus</i>
13	13 Subtilisina (SUBT_BACPU)	de <i>B. pumilus</i>
14	14 Subtilisina J(SUBT_BACST)	de <i>Geobacillus stearothermophilus</i>
15	15 Subtilisina E(SUBT_BACSU)	de <i>B. subtilis</i>

Figura 2: El vector de expresión pAWA22 derivado de pBC16, que presenta un promotor de *B.licheniformis*(PromPLi) y con la corriente del mismo un *Bcl I*-intersección de restricción (compara el ejemplo 2 y Bernhard y cols (1978), J. Bacteriol., 133(2), pág. 897-903).

PROTOCOLO SECUENCIAL

- <110> Henkel Sociedad de comandita por acciones
- <120> Nueva proteasa alcalina de Bacillus sp. (DSM 14392) y detergentes y medios de lavado que contienen esta nueva proteasa alcalina
- <130> H5389PCT
- <140>
- <141>
- <150> DE 101 63884.1
- <151>2001-12-22
- <160> 2
- <170> Patente Ver. 2.1
- <210>1
- <211>1125
- <212>ADN
- <213>Bacillus sp. (DSM 14392)
- <220>
- <221> mat_peptide
- <222>(316)..(1125)
- <400> 1

ES 2 381 539 T3

atg ggg aaa att gtt gcc gga aca gca cta att ata tca gta gca ttt	48
Met Gly Lys Ile Val Ala Gly Thr Ala Leu Ile Ile Ser Val Ala Phe	
-105 -100 -95 -90	
agt tca tcg atc gca caa gca gcc gag gaa gca aag gaa aaa tac ctc	96
Ser Ser Ser Ile Ala Gln Ala Ala Glu Glu Ala Lys Glu Lys Tyr Leu	
-85 -80 -75	
att ggc ttt aaa gaa caa gaa gtt atg tct caa ttt gtt gac caa att	144
Ile Gly Phe Lys Glu Gln Glu Val Met Ser Gln Phe Val Asp Gln Ile	
-70 -65 -60	
gat ggc gat gag tat tct att tct tct caa gcg gaa gat gtt gaa att	192
Asp Gly Asp Glu Tyr Ser Ile Ser Ser Gln Ala Glu Asp Val Glu Ile	
-55 -50 -45	
gat ctc ctt cat gaa ttt gat ttt att cct gtt tta tct gtt gaa ctt	240
Asp Leu Leu His Glu Phe Asp Phe Ile Pro Val Leu Ser Val Glu Leu	
-40 -35 -30	
gat cca gaa gat gtc gat gct tta gag ctt gat cca gca atc gcc tat	288
Asp Pro Glu Asp Val Asp Ala Leu Glu Leu Asp Pro Ala Ile Ala Tyr	
-25 -20 -15 -10	
att gag gaa gat gct gag gta acg aca atg caa act gtt cca tgg ggc	336

ES 2 381 539 T3

Ile	Glu	Glu	Asp	Ala	Glu	Val	Thr	Thr	Met	Gln	Thr	Val	Pro	Trp	Gly		
				-5				-1	1				5				
att	aac	cgt	gta	caa	gct	ccg	att	gcc	caa	agc	aga	gga	ttc	aca	ggt	384	
Ile	Asn	Arg	Val	Gln	Ala	Pro	Ile	Ala	Gln	Ser	Arg	Gly	Phe	Thr	Gly		
		10					15					20					
act	gga	gtt	cgt	gtt	gct	gtc	tta	gac	aca	ggg	atc	tca	aat	cac	gct	432	
Thr	Gly	Val	Arg	Val	Ala	Val	Leu	Asp	Thr	Gly	Ile	Ser	Asn	His	Ala		
	25					30					35						
gat	tta	aga	att	cgt	ggc	ggt	gcg	agt	ttt	gta	cca	gga	gag	ccg	aac	480	
Asp	Leu	Arg	Ile	Arg	Gly	Gly	Ala	Ser	Phe	Val	Pro	Gly	Glu	Pro	Asn		
	40				45					50					55		
att	agt	gat	gga	aac	ggt	cat	ggt	acc	cac	gtt	gct	ggt	aca	att	gca	528	
Ile	Ser	Asp	Gly	Asn	Gly	His	Gly	Thr	His	Val	Ala	Gly	Thr	Ile	Ala		
				60					65					70			
gcg	tta	aac	aat	tca	atc	ggt	gta	ctt	ggc	gta	gca	cct	aac	gtt	gat	576	
Ala	Leu	Asn	Asn	Ser	Ile	Gly	Val	Leu	Gly	Val	Ala	Pro	Asn	Val	Asp		
			75					80					85				
tta	tat	ggg	gtt	aaa	gtg	cta	gga	gca	agt	ggc	tct	ggg	tca	atc	agt	624	
Leu	Tyr	Gly	Val	Lys	Val	Leu	Gly	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Ile	Ser		
		90					95					100					
ggt	att	gca	caa	ggt	tta	caa	tgg	gct	gca	aat	aat	ggc	atg	cat	att	672	
Gly	Ile	Ala	Gln	Gly	Leu	Gln	Trp	Ala	Ala	Asn	Asn	Gly	Met	His	Ile		
	105					110					115						
gct	aac	atg	agt	tta	gga	agt	agt	gct	gga	tct	gct	aca	atg	gaa	caa	720	
Ala	Asn	Met	Ser	Leu	Gly	Ser	Ser	Ala	Gly	Ser	Ala	Thr	Met	Glu	Gln		
	120				125					130					135		
gct	gtt	aac	caa	gca	aca	gca	agt	ggc	gtt	ctt	gta	gtc	gca	gct	tct	768	
Ala	Val	Asn	Gln	Ala	Thr	Ala	Ser	Gly	Val	Leu	Val	Val	Ala	Ala	Ser		
			140					145						150			
ggt	aac	tca	ggt	gca	gga	aat	gtt	gga	ttc	cca	gca	cgc	tat	gca	aat	816	
Gly	Asn	Ser	Gly	Ala	Gly	Asn	Val	Gly	Phe	Pro	Ala	Arg	Tyr	Ala	Asn		
			155					160					165				
gcg	atg	gct	gtt	ggt	gca	aca	gat	caa	aac	aac	aac	cgc	gct	agc	ttt	864	
Ala	Met	Ala	Val	Gly	Ala	Thr	Asp	Gln	Asn	Asn	Asn	Arg	Ala	Ser	Phe		
		170					175					180					
tct	cag	tac	gga	gca	ggt	ctt	gac	att	gtc	gca	cca	ggt	gta	ggt	gta	912	
Ser	Gln	Tyr	Gly	Ala	Gly	Leu	Asp	Ile	Val	Ala	Pro	Gly	Val	Gly	Val		
	185					190					195						
caa	agt	acg	gtt	cct	ggc	aat	gga	tac	gca	agc	ttc	aat	ggt	aca	tct	960	
Gln	Ser	Thr	Val	Pro	Gly	Asn	Gly	Tyr	Ala	Ser	Phe	Asn	Gly	Thr	Ser		
	200				205					210					215		
atg	gct	aca	ccg	cac	gtt	gct	ggt	ggt	gct	gcg	tta	gtg	aag	caa	aag	1008	
Met	Ala	Thr	Pro	His	Val	Ala	Gly	Val	Ala	Ala	Leu	Val	Lys	Gln	Lys		
				220					225					230			

ES 2 381 539 T3

aat cct tct tgg tca aat gtt caa att cgt aac cac ctt aaa aat acg 1056
Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile Arg Asn His Leu Lys Asn Thr
235 240 245

gca aca aac tta gga aat acg act caa ttc gga agt ggt ctt gtt aac 1104
Ala Thr Asn Leu Gly Asn Thr Thr Gln Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn
250 255 260

gca gaa gcg gca aca cgt taa 1125
Ala Glu Ala Ala Thr Arg
265 270

<210>2

<211>374

5 <212>PRT

<213> Bacillus sp. (DSM 14392)

<400> 2

ES 2 381 539 T3

Met Gly Lys Ile Val Ala Gly Thr Ala Leu Ile Ile Ser Val Ala Phe
 1 5 10 15
 Ser Ser Ser Ile Ala Gln Ala Ala Glu Glu Ala Lys Glu Lys Tyr Leu
 20 25 30
 Ile Gly Phe Lys Glu Gln Glu Val Met Ser Gln Phe Val Asp Gln Ile
 35 40 45
 Asp Gly Asp Glu Tyr Ser Ile Ser Ser Gln Ala Glu Asp Val Glu Ile
 50 55 60
 Asp Leu Leu His Glu Phe Asp Phe Ile Pro Val Leu Ser Val Glu Leu
 65 70 75 80
 Asp Pro Glu Asp Val Asp Ala Leu Glu Leu Asp Pro Ala Ile Ala Tyr
 85 90 95
 Ile Glu Glu Asp Ala Glu Val Thr Thr Met Gln Thr Val Pro Trp Gly
 100 105 110
 Ile Asn Arg Val Gln Ala Pro Ile Ala Gln Ser Arg Gly Phe Thr Gly
 115 120 125
 Thr Gly Val Arg Val Ala Val Leu Asp Thr Gly Ile Ser Asn His Ala
 130 135 140
 Asp Leu Arg Ile Arg Gly Gly Ala Ser Phe Val Pro Gly Glu Pro Asn
 145 150 155 160
 Ile Ser Asp Gly Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Ile Ala
 165 170 175
 Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly Val Ala Pro Asn Val Asp
 180 185 190
 Leu Tyr Gly Val Lys Val Leu Gly Ala Ser Gly Ser Gly Ser Ile Ser
 195 200 205
 Gly Ile Ala Gln Gly Leu Gln Trp Ala Ala Asn Asn Gly Met His Ile
 210 215 220
 Ala Asn Met Ser Leu Gly Ser Ser Ala Gly Ser Ala Thr Met Glu Gln
 225 230 235 240
 Ala Val Asn Gln Ala Thr Ala Ser Gly Val Leu Val Val Ala Ala Ser
 245 250 255
 Gly Asn Ser Gly Ala Gly Asn Val Gly Phe Pro Ala Arg Tyr Ala Asn
 260 265 270
 Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe
 275 280 285
 Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile Val Ala Pro Gly Val Gly Val
 290 295 300
 Gln Ser Thr Val Pro Gly Asn Gly Tyr Ala Ser Phe Asn Gly Thr Ser
 305 310 315 320
 Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Val Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys
 325 330 335
 Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile Arg Asn His Leu Lys Asn Thr
 340 345 350
 Ala Thr Asn Leu Gly Asn Thr Thr Gln Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn
 355 360 365
 Ala Glu Ala Ala Thr Arg
 370

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proteasa alcalina del tipo de la subtilisina con una secuencia de aminoácidos, que es idéntica a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO.2
2. Proteasa alcalina del tipo de la subtilisina con una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en las posiciones 106 hasta 374 a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO.2
- 10 3. Proteasa alcalina del tipo de la subtilisina que se deriva de una secuencia de nucleótidos, que es idéntica a la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO.1
4. Proteasa alcalina del tipo de la subtilisina, que se deriva de una secuencia de nucleótidos, que es idéntica a la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO.1 por el segmento parcial que corresponde a las posiciones 106 hasta 374 conforme a la SEQ ID No.2.
- 15 5. Proteasa alcalina del tipo de la subtilisina, que se deriva de una proteasa conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 4 por fragmentación o mutagénesis de delección, con al menos 260 aminoácidos situados dentro de la secuencia de aminoácidos de partida que cuelgan de la molécula de partida.
- 20 6. Proteína conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 5, que se caracteriza por que está ramificada por acoplamiento de compuestos de bajo peso molecular, por la reacción química de una cadena lateral, por el enlace covalente de compuestos químicos bifuncionales y/o macromoléculas y/o por la socialización con sustancias concomitantes.
- 25 7. Proteína conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 6, que se caracteriza por que adicionalmente está estabilizada, en particular por acoplamiento a un polímero y/o por mutagénesis puntual.
8. Proteína conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 7, que se caracteriza por que se obtiene de una fuente natural, en particular de un microorganismo.
- 30 9. Proteína conforme a la reivindicación 8, que se caracteriza por que se trata de una bacteria gram-positiva en el microorganismo.
- 35 10. Proteína conforme a la reivindicación 9, que se caracteriza por que la bacteria gram-positiva pertenece a la especie *Bacillus*.
11. Proteína conforme a la reivindicación 10, que se caracteriza por que en lo referente a la especie *Bacillus* se trata de la *Bacillus sp.*, en particular la *Bacillus sp.* (DSM 14392).
- 40 12. Para una proteasa alcalina del tipo de la subtilisina con ácido nucleico codificado, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO.1.
- 45 13. Para una proteasa alcalina del tipo de la subtilisina con ácido nucleico codificado, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO.1 por el segmento parcial de las posiciones 316 hasta 1125.
14. Ácido nucleico, que codifica una de las proteínas indicadas en las reivindicaciones 1 hasta 8.
- 50 15. Ácido nucleico conforme a una de las reivindicaciones 12 hasta 14, que se caracteriza por que se obtiene de una fuente natural, en particular de un microorganismo.
16. Ácido nucleico conforme a la reivindicación 15, que se caracteriza por que se trata de una bacteria gram-positiva en el microorganismo.
- 55 17. Ácido nucleico conforme a la reivindicación 16, que se caracteriza por que se trata de una bacteria gram-positiva de la especie *Bacillus*.
18. Ácido nucleico conforme a la reivindicación 17, que se caracteriza por que se trata de la *Bacillus sp.* en particular la *Bacillus sp.* (DSM 14392) de la especie *Bacillus*.
- 60 19. Vector, que contiene un segmento de ácido nucleico indicado en las reivindicaciones 12 hasta 18, en particular uno que codifica para una proteína indicada en las reivindicaciones 1 hasta 11.
- 65 20. Vector de clonación conforme a la reivindicación 19.
21. Vector de expresión conforme a la reivindicación 19.

22. Célula, que contiene un segmento de ácido nucleico indicado en las reivindicaciones 12 hasta 18, en particular uno que codifica para una de las proteínas indicadas en las reivindicaciones 1 hasta 11, preferiblemente sobre un vector conforme a una de las reivindicaciones 19 hasta 21.
- 5 23. Célula huésped, que expresa una de las proteínas indicadas en las reivindicaciones 1 hasta 11, o bien puede ser estimulada por su expresión, en particular empleando un segmento de ácido nucleico indicado en una de las reivindicaciones 12 hasta 18, especialmente por el empleo de un vector de expresión conforme a la reivindicación 21.
- 10 24. Célula huésped conforme a la reivindicación 23, que se caracteriza por que es una bacteria, en particular una que segrega la proteína formada al medio que la rodea.
- 15 25. Bacteria conforme a la reivindicación 24, que se caracteriza por que es una bacteria gram-positiva, en particular de una especie *Bacillus*, especialmente de la especie, *Bacillus lentus* *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus alcalophilus*.
- 20 26. Célula conforme a la reivindicación 22 ó 23, que se caracteriza por que es una célula eucariótica, en particular una que modifica la proteína formada postranslacionalmente.
27. Método para la fabricación de una de las proteínas indicadas en las reivindicaciones 1 hasta 11 empleando un ácido nucleico conforme a una de las reivindicaciones 12 hasta 18 y/o empleando un vector conforme a una de las reivindicaciones 19 hasta 21 y/o empleando una célula conforme a una de las reivindicaciones 22 hasta 26.
28. Medio, que se caracteriza por que contiene una proteína conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 11.
- 25 29. Detergente o medio de lavado, que se caracteriza por que contiene una proteína conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 11.
- 30 30. Medio conforme a la reivindicación 29, que se caracteriza por que la proteína se encuentra en una cantidad de 2 µg hasta 160 mg, preferiblemente de 5 µg hasta 140 mg, en particular de 20 µg hasta 120 mg, muy especialmente de 50 µg hasta 80 mg por g de medio.
- 35 31. Medio conforme a la reivindicación 29 ó 30, que se caracteriza por que la contiene además otras enzimas, en particular otras proteasas, amilasas, celulasas, hemicelulasas, oxidoreductasas y/o lípidos.
- 40 32. Medio para el tratamiento de material textil o para el cuidado de tejidos, que se caracteriza por que solo o con otras sustancias activas contiene una proteína conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 11, en particular para fibras o tejidos con componentes naturales y muy especialmente para los que tienen lana o seda.
- 45 33. Método para la limpieza mecánica de tejidos o bien superficies duras, que se caracteriza por que en al menos una de las etapas del proceso una proteína es activa conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 11, en particular en una cantidad de 40 µg hasta 32 g, preferiblemente de 50 µg hasta 24 g, en particular de 100 µg hasta 16 g, muy especialmente de 200 µg hasta 8 g por aplicación.
- 50 34. Método para el tratamiento de material textil o para el cuidado de tejidos, que se caracteriza por que al menos en una de las etapas del proceso, una proteína es activa conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 11, en particular para fibras o tejidos con componentes naturales y muy especialmente para los que tienen lana o seda.
- 55 35. Utilización de una proteína activa proteolíticamente conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 11 para la limpieza de tejidos o superficies duras, en particular en una cantidad de 40 µg hasta 32 g, preferiblemente de 50 µg hasta 24 g, en particular de 100 µg hasta 16 g, y muy especialmente de 200 µg hasta 8 g por aplicación.
- 60 36. Utilización de una proteína conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 11 para la activación o desactivación de sustancias de los detergentes o medios de lavado.
- 65 37. Utilización de una proteína conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 11 para el análisis bioquímico o para la síntesis de compuestos de bajo peso molecular o de proteínas.
38. Utilización de una proteína conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 11 para la preparación, limpieza o síntesis de sustancias naturales o sustancias biológicas.
39. Utilización de una proteína conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 11 para el tratamiento de materias primas naturales, en particular para el tratamiento de superficies, en especial en un método para el tratamiento de cuero.
40. Utilización de una proteína conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 11 para la obtención o el tratamiento de materias primas o productos intermedios en la fabricación de tejidos, en especial para eliminar capas de suciedad de los tejidos.

41. Utilización de una proteína conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 11 para el tratamiento de materias primas textiles o para el cuidado de tejidos, en particular para el tratamiento de lana o seda o tejidos mixtos que contienen lana o seda.

5 42. Utilización de una proteína conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 11 para el tratamiento de películas fotográficas, en particular para la eliminación de capas de suciedad que contienen gelatina o sustancias similares.

43. Utilización de una proteína conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 11 para la fabricación de alimentos o pienso.

10