

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 504**

51 Int. Cl.:

C11D 3/386 (2006.01)

C07K 5/06 (2006.01)

C07K 5/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2012 E 12733657 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015 EP 2726592**

54 Título: **Composición de subtilisina estabilizada**

30 Prioridad:

01.07.2011 EP 11172357

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

01.07.2015

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (100.0%)
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:

**MIKKELSEN, LISE MUNCH;
PONZINI, FRANCESCO;
BISACCIA, ROBERTO y
CANEVOTTI, RENATO**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 539 504 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

Composición de subtilisina estabilizada

5 Referencia a un listado de secuencias

[0001] Esta solicitud contiene un listado de secuencias en forma legible por ordenador.

Campo técnico

10

[0002] La presente invención se refiere a una composición que comprende una subtilisina que es estabilizada por un derivado de péptido-aldehído. También se refiere a un método para preparar la composición y a un compuesto para su uso en la composición.

15 Antecedentes de la invención

[0003] La WO 98/13458, WO 94/04651, WO 98/13460, WO 95/25791 y WO 2009/118375 divulgan detergentes líquidos con una proteasa tipo subtilisina estabilizada por un péptido-aldehído. La WO 2011/036153 divulga que la adición de un péptido-aldehído a un detergente que contiene subtilisina granuloso puede mejorar la detergencia.

20

[0004] Se conoce bien que los aldehídos pueden formar aductos solubles con NaHSO_3 (aductos de bisulfito o hidrosulfito) y que los péptido-aldehídos tienden a ser moderadamente solubles en agua.

25

[0005] La WO 98/47523 y la US 6.500.802 revelan ácidos peptidil-2-amino-1-hidroxi-alcanosulfónicos y su uso como inhibidores de proteasa. La US 5.436.229 divulga aductos de bisulfito de derivados de L-arginina aldehído y su uso como inhibidores de trombina. La US 4.691.007 divulga aductos de bisulfito de tetrapéptido aldehídos útiles como inhibidores de leucocito elastasa humana.

30

[0006] La US 4.703.036, la US 4.478.745 y la US 5.578.574 divulgan métodos para preparar péptido aldehídos en forma seca.

Resumen de la invención

35

[0007] En la producción a gran escala de composiciones de subtilisina estabilizada es muy preferible manejar materias primas líquidas, tanto por seguridad como por consideraciones de proceso. Los péptido aldehídos tienden a ser moderadamente solubles en agua, lo que hace la preparación de soluciones acuosas concentradas difícil o imposible y es necesario el uso de producto bien secos o soluciones acuosas altamente diluidas cuando se hacen soluciones de subtilisina estabilizada para el uso en formulaciones líquidas o para granulación para hacer composiciones granuladas.

40

[0008] La conversión del péptido aldehído en un aducto de hidrosulfito puede utilizarse para aumentar la solubilidad acuosa en la purificación de los péptido aldehídos. Ventajosamente, hemos descubierto que este aducto de hidrosulfito es en sí eficaz como inhibidor y estabilizador de subtilisina y que puede también estabilizar una segunda enzima (no subtilisina) si está presente. Hemos descubierto que el aducto de hidrosulfito es eficaz como inhibidor de subtilisina, y hemos descubierto que mantiene su efecto inhibitorio y estabilizante en un detergente líquido durante el almacenamiento. Así, el uso del aducto de hidrosulfito puede evitar el coste y el tiempo de convertirlo de nuevo en el péptido aldehído y el secado posterior del péptido aldehído se puede ahorrar, y se puede evitar el inconveniente de manipulación del péptido aldehído en polvo o como solución acuosa altamente diluida. Además, la adición de un aducto de bisulfito de péptido aldehído también puede mejorar la detergencia (rendimiento de lavado) de un detergente que contiene subtilisina.

50

[0009] Por consiguiente, la invención proporciona una composición que comprende una subtilisina y un aducto de hidrosulfito de péptido aldehído, que tiene la fórmula $\text{X-B}^1\text{-NH-CHR-CHOH-SO}_3\text{M}$. Los grupos de la fórmula tienen el siguiente significado:

55

a) M es H (hidrógeno) o un metal alcalino, preferiblemente Na o K;

b) R es un grupo de manera que NH-CHR-CO es un residuo de L o D-aminoácido (en el siguiente denominado B^0);

60

c) B^1 es un residuo de aminoácido; y

d) X consiste en uno o varios residuos de aminoácidos (preferiblemente uno o dos), opcionalmente incluyen un grupo de protección N-terminal.

65

[0010] La invención proporciona además un método para preparar la composición, este método comprende la mezcla de una subtilisina, una solución acuosa que comprende un aducto de hidrosulfito de péptido aldehído con la fórmula $\text{X-B}^1\text{-NH-CHR-CHOH-SO}_3\text{M}$ (donde M, R, B^1 y X se definen como por encima), y opcionalmente un surfactante.

[0011] Adicionalmente, la invención proporciona un compuesto para su uso en la composición, este compuesto es un aducto de hidrosulfito de péptido aldehído con la fórmula $X-B^1-NH-CHR-CHOH SO_3M$. R puede ser p-hidroxi-bencilo y M, B¹ y X se definen como por encima.

5

Descripción detallada de la invención

Composición de subtilisina estabilizada

[0012] La composición de la invención comprende una subtilisina y un aducto de hidrosulfito de péptido aldehído, y éste puede opcionalmente comprender una segunda enzima. La composición puede ser en forma líquida o granulosa. Puede ser una composición de detergente que comprenda además un surfactante.

[0013] En una composición tal como un líquido o detergente granuloso, la cantidad de cada enzima (subtilisina y segunda enzima opcional) será típicamente de 0,04-80 micro-M (o micromol/kg), en particular 0,2-30 micro-M, especialmente 0,4-20 micro-M (generalmente 1-2000 mg/l o mg/kg, en particular 5- 750 mg/l, especialmente 10-500 mg/l) calculado como proteína enzimática pura. En una composición tal como un concentrado enzimático la cantidad de cada enzima será típicamente 0,01-20 mM, en particular 0,04-10 mM, especialmente 0,1-5 mM (generalmente 0,3-500 g/l, en particular 1-300 g/l, especialmente 3-150 g/l) calculado como proteína enzimática pura.

20

[0014] La proporción molar de estabilizador o inhibidor de enzima según la invención en subtilisina es al menos 1:1 o 1,5:1, y es menor que 1000:1, más preferido menor que 500:1, más preferido incluso de 100:1 a 2:1 o de 20:1 a 2:1, o más preferido, la proporción molar es de 10:1 a 3:1.

25

Péptido aldehído

[0015] El aducto bisulfito usado en el método se puede derivar de un péptido aldehído con la fórmula $X-B^1-B^0-H$ donde los grupos se definen como arriba con B⁰ siendo un residuo de aminoácido único con configuración L o D con la fórmula: NH-CHR-CO.

30

[0016] NH-CHR-CO (B⁰) es un residuo de L o D-aminoácido, donde R puede ser una cadena lateral alifática o aromática, por ejemplo, aralquilo tal como bencilo, donde R se puede sustituir opcionalmente. Más particularmente, el residuo B⁰ puede ser voluminoso, neutro, polar, hidrofóbico y/o aromático, opcionalmente sustituido. Ejemplos son la L o D-forma de Tyr (p-tirosina), m-tirosina, 3,4-dihidroxifenilalanina, Phe, Val, Met, norvalina (Nva), Leu, Ile o norleucina (Nle); particularmente Tyr, m-tirosina, 3,4-dihidroxifenilalanina, Phe, Val, Met, Nva o Nle.

35

[0017] En la fórmula anterior, $X-B^1-B^0-H$, el residuo B¹ puede ser particularmente pequeño, alifático hidrofóbico y/o neutro. Ejemplos son alanina (Ala), cisteína (Cys), glicina (Gly), prolina (Pro), serina (Ser), treonina (Thr), valina (Val), norvalina (Nva) y norleucina (Nle); particularmente Ala, Cys, Gly, Ser, Thr, Val, Nva y Nle.

40

[0018] X puede en particular ser uno o dos residuos de aminoácidos con un grupo de protección N-terminal opcional (es decir, el compuesto es un tri- o tetrapéptido aldehído con o sin un grupo de protección). Así, X puede ser B², B³-B², Z-B², Z-B³-B² donde B³ y B² cada uno representa un residuo de aminoácido, y Z es un grupo de protección N-terminal.

45

[0019] El residuo B² puede en particular ser pequeño, alifático y/o neutro, por ejemplo, Ala, Gly, Thr, Arg, Leu, Phe o Val; particularmente Gly, Thr o Val.

[0020] El residuo B³ puede en particular ser voluminoso, hidrofóbico, neutro y/o aromático, opcionalmente sustituido, por ejemplo, Phe, Tyr, Trp, fenilglicina, Leu, Val, Nva, Nle o Ile.

50

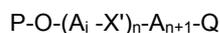
[0021] El grupo Z de protección N-terminal (si está presente) se puede seleccionar de formilo, acetilo (Ac), benzoilo, trifluoroacetilo, fluorometoxi carbonilo, metoxisuccinilo, grupos protectores de uretano aromáticos y alifáticos, benciloxicarbonilo Cbz), t-butiloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo, p- metoxibencil carbonilo (MOZ), bencilo (Bn), p- metoxibencilo (PMB) o p- metoxifenilo (PMP), metoxicarbonilo (Moc); metoxiacetilo (Mac); metil carbamato o un grupo de urea de metilamino carbonil/metil. En el caso de un tetrapéptido aldehído con un grupo de protección (es decir $X = Z-B^3-B^2$), Z es preferiblemente un grupo alifático pequeño, por ejemplo, formilo, acetilo, fluorometoxi carbonilo, t-butiloxicarbonilo, metoxicarbonilo (Moc), metoxiacetilo (Mac), metil carbamato o un grupo de urea de metilamino carbonil/metil. En el caso de un tripéptido aldehído con un grupo de protección (es decir $X = Z-B^2$), Z es preferiblemente un grupo aromático voluminoso tal como, benzoilo, benciloxicarbonilo, p-metoxibencilo carbonilo (MOZ), bencilo (Bn), p- metoxibencilo (PMB) o p- metoxifenilo (PMP).

60

[0022] Péptido aldehídos adecuados se describen en WO 94/04651, WO 95/25791, WO 98/13458, WO 98/13459, WO 98/13460, WO 98/13461, WO 98/13462, WO 98/13462, WO 2007/141736, WO 2007/145963, WO 2009/118375, WO 2010/055052 y WO 2011/036153. Más particularmente, el péptido aldehído puede ser Z-RAY-H, Ac-GAY-H, Z-GAY-H, Z-GAL-H, Z-VAL-H, Z-GAF-H, Z-GAV-H, Z-GGY-H, Z-GGF-H, Z-RVY-H, Z-LVY-H, Ac-LGAY-H, Ac-FGAY-H, Ac- YGAY-H, Ac-FGAL-H, Ac-FGAF-H, Ac-FGVY-H, Ac-FGAM-H, Ac-WLVY-H, MeO-CO-VAL-H, MeNCO-VAL-H, MeO-CO-FGAL-

65

H, MeO-CO-FGAF-H, MeSO₂-FGAL-H, MeSO₂-VAL-H, PhCH₂O(OH)(O)P-VAL-H, EtSO₂-FGAL-H, PhCH₂SO₂-VAL-H, PhCH₂O(OH)(O)P-LAL-H, PhCH₂O(OH)(O)P-FAL-H o MeO(OH)(O)P-LGAL-H. Aquí, Z es benciloxicarbonilo, Me es metilo, Et es etilo, Ac es acetilo, H es hidrógeno y las demás letras representan residuos de aminoácidos denominados por notificación de letra única estándar (por ejemplo, F = Phe, Y = Tyr, L = Leu). Alternativamente, el péptido aldehído puede tener la fórmula como se describe en la WO 2010/055052:



donde Q es hidrógeno, CH₃, C_X3, CHX₂ o CH₂X, donde X es un átomo de halógeno;

donde un X' es el "grupo N-cubierto doble" CO, CO-CO, CS, CS-CS o CS-CO, más preferido urido (CO), y el otro X' es nada,

donde n = 1-10, preferiblemente 2-5, de la forma más preferible 2,

donde cada uno de A_i y A_{n+1} es un residuo de aminoácido que tiene la estructura:

NH-CR-CO para un residuo a la derecha de X= -CO-, o

-CO-CR-NH- para un residuo a la izquierda de X= -CO-

donde R es H- o un alquilo opcionalmente sustituido o grupo de alquilaril que puede incluir opcionalmente un heteroátomo y puede estar opcionalmente enlazado al N átomo, y donde P es hidrógeno o cualquier grupo de protección C-terminal.

Ejemplos de tales péptido aldehídos incluyen α-MAPI, β-MAPI, F-urea-RVY-H, F-urea-GGY-H, F-urea-GAF-H, F-urea-GAY-H, F-urea-GAL-H, F-urea-GA-Nva-H, F-urea-GA-Nle-H, Y-urea-RVY-H, Y-urea-GAY-H, F-CS-RVF-H, F-CS-RVY-H, F-CS-GAY-H, antipaina, GE20372A, GE20372B, quimostatina A, quimostatina B y quimostatina C.

[0023] Otros ejemplos de péptido aldehídos se describe en WO 2010/055052 y WO 2009/118375, WO 94/04651, WO 98/13459, WO 98/13461, WO 98/13462, WO 2007/145963, (P&G).

Aducto de hidrosulfito de péptido aldehído

[0024] El aducto de hidrosulfito de péptido aldehído se puede derivar de los péptido aldehídos anteriormente descritos.

[0025] Ejemplos Particulares son Cbz-RA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-GA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-GA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-GA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-GA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-GG-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-GG-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-LV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-LGA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-FGA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-FGV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-FGA-NHCH(CH₂CH₂SCH₃)(SO₃M)-H, Ac-WLV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, MeO-CO-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, MeNCO-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, MeO-CO-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, MeO-CO-FGA-NHCH(CH₂Ph)-C(OH)(SO₃M)-H, MeSO₂-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, MeSO₂-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, PhCH₂O(OH)(O)P-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)-C(OH)(SO₃M)-H, EtSO₂-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, PhCH₂SO₂-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, PhCH₂O(OH)(O)P-LA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)-C(OH)(SO₃M)-H, PhCH₂O(OH)(O)P-FA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, MeO(OH)(O)P-LGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H y F-urea-RV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H donde M=carga negativa, H, Na o K u otro contraión.

Subtilisina

[0026] Las subtilisinas son un subgrupo de serina proteasas. Una serina proteasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces peptídicos, y en la que hay un residuo de serina esencial en el sitio activo (White, Handler y Smith, 1973 "Principles of Biochemistry," Fifth Edition, McGraw-Hill Book Company, NY, pp. 271-272). Las subtilisinas incluyen, preferiblemente consisten en, los subgrupos I-S1 e I-S2 tal y como son definidos por Siezen *et al.*, Protein Engng. 4 (1991) 719-737; y Siezen *et al.*, Protein Science 6 (1997) 501-523. Debido a la estructura altamente conservada del sitio activo de las serina proteasas, la subtilisina según la invención puede ser funcionalmente equivalente al subgrupo propuesto designado subtilasina por Siezen *et al.* (*supra*).

[0027] La subtilisina puede ser de origen animal, vegetal o microbiano, incluyendo mutantes química o genéticamente modificados (variantes diseñadas de proteína). Ejemplos de subtilisinas son las derivadas de *Bacillus*, por ejemplo, subtilisina Novo, subtilisina Carlsberg, subtilisina BPN', subtilisina 309, subtilisina 147 y subtilisina 168 (descrita en la WO 89/06279) y proteasa PD138 (WO 93/18140). Se describen ejemplos en WO 98/020115, WO 01/44452, WO 01/58275, WO 01/58276, WO 03/006602 y WO 04/099401. Otros ejemplos son las variantes descritas en WO 92/19729, WO 98/20115, WO 98/20116, WO 98/34946, WO 2011/036263 y mezclas de proteasas.

[0028] Ejemplos de subtilisinas disponibles comercialmente incluyen Kannase™, Everlase™, Relase™, Esperase™, Alcalase™, Durazym™, Savinase™, Ovozyme™, Liquanase™, Coronase™, Polarzyme™, Pyrase™, tripsina pancreática NOVO (PTN), Bio-Feed™ Pro y Clear- Lens™ Pro; Blaze (todos disponibles de Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca). Otras subtilisinas disponibles comercialmente incluyen Ronozyme™ Pro, Maxatase™, Maxacal™, Maxapem™, Opticlean™, Properase™, Purafast™, Purafect™, Purafect Ox™, Purafact Prime™, Excellase™, FN2™, FN3™ y FN4™ (disponible de Genencor International Inc., Gist-Brocades, BASF o DSM). Otros ejemplos son Primase™ y Duralase™. Blap R, Blap S y Blap X disponibles de Henkel.

10 Segunda enzima

[0029] Además de la subtilisina, la composición de detergente puede comprender opcionalmente una segunda enzima tal como una lipasa, una cutinasa, una amilasa, una carbohidrasa, una celulasa, una pectinasa, una pectato liasa, una mananasa, una arabinasa, una galactanasa, una xilanas, una oxidasa, una lacasa y/o peroxidasa. La composición puede contener una, dos o más enzimas que no sean subtilisina.

Lipasa y cutinasa

[0030] Lipasas y cutinasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteína están incluidos. Los ejemplos incluyen lipasa de *Thermomyces*, por ejemplo, de *T. lanuginosus* (anteriormente conocido como *Humicola lanuginosa*) como se describe en la EP 258 068 y EP 305 216, cutinasa de *Humicola*, por ejemplo *H. insolens* como se describe en la WO 96/13580, una lipasa de *Pseudomonas*, por ejemplo, de *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes* (EP 218 272), *P. cepacia* (EP 331 376), *P. stutzeri* (GB 1,372,034), *P. fluorescens*, *Pseudomonas sp.* cepa SD 705 (WO 95/06720 y WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (WO 96/12012), una lipasa de *Bacillus*, por ejemplo, de *B. subtilis* (Dartois *et al.*, 1993, Biochemica et Biophysica Acta, 1131: 253-360), *B. stearothermophilus* (JP 64/744992) o *B. pumilus* (WO 91/16422).

[0031] Otros ejemplos son variantes de lipasa tales como los descritos en WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407 225, EP 260 105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079, WO 97/07202, WO 00/060063, WO 2007/087508 y WO 2009/109500.

[0032] Enzimas de lipasa disponibles comercialmente preferidas incluyen Lipolase™, Lipolase Ultra™ y Lipex™, Lecitase™, Lipoplex™, Lipoclean™, Lipoprime™ (Novozymes A/S). Otras lipasas disponibles comercialmente incluyen Lumafast (Genencor Int Inc); Lipomax (Gist-Brocades/Genencor Int Inc) y lipasa de la especie *Bacillus* de Solvay.

35 Amilasa

[0033] Amilasas adecuadas (α y/o β) incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteína están incluidos. Las amilasas incluyen, por ejemplo, α -amilasas obtenidas de *Bacillus*, por ejemplo, una cepa especial de *Bacillus licheniformis*, descrita con más detalle en la GB 1.296.839.

[0034] Ejemplos de amilasas útiles son las variantes descritas en WO 94/02597, WO 94/18314, WO 96/23873 y WO 97/43424, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408 y 444.

[0035] Amilasas disponibles comercialmente son Stainzyme, Stainzyme Plus, Duramyl™, Termamyl™, Termamyl Ultra, Natalase, Fungamyl™ y BAN™ (Novozymes A/S), Rapidase™ y Purastar™ (de Genencor International Inc.).

50 Liasas

[0036] La pectato liasa puede ser una enzima de tipo salvaje derivada de *Bacillus*, particularmente *B. licheniformis* o *B. agaradhaerens*, o una variante derivada de cualquiera de estos, por ejemplo, como se describe en US 6.124.127, WO 1999/027083, WO 1999/027084, WO 2002/006442, WO 2002/092741, WO 2003/095638, una pectato liasa disponible comercialmente es XPECT, Pectawash y Pectaway (Novozymes A/S).

Mananasa

[0037] La mananasa puede ser una mananasa alcalina de la familia 5 o 26. Puede ser un tipo salvaje de *Bacillus* o *Humicola*, particularmente *B. agaradhaerens*, *B. licheniformis*, *B. halodurans*, *B. clausii* o *H. insolens*. Mananasas adecuadas se describen en la WO 1999/064619. Una mananasa disponible comercialmente es Mannaway (Novozymes A/S).

65 Celulasa

- 5 [0038] Celulasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteína están incluidos. Celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, por ejemplo, las celulasas fúngicas producidas a partir de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* descritas en la US 4.435.307, US 5.648.263, US 5.691.178, US 5.776.757 y WO 89/09259.
- 10 [0039] Celulasas especialmente adecuadas son las celulasas alcalinas o neutras que tienen beneficios de cuidado del color. Ejemplos de tales celulasas son las celulasas descritas en la EP 0 495 257, EP 0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940. Otros ejemplos son variantes de celulasa tales como las descritas en WO 94/07998, EP 0 531 315, US 5,457,046, US 5,686,593, US 5,763,254, WO 95/24471, WO 98/12307 y WO 99/01544.
- 15 [0040] Celulasas disponibles comercialmente son Celluzyme, Celluclean, Endloase, Carezyme, Renozyme, Whitezyme (Novozymes A/S).
- 20 Preparación de péptido aldehído y aducto de hidrosulfito/bisulfito
- [0041] El péptido aldehído se puede convertir en un aducto de hidrosulfito hidrosoluble por reacción con bisulfito sódico, como se describe en los libros, por ejemplo March, J. *Advanced Organic Chemistry*, fourth edition, Wiley-Interscience, US 1992, p 895.
- 25 [0042] La conversión en un aducto de hidrosulfito es reversible (Ex J. Am. Chem. Soc. 1978, 100, 1228). Así, el aducto se puede revertir parcial o completamente para liberar el péptido aldehído en un detergente líquido, en una formulación de subtilisina líquida o en el agua de lavado.
- [0043] El péptido aldehído en cuestión se puede preparar por métodos conocidos, por ejemplo, como se describe en la US 4.703.036, US 4.478.745 o US 5.578.574 omitiendo un paso final de secado, o se puede preparar por cualquiera de los métodos revistos en J. Pept. Sci. 2007, 13,1-15 o ejemplificados en *Synthesis* 1983, 676. El péptido aldehído puede ser crudo o purificado, aislado como un sólido o mantenido en solución por un solvente orgánico.
- 30 [0044] Una solución acuosa del aducto de bisulfito se puede preparar al reaccionar el péptido aldehído correspondiente con una solución acuosa de bisulfito sódico (sulfito de hidrógeno de sodio, NaHSO₃); potasio bisulfito (KHSO₃) por métodos conocidos, por ejemplo, como se describe en WO 98/47523; US 6.500.802; US 5.436.229; J. Am. Chem. Soc. 1978, 100, 1228; *Org. Synth.*, Coll. Vol. 7: 361.
- 35 Composición de detergente
- [0045] El detergente podría ser detergente granuloso o líquido. El detergente líquido es en forma física, que no es sólida (o gas); puede ser un líquido vertible, un gel vertible o un gel no vertible. Puede ser bien isotrópico o estructurado, preferiblemente isotrópico. Incluye formulaciones útiles para el lavado en lavadoras automáticas o para el lavado a mano. El detergente contiene al menos un surfactante. El detergente también puede incluir un constructor.
- 40 [0046] La composición de detergente granulosa puede ser un granulado o polvo, o un polvo/granulado prensado en una tableta, briqueta. La composición puede ser en forma de tableta, barra o bolsa, incluyendo bolsas multicompartmento. La composición puede ser en forma de polvo, por ejemplo un polvo de flujo libre, tal como un aglomerado, polvo secado por atomización, encapsulado, extruido, aguja, tallarín, copo o cualquier combinación de los mismos.
- 45 [0047] Ingredientes detergentes se pueden separar físicamente entre sí por compartimentos en bolsas disolubles en agua o en diferentes estratos de tabletas (véase dosis unitaria por debajo). Por lo tanto, se puede evitar la interacción de almacenamiento negativa entre componentes. Diferentes perfiles de disolución de cada uno de los compartimentos también pueden dar lugar a disolución retardada de componentes seleccionados en la solución de lavado.
- 50 [0048] Las bolsas pueden ser de cualquier configuración, forma y material que sea adecuado para contener la composición, por ejemplo, sin permitir la liberación de la composición de la bolsa antes del contacto con el agua. La bolsa está hecha de una película soluble en agua que incluye un volumen interno. Dicho volumen interno se puede dividir en compartimentos de la bolsa. Las películas preferidas son materiales poliméricos preferiblemente polímeros que se forman en una película u hoja. Los polímeros preferidos, copolímeros o derivados de los mismos se seleccionan de poliacrilatos, y copolímeros acrilatos solubles en agua, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, dextrina de sodio, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, maltodextrina, polimetacrilato, de la forma más preferible copolímeros de alcohol polivinílico y, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Preferiblemente el nivel de polímero en la película por ejemplo PVA es al menos aproximadamente del 60%. El peso molecular medio preferido estará típicamente de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 150.000.
- 55 Las películas también pueden ser composiciones de mezcla que comprendan mezclas de polímeros hidrolíticamente degradables y solubles en agua tales como polilactida y alcohol polivinílico (conocido bajo la referencia comercial M8630 como lo vende Chris Craft In. Prod. Of Gary, Ind., US) más plastificantes tales como glicerol, etilenglicerol, propilenglicerol, sorbitol y sus mezclas derivadas. Las bolsas pueden comprender una composición de limpieza de lavandería sólida o
- 60
- 65

componentes en parte y/o una composición de limpieza líquida o componentes en parte separada por la película soluble en agua. El compartimento para componentes líquidos puede ser diferente en la composición de los compartimentos que contienen sólidos (véase por ejemplo, US 2009/0011970).

5 [0049] La elección de componentes de detergente pueden incluir, para cuidado textil, la consideración del tipo de textil que se va a limpiar, el tipo y/o el grado de suciedad, la temperatura a la que se realiza la limpieza y la formulación del producto detergente. Aunque los componentes mencionados más abajo están categorizados por encabezado general según una funcionalidad particular, esto no se debe interpretar como una limitación, ya que un componente puede comprender funciones adicionales como apreciará el experto en la materia.

10 [0050] En una forma de realización, la composición de subtilisina estabilizada de la invención se puede añadir a una composición de detergente en una cantidad que corresponda a 0,001-100 mg de proteína, tal como 0,01-100 mg de proteína, preferiblemente 0,005-50 mg de proteína, de forma más preferible 0,01-25 mg de proteína, incluso de forma más preferible 0,05-10 mg de proteína, de la forma más preferible 0,05-5 mg de proteína, e incluso de la forma más preferible 0,01-1 mg de proteína por litro de solución de lavado.

Dosis unitaria

20 [0051] Un producto de dosis unitaria es el embalaje de una única dosis en un contenedor no reutilizable. Cada vez es más usado en detergentes para lavado de ropa y de vajilla. Un producto de dosis unitaria de detergente es el embalaje (por ejemplo, en una bolsa hecha de una película soluble en agua) de la cantidad de detergente usada para un único lavado.

25 [0052] En un aspecto, la composición de detergente está en forma de dosis unitaria. Productos detergentes en forma de dosis unitaria incluyen tabletas, cápsulas, sobres, bolsas, etc. En un aspecto, para su uso aquí son tabletas envueltas en una película hidrosoluble y bolsas hidrosolubles. El peso de la composición de detergente de la invención es de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 gramos, de aproximadamente 12 a aproximadamente 24 gramos o incluso de 14 a 22 gramos. Estos pesos son extremadamente adecuados para encajar en el dispensador de producto de detergente de lavado de la vajilla automático. En los casos de productos de dosis unitaria que tienen un material hidrosoluble envolvente de la composición de detergente, el material hidrosoluble no se considera como parte de la composición. En un aspecto, la forma de dosis unitaria es una bolsa hidrosoluble (es decir, película hidrosoluble envolvente de una composición de detergente), en un aspecto, una bolsa multicompartimento con una pluralidad de películas que forman una pluralidad de compartimentos. Esta configuración contribuye a la flexibilidad y optimización de la composición. Permite la separación y liberación controlada de diferentes ingredientes. En un aspecto, un compartimento contiene una composición de detergente en forma sólida y otro compartimento contiene una composición de detergente en forma líquida.

40 [0053] En un aspecto, en las formas de realización de bolsa de multicompartimento dos compartimentos diferentes podrían contener dos agentes de limpieza diferentes. En un aspecto, las películas de estos dos compartimentos tienen perfiles de disolución diferentes, permitiendo la liberación de los mismos o diferentes agentes en momentos diferentes. Por ejemplo, el agente de un compartimento (primer compartimento) se puede entregar pronto en el proceso de lavado para ayudar a la eliminación de la suciedad y un segundo agente de otro compartimento (segundo compartimento) se puede entregar al menos dos minutos, o incluso al menos cinco minutos más tarde que el agente del primer compartimento.

45 [0054] En un aspecto, se describe una bolsa de multicompartimento que comprende dos compartimentos superpuesto contiguamente sobre otro compartimento donde al menos dos compartimentos diferentes contienen dos composiciones de detergente diferentes.

50 [0055] Un paquete multicompartimentos está formado por una pluralidad de materiales envolventes hidrosolubles que forman una pluralidad de compartimentos, uno de los compartimentos contendrá alguno o todos los ingredientes de la composición de detergente, otro compartimento puede contener una composición líquida, la composición líquida puede ser acuosa (es decir comprender más del 10 por ciento de agua en peso de la composición líquida) y el compartimento puede estar hecho de material soluble en agua caliente. En una forma de realización, un compartimento está hecho de un material soluble en agua fría. Permite la separación y la liberación controlada de diferentes ingredientes. En otras formas de realización todos los compartimentos están hechos de material soluble de agua caliente.

60 [0056] Paquetes adecuados comprenden al menos dos compartimentos superpuestos contiguamente (es decir, colocados por encima) sobre otro compartimento, especialmente adecuadas son las bolsas. Esta disposición contribuye a la compacidad, robustez y fuerza del paquete, adicionalmente, minimiza la cantidad de material hidrosoluble necesario. Solo son necesarias tres piezas de material para formar tres compartimentos. La robustez del paquete permite también el uso de películas muy finas sin comprometer la integridad física del paquete. El paquete es también muy fácil de usar debido a que los compartimentos no necesitan ser plegados para usarse en los dispensadores de la máquina para adaptarse a la geometría. Al menos dos de los compartimentos del paquete contienen dos composiciones de detergente diferentes. Por "composiciones diferentes" aquí se entiende composiciones de detergente que difieran en al menos un ingrediente.

[0057] En un aspecto, al menos uno de los compartimentos contiene una composición de detergente sólida y otro compartimento una composición de detergente líquida acuosa, las composiciones son típicamente en una proporción en peso de sólido a líquido de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 1:20, de aproximadamente 18:1 a aproximadamente 2:1 o de aproximadamente 15:1 a aproximadamente 5:1. Este tipo de paquete es muy versátil porque puede alojar composiciones con un amplio espectro de valores de proporción sólido:líquido. Las bolsas tienen una alta proporción sólido:líquido porque muchos de los ingredientes detergentes son especialmente adecuados para su uso en forma sólida, en un aspecto en forma de polvo. La proporción sólido:líquido definida aquí se refiere a la relación entre el peso de todas las composiciones sólidas y el peso de todas las composiciones líquidas en el paquete.

[0058] Las proporciones en peso adecuadas sólido:líquido son de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 18:1, o de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1. Estas proporciones en peso son adecuadas en casos en los que la mayor parte de los ingredientes del detergente están en forma líquida.

[0059] En un aspecto, los dos compartimentos contiguos contienen composiciones de detergente líquido, que pueden ser iguales o diferentes y otro compartimento contiene una composición de detergente sólido, por ejemplo en polvo, en un aspecto, un polvo densificado. La composición sólida contribuye a la fuerza y robustez del paquete.

[0060] Por motivos de adaptación al dispensador, especialmente en un lavavajillas automático, los productos en forma de dosis unitaria aquí tienen una base cuadrada o rectangular y una altura de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 cm, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 cm. En un aspecto, el peso de la composición sólida es de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 gramos, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 gramos y el peso de las composiciones líquidas es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 4 gramos, o de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 3 gramos. En un aspecto, al menos dos de las películas que forman compartimentos diferentes tienen solubilidades diferentes, bajo las mismas condiciones. Esto permite liberar las composiciones que están parcialmente o totalmente revestidas en tiempos diferentes.

[0061] La liberación controlada de los ingredientes de una bolsa multicompartimento se pueden conseguir modificando el espesor de la película y/o la solubilidad de la película. La solubilidad de la película se puede retardar mediante, por ejemplo, reticulación la película como se describe en la WO 2002/102955. Otras películas hidrosolubles diseñadas para liberación en el aclarado se describen en la US 4.765.916 y US 4.972.017. El recubrimiento ceroso (véase US 5.453.216) de películas pueden ayudar a la liberación en el aclarado. Los medios de liberación controlada por pH se describen en la US 5.453.216, en particular polisacárido aminoacetilado que tiene grado selectivo de acetilación.

[0062] Otros medios para obtener liberación retardada por bolsas multicompartimento con compartimentos diferentes, donde los compartimentos se han hecho a partir de películas que tienen solubilidad diferente se muestran en la US 6.727.215.

Surfactantes

[0063] La composición de detergente puede comprender uno o varios surfactantes, que pueden ser aniónicos y/o catiónicos y/o no iónicos y/o semipolares y/o zwitteriónicos, o una mezcla de los mismos. En una forma de realización particular, la composición de detergente incluye una mezcla de uno o varios surfactantes no iónicos y uno o más surfactantes aniónicos, pero también pueden usarse individualmente.

[0064] El surfactante(s) está típicamente presente a un nivel de aproximadamente 0,1% a 60% en peso, tal como aproximadamente 1% a aproximadamente 40%, o aproximadamente 3% a aproximadamente 20%, o aproximadamente 3% a aproximadamente 10%. El surfactante(s) se elige basado en la aplicación de limpieza deseada, e incluye cualquier surfactante(s) convencional conocido en la técnica. Cualquier surfactante conocido en la técnica para su uso en detergentes se puede utilizar.

[0065] Ejemplos no limitativos de surfactantes aniónicos incluyen sulfatos y sulfonatos, en particular, alquilbencenosulfonatos lineales (LAS), isómeros de LAS, alquilbencenosulfonatos ramificados (BABS), fenilalcanosulfonatos, alfa-olefinsulfonatos (AOS), sulfonatos de olefina, sulfonatos de alqueno, alcano-2,3-diilbis(sulfatos), hidroxialcanosulfonatos y disulfonatos, sulfatos de alquilo (AS) tal como dodecil sulfato de sodio (SDS), sulfatos de alcohol graso (FAS), sulfatos de alcohol primario (PAS), etersulfatos de alcohol (AES o AEOS o FES, también conocido como etoxisulfatos alcohólicos o sulfatos de éter de alcohol graso, incluyendo lauril éter sulfato de sodio (SLES), jabones o ácidos grasos; alcanosulfonatos secundarios (SAS), sulfonatos de parafina (PS), sulfonatos de éster, ésteres de glicerol de ácido graso sulfonatado, ésteres de metilo de ácido graso alfa-sulfo (alfa-SFMe o SES) incluyendo sulfonato de éster metílico (MES), ácido alquil- o alqueniilsuccínico, ácido dodecenil/tetradecenil succínico (DTSA), derivados de ácido graso de aminoácidos, diésteres y monoésteres de ácido sulfo-succínico o jabón, y combinaciones de los mismos.

[0066] Cuando está incluido en esto el detergente contendrá normalmente de aproximadamente 1% a aproximadamente 40% en peso, tal como de aproximadamente 5% a aproximadamente 30%, incluyendo de aproximadamente 5% a aproximadamente 15%, o de aproximadamente 20% a aproximadamente 25% de un surfactante aniónico.

[0067] Ejemplos no limitativos de surfactantes no iónicos incluyen alcohol etoxilatos (AE o AEO), propoxilatos alcohólicos, alcoholes grasos propoxilados (PFA), ésteres alquílicos de ácido graso alcoxilado, tales como ésteres alquílicos de ácido graso etoxilado y/o propoxilado, etoxilatos de alquilfenol (APE), etoxilatos de nonilfenol (NPE), alquilpoliglucósidos (APG), aminos alcoxilados, monoetanolamidas de ácido graso (FAM), dietanolamidas de ácido graso (FadA), monoetanolamidas de ácido graso etoxilado (EFAM), monoetanolamida de ácido graso propoxilado (PFAM), amidas de ácido graso de polihidroxi alquilo, o derivados de N-acilo N- alquilo de glucosamina (glucamidas, GA, o glucamida de ácido graso, FAGA), al igual que productos disponibles bajo los nombres comerciales SPAN y TWEEN, y combinaciones de los mismos.

[0068] Cuando está incluido en esto, el detergente contendrá normalmente de aproximadamente 0,2% a aproximadamente 40% en peso de un surfactante no iónico, por ejemplo de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 30%, en particular de aproximadamente 1% a aproximadamente 20%, de aproximadamente 3% a aproximadamente 10%, tal como de aproximadamente 3% a aproximadamente 5%, o de aproximadamente 8% a aproximadamente 12%.

Constructores

[0069] La composición de detergente puede contener aproximadamente 0-65% en peso de un constructor de detergente o co-constructor, o una mezcla de los mismos. En un detergente de lavavajillas, el nivel de constructor es típicamente 40-65%, particularmente 50-65%. El constructor y/o co-constructor puede particularmente ser un agente quelante que forme complejos hidrosolubles con Ca y Mg. Cualquier constructor y/o co-constructor conocido en la técnica para su uso en los detergentes de lavado de ropa se puede utilizar. Ejemplos no limitativos de constructores incluyen zeolitas, difosfatos (pifosfatos), trifosfatos tales como trifosfato de sodio (STP o STPP), ácido nitrilotriacético, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético, ácido alquil- o alqueniilsuccínico, carbonatos tales como carbonato de sodio, silicatos solubles tales como metasilicato de sodio, silicatos estratificados (por ejemplo, SKS-6 de Hoechst), etanolaminas tales como 2-aminoetan-1-ol (MEA), iminodietanol (DEA) y 2,2',2"-nitrilotrietanol (TEA), y carboximetilululina (CMI), y combinaciones de los mismos.

[0070] El constructor puede ser un constructor fuerte tal como ácido metil-glicina-diacético ("MGDA") o sal tetrasódica de ácido N,N-dicarboximetil glutámico (GLDA); puede ser un constructor medio tal como tri-poli-fosfato de sodio (STPP), o puede ser un constructor débil tal como citrato sódico.

Sistema blanqueante

[0071] La composición de detergente puede contener 0-50% en peso de un sistema blanqueante. Cualquier sistema blanqueante conocido en la técnica para su uso en los detergentes de lavado de ropa se puede utilizar. Componentes de sistema blanqueante adecuados incluyen catalizadores de blanqueo, fotoblanqueadores, activadores de blanqueador, fuentes de peróxido de hidrógeno tales como percarbonato de sodio y perboratos de sodio, perácidos preformados y sus mezclas derivadas. Los perácidos preformados adecuados incluyen, pero de forma no limitativa, ácidos peroxycarboxílicos y sales, ácidos percarbónicos y sales, ácidos perimidícos y sales, ácidos peroximonosulfúricos y sales, por ejemplo, oxona (R), y sus mezclas derivadas. Ejemplos no limitativos de sistemas blanqueantes incluyen sistemas blanqueantes basados en peróxido, que pueden comprender, por ejemplo, una sal inorgánica, incluyendo sales de metal alcalino tales como sales de sodio de perborato (normalmente mono- o tetrahidrato), percarbonato, persulfato, perfosfato, sales de persulfato, en combinación con un activador blanqueante de formación de perácido. Por activador blanqueante se entiende aquí un compuesto que reacciona con el blanqueador de peróxido tipo peróxido de hidrógeno para formar un perácido. El perácido formado de este modo constituye el blanqueador activado. Activadores de blanqueador adecuados para su uso aquí incluyen aquellos de la clase de amidas, imidas o anhídridos de ésteres, ejemplos adecuados son tetracetiloatilenodiamina (TAED), sodio 3,5,5 trimetil hexanoiloxibenceno sulfonato, ácido dodecanoico de diperóxido, 4-(dodecanoiloxi)bencenosulfonato (LOBS), 4-(decanoiloxi)bencenosulfonato, 4-(decanoiloxi)benzoato (DOBS), 4-(3,5,5- trimetilhexanoiloxi)bencenosulfonato (ISONOBS), tetraacetiletilenodiamina (TAED) y 4-(nonanoiloxi)bencenosulfonato (NOBS), y/o aquellos descritos en la WO98/17767. Una familia particular de activadores de blanqueador de interés fue descrita en la EP624154 y se prefiere particularmente en esa familia el acetil trietil citrato (ATC). ATC o un triglicérido de cadena corta como Triacin tiene la ventaja de que es respetuoso con el medioambiente ya que se degrada en ácido cítrico y alcohol. Además, el acetil trietil citrato y la triacetina tiene una buena estabilidad hidrolítica en el producto tras almacenamiento y es un activador blanqueante eficaz. Por último, el ATC proporciona una buena capacidad de construcción al aditivo de lavado de ropa. Alternativamente, el sistema blanqueante puede comprender peroxiácidos del tipo, por ejemplo, amida, imida o sulfona. El sistema blanqueante también puede comprender perácidos tales como ácido 6-(ftaloilamino)percaprónico (PAP). El sistema blanqueante también puede incluir un catalizador de blanqueador.

[0072] Otros ingredientes de la composición de detergente, que son bien conocido en la técnica, incluyen hidrotropos, agentes de matizado de tejido, agentes anti-espumado, polímeros de liberación de suciedad, agentes antireposición, etc.

Métodos y composiciones

[0073] En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición, que comprende una subtilisina y un aducto de hidrosulfito de péptido aldehído que tiene la fórmula $X-B^1-NH-CHR-CHOH-SO_3M$, donde:

a) M es H (hidrógeno) o un metal alcalino;

b) R es un grupo de manera que $NH-CHR-CO$ es un residuo de L o D-aminoácido;

c) B^1 es un residuo de aminoácido; y

d) X consiste en uno o más residuos de aminoácidos, opcionalmente que incluyen un grupo de protección N-terminal.

[0074] En una forma de realización, R es un grupo tal que $NH-CHR-CO$ es un residuo de L o D-aminoácido de Tyr, m-tirosina, 3,4-dihidroxifenilalanina, Phe, Val, Met, Nva, Leu, Ile o Nle.

[0075] En una forma de realización, B^1 es un residuo de Ala, Cys, Gly, Pro, Ser, Thr, Val, Nva o Nle.

[0076] En una forma de realización, X es B^2 , B^3-B^2 , $Z-B^2$ o $Z-B^3-B^2$, donde B^2 y B^3 cada uno representa un residuo de aminoácido, y Z es un grupo de protección N-terminal. Preferiblemente, B^2 es un residuo de Val, Gly, Ala, Arg, Leu, Phe o Thr. Preferiblemente, B^3 es un residuo de Phe, Tyr, Trp, fenilglicina, Leu, Val, Nva, Nle o Ile.

[0077] En una forma de realización, Z es benciloxicarbonilo (Cbz), p-metoxibencilo carbonilo (MOZ), bencilo (Bn), benzoilo (Bz), p-metoxibencilo (PMB), p-metoxifenilo (PMP), formilo, acetilo (Ac), metiloxi, o metiloxicarbonilo.

[0078] En una forma de realización, la composición está en forma líquida o granulosa. Preferiblemente, la composición es un detergente que comprende además un surfactante.

[0079] En una forma de realización, la composición comprende además una segunda enzima, particularmente una lipasa, una cutinasa, una amilasa, una carbohidrasa, una celulasa, una pectinasa, una pectato liasa, una mananasa, una arabinasa, una galactanasa, una xilanasas, una oxidasa, una lacasa o una peroxidasa.

[0080] En otro aspecto, la invención proporciona un método de preparación de la composición de la invención, como se ha descrito anteriormente, este método comprende mezcla de una subtilisina, una solución acuosa que comprende un aducto de hidrosulfito de péptido aldehído con la fórmula $X-B^1-NH-CHR-CHOH-SO_3M$, como se ha descrito anteriormente, y opcionalmente un surfactante.

[0081] En otro aspecto, la invención proporciona un compuesto para su uso en la composición de la invención, este compuesto es un aducto de hidrosulfito de péptido aldehído con la fórmula $X-B^1-NH-CHR-CHOH-SO_3M$, donde M y X se definen como se ha descrito anteriormente, B^1 es un residuo de aminoácido que es diferente de prolina (Pro), y R es un grupo de manera que $NH-CHR-CO$ es un residuo de L o D-aminoácido de Tyr, m-tirosina, 3,4-dihidroxifenilalanina, Phe, Val, Met, Nva o Nle.

[0082] En una forma de realización, el compuesto es Cbz-RA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-GA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-GA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-GG-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-RV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-LV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-LGA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-FGA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-YGA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-FGV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H o Ac-WLV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, donde Ac es acetilo y Cbz es benciloxicarbonilo.

[0083] En otro aspecto, la invención proporciona un compuesto para su uso en la composición de la invención, este compuesto es un aducto de hidrosulfito de péptido aldehído con la fórmula $X-B^1-NH-CHR-CHOH-SO_3M$, donde M, R y X se definen como se ha descrito anteriormente, y donde B^1 es un residuo de aminoácido de alanina (Ala), cisteína (Cys), glicina (Gly), serina (Ser), treonina (Thr), valina (Val), norvalina (Nva) y norleucina (Nle).

[0084] En una forma de realización, el compuesto es Cbz-GA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-GA-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-GA-NHCH(CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-GG-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-FGA-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-FGA-NHCH(CH₂CH₂SCH₃)(SO₃M)-H, MeO-CO-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, MeNCO-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, MeO-CO-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)-C(OH)(SO₃M)-H, MeO-CO-FGA-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H, MeSO₂-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, MeSO₂-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, PhCH₂O(OH)(O)P-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, EtSO₂-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, PhCH₂SO₂-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, PhCH₂O(OH)(O)P-LA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, PhCH₂O(OH)(O)P-FA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H y MeO(OH)(O)P-LGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)-C(OH)(SO₃M)-H, donde Ac es acetilo y Cbz es benciloxicarbonilo.

5 [0085] En otro aspecto, la invención proporciona un compuesto para su uso en la composición de la invención, este compuesto es un aducto de hidrosulfito de péptido aldehído con la fórmula $X-B^1-NH-CHR-CHOH-SO_3M$; donde R y M se definen como se ha descrito anteriormente; B^1 representa un residuo de aminoácido que es diferente de prolina (Pro); X es B^2 , B^3-B^2 , $Z-B^2$, $Z-B^3-B^2$, donde B^3 y B^2 cada uno representa un residuo de aminoácido, y Z es un grupo de protección N-terminal; y donde B^2 es Gly, Thr o Val.

10 [0086] En otro aspecto, la invención proporciona un compuesto para su uso en la composición de la invención, este compuesto es un aducto de hidrosulfito de péptido aldehído con la fórmula $X-B^1-NH-CHR-CHOH-SO_3M$; donde R y M se definen como se ha descrito anteriormente; B^1 representa un residuo de aminoácido que es diferente de prolina (Pro); X es B^3-B^2 , $Z-B^3-B^2$, donde B^3 y B^2 cada uno representa un residuo de aminoácido, y Z es un grupo de protección N-terminal; y donde B^3 es Phe, Tyr, Trp, fenilglicina, Leu, Val, Nva, Nle o Ile.

15 Ejemplos

[0087] Los productos químicos usados como tampones y sustratos fueron productos comerciales de al menos calidad reactiva.

20 Ejemplo 1

Preparación de un aducto de hidrosulfito de un péptido aldehído

25 [0088] Un péptido aldehído con la fórmula $X-B^1-B^0-H$, como se ha descrito anteriormente, se convierte en el aducto bisulfito correspondiente. A una suspensión agitada de 1 mmol $X-B^1-B^0-H$ en 8 ml de acetato de etilo a temperatura ambiente se añade gota a gota 1,06 mmol de bisulfito sódico (114 mg) en 6 ml de agua y luego la reacción se agita durante 2 horas. La fase acuosa se aísla y la capa orgánica se lava con 2 x 2 ml de agua. Las fases acuosas combinadas son liofilizadas dando $X-B^1-NH-CHR-CHOH-SO_3Na$ (rendimiento predicho 66%) como un polvo blanco.

30 Ejemplo 2

Preparación de una formulación líquida de un aducto de hidrosulfito de péptido aldehído.

35 [0089] 4 mmol de $X-B^1-NH-CHR-CHOH-SO_3Na$ sólido se disuelve en 6 g de agua desmineralizada y agitada durante 30 min a 35°C y posteriormente enfriada dando un 25% de solución acuosa de $X-B^1-NH-CHR-CHOH-SO_3Na$. Alternativamente, la fase acuosa como la síntesis anterior podría usarse fácilmente para estabilizar la enzima en el siguiente paso y esta solución es aprox. 3% (en peso).

Ejemplo 3

40 Preparación de una formulación de subtilisina estabilizada que comprende subtilisina y aducto de hidrosulfito de péptido aldehído.

45 [0090] A un Savinase 16L™ (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) disponible comercialmente se añade 0,9% de $X-B^1-NH-CHR-CHOH-SO_3Na$ usando 3,6% del anterior 25% de solución acuosa.

Ejemplo 4

Estabilización de subtilisina por aducto de hidrosulfito

50 [0091] Detalles experimentales generales: detergentes con una subtilisina (Savinase 16L) y una lipasa (Lipex 100L) con o sin $X-B^1-NH-CHR-CHOH-SO_3Na$ (el aducto de hidrosulfito de péptido aldehído se puede añadir separadamente al detergente que contiene la subtilisina) se colocan en cristales cerrados a -18°C; 35°C y 40°C. Actividades residuales de proteasa y lipasa se miden después de diferentes tiempos usando métodos analíticos estándar (proteasa por hidrólisis de N,N-dimetilcaseína a 40°C, pH 8,3 y lipasa por hidrólisis de pNp-valerato a 40°C, pH 7,7). Ensayos similares se pueden hacer con adición de subtilisina a un detergente que ya contiene cantidades adecuadas del aducto de hidrosulfito de péptido aldehído. Resultados similares se pueden obtener con todos los aductos de bisulfito de péptido aldehído mencionados.

60 [0092] Como un ejemplo de composición de detergente con una formulación de subtilisina estabilizada, se hizo la composición descrita en tabla 1.

Tabla 1. Composición de detergente.

Componente	% (en peso)
Sodio alquiletoxi sulfato (C9-15, 2EO)	6,0
Sodio dodecil benceno sulfonato	3,0
Sodio tolueno sulfonato	3,0
Ácido oleico	2,0
Etoxilato de alcohol primario (C12-15, 7EO)	3,0
Etoxilato de alcohol primario (C12-15, 3EO)	2,5
Etanol	0,5
Monopropilenglicol	2,0
Tri-sodio citrato 2H ₂ O	4,0
Trietanolamina	0,4
pH ajustado a 8,5 con NaOH	
Formulación de Savinase estabilizada con X-B ¹ -NH-CHR-CHOH-SO ₃ Na; o Savinase 16L para comparación	0,5
Lipex 100L™ (disponible de Novozymes A/S)	0,5
Agua	hasta 100%

5

[0093] En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos con X= Cbz-Gly; B¹= Ala; R=-CH₂-p(C₆H₄)-OH; estabilidad medida después de una semana de incubación a 40°C en el detergente descrito en la tabla 1.

10

Tabla 2. Actividad de proteasa restante después de incubación de una semana a 40°C en el detergente descrito en la tabla 1.

Cantidad de inhibidor añadida al detergente	Estabilidad de proteasa (actividad restante)
ninguna	12%
7 ppm	52%
14 ppm	77%
18 ppm	80%

15

[0094] Los resultados demuestran estabilización de la subtilisina por la adición de un aducto de hidrosulfito de un péptido aldehído.

Ejemplo 5

Estabilización de subtilisina y lipasa

20

[0095] Como un ejemplo de una composición de detergente con una formulación de subtilisina estabilizada, se hizo la composición descrita en la tabla 3.

Tabla 3. Composición de detergente.

Componente	% (peso)
Sodio dodecil benceno sulfonato	6,0
NaOH	1,4
Ácido graso de soja (Edenor SJ)	3,0
Ácido graso de coco (Radiacid 0631)	2,5
Etoxilato de alcohol primario (C13, 8EO)	5,0
Etanol	5,0
Monopropilenglicol	5,0
Tri-sodio citrato 2H ₂ O	0,5
Trietanol amina	2,0
Fosfonato-Dequest 2066 C2	3,0

pH ajustado a 8,4 con NaOH adicional si es necesario	
Subtilisina: Savinase, estabilizado con X-B ¹ -NH-CHR-CHOH-SO ₃ Na; o con ácido 4-formilfenil borónico; o con estabilizador para comparación	0,75
Lipasa: Lipex 100L™ (disponible de Novozymes A/S)	0,15
Agua	hasta 100%

[0096] En la tabla 4 se muestran los resultados medidos después de dos semanas de incubación a 35°C en el detergente descrito en la tabla 3.

5

Tabla 4. Actividad restante de subtilisina (proteasa) y lipasa después de 2 semanas de incubación a 35°C en el detergente descrito en la tabla 3.

Inhibidor	Inhibidor en detergente	Subtilisina	Lipasa
ninguno	-	2%	1%
ácido 4-formilfenil borónico (técnica anterior)	128 ppm	8%	2%
X = Cbz-Gly; B ¹ = Ala R = -CH ₂ -p(C ₆ H ₄)-OH	21 ppm	63%	18%

10

[0097] Los resultados demuestran que la adición de un aducto de hidrosulfito de un péptido aldehído puede estabilizar la subtilisina y la segunda enzima (lipasa), y que es mucho más eficaz que el estabilizador del estado de la técnica.

Ejemplo 6

15

Estabilización de subtilisina y lipasa

[0098] Como otro ejemplo de un detergente con una formulación de subtilisina estabilizada, se hizo la composición descrita en la tabla 5.

20

Tabla 5. Composición de detergente.

Componente	% (en peso)
Detergente no enzimático comercial. Líquido EU 2x dosificado. Comprado en el Reino Unido, 2009	98,2
Subtilisina	1,4
Lipasa: Lipoclean 2000L (disponible de Novozymes A/S)	0,4

25

[0099] En la tabla 6 se muestran los resultados medidos después de 4 semanas de incubación a 37°C, y después de 8 semanas de incubación a 30°C, en el detergente descrito en la tabla 5.

Tabla 6. Actividad restante de subtilisina (proteasa) y lipasa después de 4 semanas de incubación a 37°C, o después de 8 semanas de incubación a 30°C en el detergente descrito en la tabla 5.

30

Inhibidor	Subtilisina	Cantidad of inhibidor añadida al detergente	Subtilisina	Lipasa
			4 semanas a 37°C	8 semanas a 30°C
ninguno	Coronase 48L	0	69%	28%
X = Cbz-Gly; B ¹ = Ala R = -CH ₂ -p(C ₆ H ₄)- OH	Coronase 48L	59 ppm	80%	61%
ninguno	Liquanase 2,5L	0	43%	0%
X = Cbz-Gly; B ¹ = Ala; R = -CH ₂ -p(C ₆ H ₄)- OH	Liquanase 2,5L	34 ppm	83%	27%

[0100] Los resultados confirman que la adición de un aducto de hidrosulfito de un péptido aldehído puede estabilizar la subtilisina y la segunda enzima (lipasa) para varias subtilisinas.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende una subtilisina y un aducto de hidrosulfito de péptido aldehído con la fórmula $X-B^1-NH-CHR-CHOH-SO_3M$, donde:
- 5 A) M es H (hidrógeno) o un metal alcalino;
 B) R es un grupo de manera que $NH-CHR-CO$ es un residuo de L o D-aminoácido;
 C) B^1 es un residuo de aminoácido; y
 D) X consiste en uno o más residuos de aminoácidos, que comprenden opcionalmente un grupo de protección N-terminal.
- 10 2. Composición según la reivindicación precedente, donde R es un grupo de manera que $NH-CHR-CO$ es un residuo de L o D-aminoácido de Tyr, m-tirosina, 3,4-dihidroxifenilalanina, Phe, Val, Met, Nva, Leu, Ile o Nle.
- 15 3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde B^1 es un residuo de Ala, Cys, Gly, Pro, Ser, Thr, Val, Nva o Nle.
4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde X es B^2 , B^3-B^2 , $Z-B^2$ o $Z-B^3-B^2$, donde B^2 y B^3 cada uno representa un residuo de aminoácido, y Z es un grupo de protección N-terminal.
- 20 5. Composición según la reivindicación precedente, donde B^2 es un residuo de Val, Gly, Ala, Arg, Leu, Phe o Thr.
6. Composición según la reivindicación 4, donde B^3 es un residuo de Phe, Tyr, Trp, fenilglicina, Leu, Val, Nva, Nle o Ile.
- 25 7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde Z es benciloxicarbonilo (Cbz), p-metoxibencilocarbonilo (MOZ), bencilo (Bn), benzoilo (Bz), p-metoxibencilo (PMB), p-metoxifenilo (PMP), formilo, acetilo (Ac), metiloxi o metiloxicarbonilo.
8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que está en forma líquida o granulosa.
- 30 9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que es un detergente que comprende además un surfactante.
- 35 10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende además una segunda enzima, particularmente una lipasa, una cutinasa, una amilasa, una carbohidrasa, una celulasa, una pectinasa, una pectato liasa, una mananasa, una arabinasa, una galactanasa, una xilanasa, una oxidasa, una lacasa o una peroxidasa.
- 40 11. Método para preparar la composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, dicho método comprende la mezcla de una subtilisina, una solución acuosa que comprende un aducto de hidrosulfito de péptido aldehído que tiene la fórmula $X-B^1-NH-CHR-CHOH-SO_3M$, donde M, R, B^1 y X se definen como en la reivindicación 1, y opcionalmente un surfactante.
- 45 12. Compuesto para su uso en la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, este compuesto es un aducto de hidrosulfito de péptido aldehído que tiene la fórmula $X-B^1-NH-CHR-CHOH-SO_3M$, donde M y X se definen como en la reivindicación 1, B^1 es un residuo de aminoácido que es diferente de prolina (Pro), y R es un grupo de manera que $NH-CHR-CO$ es un residuo de L o D-aminoácido de Tyr, m-tirosina, 3,4-dihidroxifenilalanina, Phe, Val, Met, Nva o Nle.
- 50 13. Compuesto según la reivindicación 12, que es Cbz-RA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-GA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-GA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-GG-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-RV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-LV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-LGA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-FGA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-YGA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-FGV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H o Ac-WLV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, donde Ac es acetilo y Cbz es benciloxicarbonilo.
- 55 14. Compuesto para su uso en la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, este compuesto es un aducto de hidrosulfito de péptido aldehído que tiene la fórmula $X-B^1-NH-CHR-CHOH-SO_3M$, donde M, R y X se definen como en la reivindicación 1, y donde B^1 es un residuo de aminoácido de alanina (Ala), cisteína (Cys), glicina (Gly), serina (Ser), treonina (Thr), valina (Val), norvalina (Nva) y norleucina (Nle).
- 60 15. Compuesto de la reivindicación 14, que es Cbz-GA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-GA-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-GA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-GG-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-FGA-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-FGA-NHCH(CH₂CH₂SCH₃)(SO₃M)-H, MeO-CO-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, MeNCO-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, MeO-CO-

5 FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)-C(OH)(SO₃M)-H, MeO-CO-FGA-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H, MeSO₂-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, MeSO₂-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, PhCH₂O(OH)(O)P-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, EtSO₂-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, PhCH₂SO₂-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, PhCH₂O(OH)(O)P-LA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, PhCH₂O(OH)(O)P-FA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H y MeO(OH)(O)P-LGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)-C(OH)(SO₃M)-H, donde Ac es acetilo y Cbz es benciloxicarbonilo.

10 16. Compuesto para su uso en la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, este compuesto es un aducto de hidrosulfito de péptido aldehído que tiene la fórmula X-B¹-NH-CHR-CHOH-SO₃M; donde R y M se definen como en la reivindicación 1; B¹ representa un residuo de aminoácido que es diferente de prolina (Pro); X es B², B³-B², Z-B², Z-B³-B², donde B³ y B² cada uno representa un residuo de aminoácido, y Z es un grupo de protección N-terminal; y donde B² es Gly, Thr o Val.

15 17. Compuesto para su uso en la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, este compuesto es un aducto de hidrosulfito de péptido aldehído que tiene la fórmula X-B¹-NH-CHR-CHOH-SO₃M; donde R y M se definen como en la reivindicación 1; B¹ representa un residuo de aminoácido que es diferente de prolina (Pro); X es B³-B², Z-B³-B², donde B³ y B² cada uno representa un residuo de aminoácido, y Z es un grupo de protección N-terminal; y donde B³ es Phe, Tyr, Trp, fenilglicina, Leu, Val, Nva, Nle o Ile.