

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 354**

51 Int. Cl.:

C12N 9/54

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.04.2011** **PCT/US2011/032050**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2011** **WO11130222**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2011** **E 11727564 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017** **EP 2558573**

54 Título: **Composiciones y métodos que comprenden variantes de proteasas**

30 Prioridad:

15.04.2010 US 324534 P

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

19.07.2017

73 Titular/es:

**DANISCO US INC. (100.0%)
925 Page Mill Road
Palo Alto, CA 94304, US**

72 Inventor/es:

**BOTT, RICHARD, R.;
CASCAO-PEREIRA, LUIS, G.;
ESTELL, DAVID, A.;
GOEDEGEBUUR, FRITS y
POULOSE, AYROOKARAN, JOSEPH**

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 625 354 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

Composiciones y métodos que comprenden variantes de proteasas

CAMPO DE LA INVENCIÓN

- 5 **[0001]** La presente invención proporciona variantes de proteasas que son útiles para aplicaciones de limpieza y en métodos de limpieza. En un aspecto, la presente invención proporciona variantes de proteasas, entre las que se incluyen polipéptidos de variantes de subtilisinas de *Bacillus sp.*, y composiciones de limpieza que comprenden una o más de dichas variantes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

- 10 **[0002]** Las serina proteasas son un subgrupo de carbonil hidrolasas que comprenden una diversa clase de enzimas que tienen una amplia variedad de especificidades y funciones biológicas (véase, p. ej., Stroud, Sci. Amer. 131:74-88). Se han investigado en gran medida las serina proteasas (p. ej., las subtilisinas), debido principalmente a su utilidad en aplicaciones de limpieza y alimentación.

- 15 **[0003]** El documento WO 2008/112258 describe proteasas modificadas y un método para alterar la expresión de proteasas en microorganismos. El documento WO 02/077187 describe proteínas, incluidas las subtilisina proteasas, que producen una respuesta inmunogénica alterada. El documento WO 2010/123754 describe proteasas con prorreiones modificadas y métodos para potenciar la producción de proteasas maduras en células huésped bacterianas. El documento WO 2010/056640 describe variantes de serina proteasas y composiciones de limpieza que comprenden las variantes de serina proteasas.

- 20 **[0004]** Aunque se ha desarrollado un número de variantes de proteasas útiles para abordar necesidades relacionadas con estas aplicaciones, todavía se necesitan nuevas proteasas y variantes de proteasas mejoradas para usos variados.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

- 25 **[0005]** En un aspecto, la invención proporciona una variante de proteasa aislada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, comprendiendo dicha secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa una sustitución de cada residuo de aminoácido en las posiciones 76, 87, 118, 128, 129, 130, 188 y 244 de SEQ ID NO:1 con un residuo de aminoácido diferente para producir una variante de proteasa que tiene una carga global de -2, -1, 0, +1, +2, +3 o +4, donde:

- 30 (i) el residuo de aminoácido en cada una de las posiciones 76 y 188 se sustituye con un residuo de aminoácido de carga negativa seleccionado del grupo que consta de ácido aspártico y ácido glutámico;
 (ii) el residuo de aminoácido en cada una de las posiciones 87, 118 y 244 se sustituye con un residuo de aminoácido de carga positiva seleccionado del grupo que consta de arginina, histidina y lisina; y
 (iii) el residuo de aminoácido en cada una de las posiciones 128, 129 y 130 se sustituye con un residuo de aminoácido neutro seleccionado del grupo que consta de serina, treonina, asparagina, glutamina, alanina,
 35 isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, tirosina y valina;

y donde cada posición de aminoácido se numera según la numeración de la posición de aminoácido correspondiente en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en SEQ ID NO:2, según lo determinado por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

- 40 **[0006]** En algunos casos, la secuencia de aminoácidos de dicha variante de proteasa comprende las sustituciones de aminoácidos N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+V244R. En concreto, la variante de proteasa puede comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:8.

- 45 **[0007]** En algunos casos, la variante de proteasa aislada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, comprendiendo dicha secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa una sustitución del residuo de aminoácido en cada una de las posiciones de aminoácido 76, 87, 118, 128, 129 y 130 en relación con SEQ ID NO:1 con un residuo de aminoácido diferente para producir una variante de proteasa que tiene una carga global de -2, -1, 0, +1, +2, +3 o +4, donde:

- 50 (i) el residuo de aminoácido en la posición 76 se sustituye con un residuo de aminoácido de carga negativa seleccionado del grupo que consta de ácido aspártico y ácido glutámico,
 (ii) el residuo de aminoácido en cada una de las posiciones 87 y 118 se sustituye con un residuo de aminoácido de carga positiva seleccionado del grupo que consta de arginina, histidina y lisina, y
 (iii) el residuo de aminoácido en cada una de las posiciones 128, 129 y 130 se sustituye con un residuo de aminoácido sin carga seleccionado del grupo que consta de serina, treonina, asparagina, glutamina,
 55 alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, tirosina y valina, y donde dicha variante de proteasa comprende también

- (iv) un residuo de serina en la posición de aminoácido 188 o una sustitución del residuo de serina en la posición 188 con un residuo de aminoácido diferente que es o no es un residuo de ácido aspártico, y/o
- (v) un residuo de asparagina en la posición de aminoácido 248 o una sustitución del residuo de asparagina en la posición 248 con un residuo de aminoácido diferente que es o no es un residuo de arginina,

5

y donde las posiciones de aminoácido se numeran según la numeración de las posiciones de aminoácido correspondientes en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en SEQ ID NO:2, según lo determinado por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

- 10 **[0008]** En algunos casos, la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa comprende un residuo de serina en la posición de aminoácido 188 y/o un residuo de arginina en la posición de aminoácido 248.

[0009] En determinados casos, la variante de proteasa tiene una carga global de +1.

- 15 **[0010]** En algunos casos, la secuencia de aminoácidos de dicha variante de proteasa comprende las sustituciones de aminoácidos N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A. En concreto, la variante de proteasa puede comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:7.

[0011] En algunos casos, la variante de proteasa comprende uno de los siguientes conjuntos de sustituciones de aminoácidos en relación con SEQ ID NO:1:

- 20 (i) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A, con la condición de que dicha variante de proteasa no comprenda N248R+S188D, o
(ii) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+V244R.

[0012] En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende al menos una variante de proteasa del primer aspecto de la invención. En algunos casos, la composición es una composición de limpieza y/o detergente.

- 25 **[0013]** En algunos casos, la composición de limpieza es una composición de limpieza para la colada o una composición detergente para la colada, respectivamente.

[0014] En algunos casos, la composición de limpieza es una composición detergente para el lavado de la vajilla, opcionalmente una composición detergente para el lavado de la vajilla de forma automática o una composición detergente para el lavado de la vajilla a mano.

[0015] En algunos casos, la composición de limpieza es una composición detergente líquida.

- 30 **[0016]** En algunos casos, la composición de limpieza es una composición detergente en forma de gel, pastilla, polvo, sólida o granulada.

[0017] En algunos casos, la composición de limpieza no contiene fosfato;

[0018] En algunos casos, la composición es una composición de limpieza para la colada líquida o una composición de limpieza para la colada en polvo.

- 35 **[0019]** En algunos casos, la composición es una composición de limpieza potenciadora para colada, una composición de limpieza para colada aditiva, o una composición de limpieza de pretratamiento para colada.

[0020] En algunos casos, la composición es una composición de limpieza de lentes de contacto.

[0021] En algunos casos, la composición no es una composición para el lavado de la vajilla de forma automática.

- 40 **[0022]** En algunos casos, la composición de la invención comprende al menos una enzima adicional, opcionalmente donde la al menos una enzima adicional, opcionalmente dos o más enzimas adicionales, se selecciona(n) del grupo que consta de hemicelulasa, celulasa, amilasa, peroxidasa, proteasa, xilanas, lipasa, fosfolipasa, esterasa, cutinasa, pectinasa, pectato liasa, mananasa, queratinasa, reductasa, oxidasa, fenoloxidasa, lipoxigenasa, ligninasa, pululanasa, tanasa, pentosanasa, malanasa, β -glucanasa, arabinosidasa, hialuronidasa, condroitinasa y lacasa.

- 45 **[0023]** En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método para limpiar un artículo o una superficie que necesite limpiarse, comprendiendo el método el contacto del artículo o de la superficie con una variante de proteasa del primer aspecto de la invención o una composición del segundo aspecto de la invención, opcionalmente donde el método comprende también enjuagar el artículo o la superficie con agua.

- 50 **[0024]** En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la variante de proteasa del primer aspecto de la invención.

[0025] En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende al menos un ácido nucleico del cuarto aspecto de la invención, opcionalmente donde el al menos un ácido nucleico se encuentra ligado de forma operativa a un promotor.

[0026] En un sexto aspecto, la presente invención proporciona una célula huésped recombinante que comprende el vector de expresión del quinto aspecto de la invención o el ácido nucleico del cuarto aspecto de la invención o la variante de proteasa del primer aspecto de la invención, opcionalmente donde:

- 5 la célula huésped es una célula bacteriana;
 la célula huésped es una célula de *Bacillus*; o
 la célula huésped es una célula de *Bacillus subtilis*.

[0027] En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una variante de proteasa, comprendiendo el método el cultivo de la célula huésped recombinante del sexto aspecto de la invención en condiciones propicias para la producción de la variante de proteasa, comprendiendo el método
 10 opcionalmente también la recuperación de la variante de proteasa del cultivo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0028]

15 La figura 1 presenta un alineamiento de la secuencia de aminoácidos madura de la subtilisina GG36 de *B. lentus*, la secuencia de aminoácidos madura de la subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens*, y las secuencias de aminoácidos de los ejemplos de polipéptidos de variantes de proteasas de la invención designados como PX3, PX4 y PX5, respectivamente.

La figura 2 proporciona un mapa de plásmido del plásmido de expresión pHPLT-GG36 de *B. subtilis*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0029] La presente invención proporciona variantes de proteasas, tal como se encuentran definidas en las reivindicaciones, que son especialmente adecuadas y útiles para una variedad de aplicaciones de limpieza. En un aspecto, la invención incluye composiciones que comprenden al menos una de las variantes de proteasas (p. ej., variantes de subtilisinas) expuestas en el presente documento. Algunas de dichas composiciones comprenden composiciones detergentes. En un aspecto, la invención proporciona variantes de subtilisinas de especies de *Bacillus* y composiciones que comprenden una o más de dichas variantes de subtilisinas. La
 20 invención también proporciona composiciones enzimáticas, según se define en las reivindicaciones, que tienen una eficacia de lavado comparable o mejorada en comparación con las proteasas conocidas, como, p. ej., las serina proteasas y/o las subtilisina proteasas conocidas.

[0030] Salvo se indique de otro modo, la práctica de la presente invención conlleva técnicas convencionales utilizadas comúnmente en biología molecular, microbiología, purificación de proteínas, ingeniería de proteínas, secuenciación de proteínas y ADN, campos de ADN recombinante, y utilización y desarrollo de enzimas
 30 industriales, todos los cuales se encuentran en el ámbito de especialización.

[0031] Asimismo, los encabezados proporcionados en la presente memoria no constituyen limitaciones a los diversos aspectos o formas de realización de la invención, que pueden tomarse por referencia a la memoria en su conjunto. Por consiguiente, los términos que se definen inmediatamente a continuación se definen de forma
 35 más completa con referencia a la memoria en su conjunto. No obstante, con el fin de facilitar la comprensión de la invención, posteriormente se proporcionan definiciones para un número de términos.

[0032] Salvo que se defina de otro modo en el presente texto, todos los términos técnicos y científicos tienen en el presente texto el mismo significado que el que entienden comúnmente los expertos en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica de la presente exposición se pueden utilizar muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, aquí se describen algunos métodos y materiales. Por consiguiente, los términos que se definen inmediatamente a continuación se describen de forma más completa con referencia a la memoria en su conjunto. Asimismo, en el sentido en que se usan en la presente memoria, los términos singulares «un», «una», «el» y «la» incluyen la referencia al plural salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Salvo que se indique de otro modo, los ácidos nucleicos están escritos de izquierda a derecha en una orientación de 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos están escritas de izquierda a
 40 derecha en una orientación de amino a carboxi, respectivamente. Ha de entenderse que la presente invención no se limita a la metodología, los protocolos y los reactivos específicos aquí descritos, dado que estos pueden variar dependiendo del contexto en el que los utilizan los expertos en la materia.

[0033] Se pretende que cada limitación numérica máxima proporcionada a lo largo de la presente memoria incluya cada limitación numérica inferior, como si dichas limitaciones numéricas inferiores se encontrasen expresamente escritas en el presente documento. Todo límite numérico mínimo dado a lo largo de esta memoria incluirá todo límite numérico superior, como si dichos límites numéricos superiores estuvieran escritos expresamente en el presente texto. Todo intervalo numérico dado a lo largo de esta memoria incluirá todo intervalo numérico más reducido que se encuentre dentro de dicho intervalo numérico más amplio, como si
 45 dichos intervalos numéricos más reducidos estuvieran escritos expresamente en el presente texto.

[0034] Una proteasa (también conocida como una proteinasa) es una proteína enzimática que tiene la capacidad de descomponer otras proteínas. Una proteasa tiene la capacidad de llevar a cabo la proteólisis, que da

comienzo al catabolismo proteico mediante la hidrólisis de enlaces peptídicos que unen los aminoácidos en una cadena peptídica o polipeptídica que constituye la proteína. Esta actividad de una proteasa como una enzima digestiva de proteínas se denomina actividad proteolítica. Existen muchos procedimientos ampliamente conocidos para medir la actividad proteolítica (Kalisz, "Microbial Proteinases," En: Fiechter (ed.), *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, (1988)). Por ejemplo, la actividad proteolítica puede determinarse mediante ensayos comparativos que analizan la capacidad de respectivas proteasas de hidrolizar un sustrato comercial. Los ejemplos de sustratos útiles para el análisis de la actividad de proteasa o proteolítica incluyen, sin carácter limitativo, dimetil caseína (Sigma C-9801), colágeno bovino (Sigma C-9879), elastina bovina (Sigma E-1625) y queratina bovina (ICN Biomedical 902111). Los ensayos colorimétricos que utilizan estos sustratos son ampliamente conocidos en el ámbito de especialización (véase, p.ej., WO 99/34011 y la patente de los Estados Unidos con número 6,376,450). El ensayo pNA (véase, p. ej., Del Mar et al., *Anal. Biochem.* 99:316-320 (1979)) también puede utilizarse para determinar la concentración de enzima activa para fracciones recogidas durante elución en gradiente. Este ensayo mide el índice al que se libera p-nitroanilina a medida que la enzima hidroliza el sustrato sintético soluble, succinil-alanina-alanina-prolina-fenilalanina-p-nitroanilida (suc-AAPF-pNA). El índice de producción de color amarillo a partir de la reacción de hidrólisis se mide a 410 nm en un espectrofotómetro y es proporcional a la concentración de enzima activa. Además, pueden utilizarse mediciones de absorbencia a 280 nanómetros (nm) para determinar la concentración de proteína total. La ratio de enzima activa/proteína total proporciona la pureza de la enzima.

[0035] Tal como se utilizan en el presente documento, «subtilisina» y «subtilisina proteasa» se refieren a cualquier miembro de la familia de serina proteasa S8 tal como se describe en la base de datos de peptidasas MEROPS - The Peptidase Database (Rawlings et al., MEROPS: the peptidase database, *Nucl. Acids Res.* 34 Database issue, D270-272 (2006)). Tal como se describe en dicha base de datos, la familia de peptidasas S8 contiene la subtilisina serina endopeptidasa y sus homólogos (*Biochem. J.* 290:205-218 (1993)). La familia S8, también conocida como la familia subtilasa, es la segunda familia más grande de serina peptidasas. Recientemente, se han determinado las estructuras terciarias de varios miembros de la familia S8. Una estructura de proteína S8 típica consta de tres capas con una lámina β de siete cadenas colocada entre dos capas de hélices. La subtilisina (S08.001) es la estructura tipo del clan SB (SB). A pesar de la estructura distinta, los sitios activos de subtilisina y quimotripsina (S01.001) pueden superponerse, lo que sugiere que la similitud es el resultado de una evolución convergente en lugar de divergente. Muchas especies de *Bacillus* (*Bacillus* sp.) secretan grandes cantidades de subtilisinas. Tal como se emplean en el presente documento, los términos «variante de proteasa» y «mutante de proteasa» se utilizan indistintamente en referencia a una proteasa que difiere en la secuencia de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de una proteasa de referencia (que puede ser una proteasa natural) en al menos un aminoácido, como en al menos una sustitución, delección o adición de aminoácido. La actividad proteolítica de una variante de proteasa o mutante de proteasa puede determinarse utilizando procedimientos ampliamente conocidos en el ámbito de especialización y/o descritos en el presente documento.

[0036] Tal como se emplean en el presente documento, los términos «variante de subtilisina» y «mutante de subtilisina» se utilizan indistintamente en referencia a una subtilisina proteasa que difiere en la secuencia de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de una subtilisina proteasa de referencia (que puede ser una subtilisina proteasa natural) en al menos un aminoácido, como en al menos una sustitución, delección o adición de aminoácido. La actividad proteolítica de una variante de subtilisina o mutante de subtilisina puede determinarse utilizando procedimientos ampliamente conocidos en el ámbito de especialización y/o descritos en el presente documento.

[0037] Tal como se emplea en el presente documento, el género "*Bacillus*" incluye todas las especies del género *Bacillus*, tal como los conocen los expertos en la materia, incluidos, sin carácter limitativo, p. ej., *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. clausii*, *B. halodurans*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus*, y *B. thuringiensis*. Se reconoce que el género *Bacillus* continúa siendo objeto de reorganización taxonómica. En consecuencia, se pretende que el género incluya las especies que han sido reclasificadas, entre las que se incluyen, sin carácter limitativo, organismos como *B. stearothermophilus*, ahora denominado «*Geobacillus stearothermophilus*». La producción de endosporas resistentes en presencia de oxígeno se considera un rasgo definitorio del género *Bacillus*, aunque esta característica también se aplica a los recientemente denominados *Alicyclobacillus*, *Amphibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Anoxybacillus*, *Brevibacillus*, *Filobacillus*, *Gracilibacillus*, *Halobacillus*, *Paenibacillus*, *Salibacillus*, *Thermobacillus*, *Ureibacillus*, y *Virgibacillus*.

[0038] Los términos «polinucleótido» y «ácido nucleico», que se utilizan indistintamente en el presente documento, se refieren a un polímero de cualquier longitud de monómeros nucleotídicos unidos de forma covalente en una cadena. El ADN (ácido desoxirribonucleico), un polinucleótido que comprende desoxirribonucleótidos, y el ARN, (ácido ribonucleico), un polímero de ribonucleótidos, son ejemplos de polinucleótidos o ácidos nucleicos que tienen distinta función biológica. Los polinucleótidos o los ácidos nucleicos incluyen, sin carácter limitativo, ADN monocatenario, bicatenario o tricatenario, ADN genómico, ADNc, ARN, ADN-ARN híbrido, o un polímero que comprende bases de purinas y pirimidinas, u otras bases nucleotídicas naturales, modificadas químicamente o bioquímicamente, no naturales o derivadas. A continuación se presentan

ejemplos no limitativos de polinucleótidos: genes, fragmentos de genes, fragmentos cromosómicos, marcador(es) de secuencia expresada (EST, por sus siglas en inglés), exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt), ARN ribosómico (ARNr), ribozimas, ADN complementario (ADNc), polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. En algunos modos de realización, los polinucleótidos comprenden nucleótidos modificados, como nucleótidos metilados y nucleótidos análogos, uracilo, otros azúcares y grupos de enlace como fluororribosa y tioato, y ramificaciones nucleotídicas. En un modo de realización concreto, una secuencia de nucleótidos está interrumpida por componentes no nucleotídicos.

10 **[0039]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término «vector» se refiere a un constructo de ácido nucleico o un constructo polinucleotídico utilizado para introducir o transferir ácido(s) nucleico(s) o polinucleótido(s) en un tejido o una célula diana. Normalmente se utiliza un vector para introducir ADN extraño en otro tejido o célula. Por lo general, un vector comprende una secuencia de ADN que es un transgén y una secuencia polinucleotídica mayor que sirve como «columna vertebral» del vector. El vector sirve normalmente para transferir información genética, como el transgén insertado, a un tejido o una célula diana con el fin de aislar, multiplicar o expresar el inserto en el tejido o la célula diana. Los vectores incluyen plásmidos, vectores de clonación, bacteriófagos, virus (p. ej., vector viral), cósmidos, vectores de expresión, vectores transportadores, casetes, y similares. Un vector incluye normalmente un origen de replicación, un sitio de clonación múltiple y un marcador de selección. El proceso de insertar un vector en una célula diana se denomina normalmente transfección. La transfección de una célula con un vector viral se denomina normalmente transducción. La presente invención incluye, en un aspecto, un vector que comprende una secuencia de ADN que codifica una variante de proteasa (p. ej., una variante de proteasa precursora o madura) que se encuentra ligada de forma operativa a una prosequencia adecuada (p. ej., secretora, secuencia de péptido señal, etc.) capaz de efectuar la expresión de la secuencia de ADN en un huésped adecuado.

25 **[0040]** Tal como se utiliza en el presente documento, los términos «casete de expresión» o «vector de expresión» se refieren a un vector o un constructo de ácido nucleico generado de forma recombinante o sintética para la expresión de un ácido nucleico de interés (p. ej., un transgén o un ácido nucleico extraño) en una célula diana. El ácido nucleico de interés expresa normalmente una proteína de interés. Un vector de expresión o casete de expresión comprende normalmente una secuencia nucleotídica promotora que dirige o promueve la expresión del ácido nucleico extraño. El vector o casete de expresión también incluye normalmente y otros elementos de ácido nucleico específicos que permiten la transcripción de un ácido nucleico concreto en una célula diana. Un casete de expresión recombinante se puede incorporar en un plásmido, cromosoma, ADN mitocondrial, ADN plastidial, virus o fragmento de ácido nucleico. Algunos vectores de expresión tienen la capacidad de incorporar y expresar fragmentos de ADN heterólogo en una célula huésped. Muchos vectores de expresión procariotas y eucariotas están comercialmente disponibles. La selección de vectores de expresión adecuados está dentro del conocimiento de los expertos en la materia. La selección de vectores de expresión apropiados para la expresión de una proteína a partir de una secuencia de ácido nucleico incorporada en el vector de expresión se encuentra incluida en los conocimientos de los expertos en la materia.

40 **[0041]** Un constructo de ADN es un segmento de ácido nucleico construido de forma artificial que puede introducirse en una célula o tejido diana. Normalmente, un constructo de ADN comprende un inserto de ADN que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una proteína de interés que ha sido subclonada en un vector. El vector puede contener genes de resistencia bacteriana para su cultivo en bacterias y un promotor para la expresión de la proteína de interés en un organismo. El ADN puede generarse *in vitro* mediante PCR o cualquier otra técnica conocida por los expertos en la materia. En algunos modos de realización, el constructo de ADN comprende una secuencia de ácido nucleico de interés. En algunos modos de realización, la secuencia se encuentra ligada de forma operativa a elementos adicionales, como elementos de control (p. ej., promotores, etc.). El constructo de ADN puede comprender también un marcador de selección y puede comprender también una secuencia de entrada flanqueada por cajas de homología. El constructo puede comprender otras secuencias no homólogas, añadidas a los extremos (p. ej., secuencias o flancos de relleno). En algunos modos de realización, los extremos de la secuencia están cerrados, de forma que el constructo de ADN forma un círculo cerrado. La secuencia de ácido nucleico de interés, que se incorpora en el constructo de ADN utilizando técnicas ampliamente conocidas en el ámbito de especialización, puede ser un ácido nucleico natural, mutante o modificado. En algunos modos de realización, el constructo de ADN comprende una o más secuencias de ácido nucleico homólogas al cromosoma de la célula huésped. En otros modos de realización, el constructo de ADN comprende una o más secuencias nucleotídicas no homólogas. Una vez el constructo de ADN se ensambla *in vitro* puede utilizarse, por ejemplo, para: 1) insertar secuencias heterólogas en una secuencia diana deseada de una célula huésped; y/o 2) mutagenizar una región del cromosoma de la célula huésped (esto es, sustituir una secuencia endógena por una secuencia heteróloga); 3) delecionar los genes diana; y/o 4) introducir un plásmido de replicación en el huésped. En el presente documento, «constructo de ADN» se emplea de manera intercambiable con «casete de expresión».

[0042] Tal como se utiliza en el presente documento, un «plásmido» se refiere a una molécula de ADN extracromosómico que es capaz de replicarse de forma independiente del ADN cromosómico. Un plásmido es bicatenario y puede ser circular, y se utiliza normalmente como un vector de clonación.

5 **[0043]** Tal como se utiliza en el presente documento en el contexto de introducir una secuencia de ácido nucleico en una célula, el término «introducido/a(s)» se refiere a cualquier método adecuado para transferir la secuencia de ácido nucleico en la célula. Dichos métodos de introducción incluyen, sin carácter limitativo, transfección, transformación, electroporación, conjugación, transducción y fusión de protoplastos (véase, p. ej., Ferrari et al., "Genetics," en Hardwood et al. (eds.), Bacillus, Plenum Publishing Corp., pp. 57-72 (1989)).

10 **[0044]** Transformación se refiere a la alteración genética de una célula que resulta de la absorción, la incorporación genómica y la expresión de material genético (p. ej., ADN).

15 **[0045]** Tal como se utiliza en el presente documento, un ácido nucleico está «ligado de forma operativa» con otra secuencia de ácido nucleico cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador se encuentra ligado de forma operativa a una secuencia que codifica nucleótidos si el promotor afecta a la transcripción de la secuencia codificante. Un sitio de unión al ribosoma puede encontrarse ligado de forma operativa a una secuencia codificante si se posiciona de forma que facilite la traducción de la secuencia codificante. Normalmente, las secuencias de ADN «ligadas de forma operativa» son contiguas. No obstante, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se consigue mediante la ligadura en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, pueden utilizarse enlazadores o adaptadores oligonucleótidos sintéticos según la práctica convencional.

20 **[0046]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término «gen» se refiere a un polinucleótido (p. ej., un segmento de ADN) que codifica un polipéptido e incluye regiones anteriores y posteriores a las regiones codificantes, así como secuencias intermedias (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones).

25 **[0047]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término «recombinante», cuando se emplea en referencia a una célula, indica normalmente que la célula se ha modificado mediante la introducción de una secuencia de ácido nucleico heterólogo o que la célula se deriva de una célula modificada de esta forma. Por ejemplo, una célula recombinante puede comprender un gen que no se encuentre de forma idéntica en la forma nativa (no recombinante) de la célula, o una célula recombinante puede comprender un gen nativo (encontrado en la forma nativa de la célula), pero que haya sido modificado y reintroducido en la célula. Una célula recombinante puede comprender un ácido nucleico endógeno a la célula que haya sido modificado sin extraer el
30 ácido nucleico de la célula; dichas modificaciones incluyen las obtenidas por sustitución alélica, mutación dirigida y técnicas relacionadas conocidas por los expertos en la materia. La tecnología de ADN recombinante incluye técnicas para la producción de ADN recombinante *in vitro* y la transferencia del ADN recombinante a células donde puede expresarse o propagarse, produciendo así un polipéptido recombinante. «Recombinación», «que recombina(n)» y «recombinado/a(s)», en referencia a polinucleótidos o ácidos nucleicos, se refieren por lo general al ensamblaje o la combinación de dos o más cadenas o fragmentos de ácidos nucleicos o
35 polinucleótidos para generar un nuevo polinucleótido o ácido nucleico. En ocasiones, el polinucleótido o ácido nucleico recombinante se denomina quimera. Un ácido nucleico o polipéptido es «recombinante» cuando es artificial o modificado, o se deriva de una proteína o ácido nucleico artificial o modificado.

40 **[0048]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término «amplificación» genética o de ácidos nucleicos se refiere a un proceso mediante el cual se replican de forma desproporcionada secuencias de ADN específicas de forma que el gen o el ácido nucleico amplificado se encuentra en un número de copias más elevado al que se encontraba inicialmente en el genoma. En algunos modos de realización, la selección de células por cultivo en presencia de una droga (p. ej., un inhibidor de una enzima que puede inhibirse) tiene como resultado la
45 amplificación bien del gen endógeno que codifica el producto génico necesario para el cultivo en presencia de la droga, bien la amplificación de secuencias exógenas (p. ej., entrada) que codifican este producto génico o de ácido nucleico, o ambas.

50 **[0049]** La «amplificación» es un caso especial de replicación de ácido nucleico que implica especificidad de molde. Ha de contrastarse con la replicación de molde no específico (es decir, replicación que depende de un molde pero que no depende de un molde específico). La especificidad de molde se distingue aquí de la fidelidad de replicación (es decir, la síntesis de la secuencia de polinucleótidos apropiada) y de la especificidad nucleotídica (ribo o desoxirribo). La especificidad de molde se describe frecuentemente en términos de especificidad de «diana». Las secuencias diana son «dianas» en el sentido de que se busca diferenciarlas de otros ácidos nucleicos. Las técnicas de amplificación se han diseñado principalmente para esta diferenciación.

55 **[0050]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término «cebador» se refiere a un oligonucleótido (un polímero de residuos nucleotídicos), bien de origen natural, como en una digestión de restricción purificada, bien producido de forma sintética, que es capaz de actuar como punto de iniciación de síntesis cuando se pone en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión de cebador que es complementario a una cadena de ácido nucleico (esto es, en presencia de nucleótidos y un agente inductor como ADN polimerasa y a una temperatura y un pH adecuados). Preferiblemente, un cebador es monocatenario para conseguir una
60 máxima eficiencia en la amplificación, pero de forma alternativa puede ser bicatenario. Si es bicatenario, en

primer lugar se trata el cebador para separar sus hebras antes de utilizarse para preparar productos de extensión. En un aspecto, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia del agente inductor. La longitud exacta de un cebador depende de una variedad de factores, entre los que se incluyen la temperatura, la fuente del cebador y el uso del método.

[0051] Tal como se utiliza en el presente documento, el término «sonda» se refiere a un oligonucleótido, bien de origen natural, como en una digestión de restricción purificada, bien producido de forma sintética, de forma recombinante o mediante amplificación por PCR, que es capaz normalmente de hibridar a otro oligonucleótido de interés. Una sonda puede ser monocatenaria o bicatenaria. Las sondas resultan de utilidad en la detección, identificación y aislamiento de secuencias de genes concretas. Se contempla que cualquier sonda usada en la presente invención estará marcada con cualquier «molécula informadora» de modo que sea detectable en cualquier sistema de detección, entre los que se incluyen, sin carácter limitativo, sistemas enzimáticos (por ejemplo, ELISA, así como ensayos histoquímicos basados en enzimas), fluorescentes, radiactivos y luminiscentes. No se pretende que la presente invención esté limitada a ningún sistema de detección ni marca en concreto.

[0052] Tal como se utiliza en el presente documento, el término «diana», cuando se emplea en referencia a la reacción en cadena de la polimerasa, se refiere a la región de ácido nucleico limitada por los cebadores utilizada para la reacción en cadena de la polimerasa. Por tanto, se busca diferenciar la «diana» de otras secuencias de ácido nucleico. Un «segmento» nucleotídico es una región de un ácido nucleico dentro de la secuencia de ácido nucleico diana.

[0053] Tal como se utiliza en el presente documento, el término «reacción en cadena de la polimerasa» (PCR, por sus siglas en inglés) se refiere a los métodos de las patentes de los Estados Unidos con número 4,683,195, 4,683,202 y 4,965,188, que incluyen métodos para incrementar la concentración de un segmento de una secuencia diana en una mezcla de ADN genómico sin clonación o purificación. Este proceso para amplificar la secuencia diana es ampliamente conocido en el ámbito de especialización.

[0054] Tal como se utiliza en el presente documento, el término «reactivos de amplificación» se refiere a aquellos reactivos (p. ej., desoxirribonucleótidos trifosfatos, tampón, etc.), necesarios para la amplificación salvo los cebadores, el molde de ácido nucleico y la enzima de amplificación. Normalmente, los reactivos de amplificación junto con los demás componentes de reacción están dispuestos y contenidos en un recipiente de reacción (tubo de ensayo, micropocillo, etc.).

[0055] Tal como se utiliza en el presente documento, los términos «endonucleasa de restricción» o «enzima de restricción» se refieren a una enzima (p. ej., una enzima bacteriana) que es capaz de cortar ADN monocatenario o bicatenario en una secuencia específica de nucleótidos conocida como sitio de restricción, o cerca de la misma. La secuencia nucleotídica que comprende el sitio de restricción es reconocida y escindida por una endonucleasa de restricción o enzima de restricción determinada y, con frecuencia, es el sitio de inserción de fragmentos de ADN. Un sitio de restricción puede convertirse en un vector de expresión o constructo de ADN.

[0056] «Recombinación homóloga» se refiere al intercambio de fragmentos de ADN entre dos moléculas de ADN o cromosomas apareados en el sitio de secuencias nucleotídicas idénticas o casi idénticas. En algunos modos de realización, la integración cromosómica es recombinación homóloga.

[0057] Se dice que un ácido nucleico o polinucleótido «codifica» un polipéptido si, en su estado nativo o cuando es manipulado mediante métodos conocidos por los expertos en la materia, puede ser transcrito y/o traducido para producir el polipéptido o un fragmento del mismo. También se dice que la cadena antisentido de dicho ácido nucleico codifica la secuencia.

[0058] Como se conoce en el ámbito de especialización, una secuencia de ADN puede ser transcrita mediante un ARN polimerasa para producir una secuencia de ARN, pero una secuencia de ARN puede ser retrotranscrita mediante retrotranscriptasa para producir una secuencia de ADN.

[0059] «Cepa huésped» o «célula huésped» se refieren a un huésped adecuado para un vector de expresión que comprende una secuencia de ADN de interés. La secuencia de ADN de interés puede expresar una proteína de interés en la cepa huésped o célula huésped.

[0060] Una «proteína» o «polipéptido» comprende una secuencia polimérica de residuos de aminoácidos. Los términos «proteína» y «polipéptido» se utilizan indistintamente en el presente documento. En la presente exposición, se emplea el código de tres letras para los aminoácidos definido de conformidad con la comisión sobre nomenclatura bioquímica denominada Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) de la IUPAC-IUB. También se entiende que un polipéptido puede estar codificado por más de una secuencia nucleotídica debido a la degeneración del código genético.

[0061] Una «prosecuencia» o «secuencia propeptídica» se refiere a una secuencia de aminoácidos entre la secuencia de péptido señal y la secuencia de proteasa madura que es necesaria para la secreción de la

proteasa. La escisión de la prosequencia o secuencia propeptídica tiene como resultado la proteasa activa madura.

5 **[0062]** Los términos «secuencia señal» o «péptido señal» se refieren a una secuencia de residuos de aminoácidos que puede participar en la secreción o transporte directo de la forma precursora o madura de una proteína. La secuencia señal se ubica normalmente en el extremo N-terminal con respecto a la secuencia de proteínas precursora o madura. La secuencia señal puede ser endógena o exógena. Un ejemplo de secuencia señal exógena comprende los siete primeros residuos de aminoácidos de la secuencia señal de la subtilisina de *Bacillus subtilis* fusionada con lo restante de la secuencia señal de la subtilisina de *Bacillus lentus* (ATCC 21536). Normalmente, una secuencia señal está ausente de la proteína madura. Normalmente, una secuencia señal se escinde de la proteína mediante una peptidasa señal después de que la proteína se haya transportado.

[0063] El término «secuencia señal híbrida» se refiere a las secuencias señal en las que parte de la secuencia se obtiene del huésped de expresión fusionado con la secuencia señal del gen que se va a expresar. En algunos modos de realización, se utilizan secuencias sintéticas.

15 **[0064]** El término forma «madura» de una proteína, un polipéptido o un péptido se refiere a la forma funcional de la proteína, el polipéptido o el péptido sin la secuencia de péptido señal y la secuencia propeptídica.

[0065] El término forma «precursora» de una proteína o un péptido se refiere a una forma madura de la proteína que tiene una prosequencia ligada de forma operativa al extremo amino o carbonilo terminal de la proteína. El precursor también puede tener una secuencia «señal» ligada de forma operativa al extremo amino terminal de la prosequencia. El precursor también puede tener polinucleótidos adicionales que participan en la actividad posterior a la traducción (p. ej., polinucleótidos escindidos del mismo para dejar la forma madura de una proteína o péptido).

[0066] El término «natural», en referencia a una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico, indica que la secuencia de aminoácidos o la secuencia de ácido nucleico es una secuencia nativa o de origen natural.

25 **[0067]** Tal como se utiliza en el presente documento con respecto a posiciones de residuos de aminoácidos, los términos «correspondiente(s) a», «que corresponde(n) a» y «corresponde(n)» se refieren a un residuo de aminoácido en la posición enumerada en una proteína o un péptido, o un residuo de aminoácido que es análogo, homólogo o equivalente a un residuo enumerado en una proteína o un péptido. Tal como se utiliza en el presente documento, «región correspondiente» se refiere por lo general a una posición análoga a lo largo de proteínas relacionadas o una proteína de referencia.

30 **[0068]** Los términos «derivado/a(s) de» y «obtenido/a(s) de» se refieren no solo a una proteasa producida o producible por una cepa del organismo en cuestión, sino también una proteasa codificada por una secuencia de ADN aislada de dicha cepa y producida en un organismo huésped que contiene dicha secuencia de ADN. De forma adicional, los términos se refieren a una proteasa codificada por una secuencia de ADN de origen ADNc y/o sintético y que tiene las características identificativas de la proteasa en cuestión. A modo de ejemplo, «proteasas derivadas de *Bacillus*» se refiere a aquellas enzimas con actividad proteolítica que son producidas de forma natural por *Bacillus*, así como a las serina proteasas, como las producidas por fuentes de *Bacillus*, pero que son producidas mediante el uso de técnicas de ingeniería genética por organismos no *Bacillus* transformados con un ácido nucleico que codifica las serina proteasas.

40 **[0069]** El término «idéntico/a(s)», en el contexto de dos ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refiere a los residuos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para correspondencia máxima, medida esta mediante uno de los siguientes algoritmos de análisis o comparación de secuencias.

45 **[0070]** Tal como se utiliza en el presente documento, «genes homólogos» se refiere a un par de genes de especies diferentes, pero normamente relacionadas, que se corresponden entre sí y que son idénticos o muy similares entre sí. El término abarca genes que están separados por especiación (es decir, el desarrollo de nuevas especies) (p. ej., genes ortólogos), así como genes que se han separado por duplicación genética (p. ej., genes parálogos).

50 **[0071]** Tal como se utiliza en el presente documento, «homología» se refiere a similaridad o identidad de secuencia, prefiriéndose identidad. La homología puede determinarse utilizando técnicas estándar conocidas en el ámbito de especialización (véase, p.ej., Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981); Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970); Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988); programas de *software* como GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA del paquete de *software* Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group, Madison, WI); y Devereux et al., Nucl. Acid Res. 12:387-395 (1984)). Un ejemplo de algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea un alineamiento múltiple de secuencias a partir de un grupo de secuencias relacionadas utilizando alineamientos progresivos por pares. También puede trazar un árbol que muestre las relaciones de agrupamiento utilizadas para crear el alineamiento. PILEUP utiliza una simplificación del método de alineamiento progresivo de Feng y Doolittle (Feng y Doolittle, J. Mol. Evol. 35:351-360 (1987)). El método es similar al descrito por Higgins y Sharp (Higgins y Sharp, CABIOS 5:151-153 (1989)). Unos parámetros útiles de PILEUP incluyen un peso de hueco por defecto de 3.00, un peso de longitud de hueco por defecto de

0.10 y huecos de extremo ponderados. Otro ejemplo de algoritmo útil es el algoritmo BLAST, descrito por Altschul et al., (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410, (1990); y Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Un programa BLAST especialmente útil es el programa WU-BLAST-2 (Altschul et al., Meth. Enzymol. 266:460-480 (1996)). WU-BLAST-2 utiliza varios parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales se establecen en los valores por defecto. Los parámetros ajustables se establecen con los siguientes valores: intervalo de solapamiento = 1, fracción de solapamiento = 0.125, umbral de palabra (T) = 11. Los parámetros HSP S y HSP S2 son valores dinámicos y son establecidos por el propio programa dependiendo de la composición de la secuencia concreta y de la composición de la base de datos concreta en la que se está buscando la secuencia de interés. No obstante, los valores pueden ajustarse para incrementar la sensibilidad.

[0072] El porcentaje de identidad de secuencia entre una secuencia de referencia u una secuencia de prueba de interés puede determinarse fácilmente por un experto en la materia. El porcentaje de identidad compartido por las secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas se determina por comparación directa de la información de la secuencia entre las moléculas mediante el alineamiento de las secuencias y la determinación de la identidad por métodos conocidos en el ámbito de especialización. Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar la similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul, et al., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990). El software para llevar a cabo los análisis BLAST está disponible públicamente en el National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo implica en primer lugar identificar pares de secuencias de alta puntuación (HSP, por sus siglas en inglés) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta que coincidan o cumplan con alguna puntuación umbral T con valor positivo cuando se alineen con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. Estas coincidencias de palabras iniciales próximas actúan como puntos de partida para encontrar pares de secuencias de alta puntuación más largas que las contengan. Las coincidencias de palabras se expanden en ambas direcciones a lo largo de cada una de las dos secuencias que se comparan hasta donde se pueda aumentar la puntuación de alineamiento acumulativa. La extensión de las coincidencias de palabras se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye en la cantidad X a partir de un valor máximo conseguido; la puntuación acumulativa es cero o inferior; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLAST utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1992)) alineamientos (B) de 50, expectación (E) de 10, M⁵, N⁻⁴, y una comparación de ambas cadenas.

[0073] El algoritmo BLAST realiza a continuación un análisis estadístico de la similitud entre las dos secuencias (véase, p. ej., Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que un emparejamiento entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos ocurriría al azar. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a un ácido nucleico de serina proteasa de la presente invención si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con respecto a un ácido nucleico de serina proteasa es inferior a aproximadamente 0,1, más preferiblemente inferior a aproximadamente 0,01 y siendo lo más preferible inferior a aproximadamente 0,001. Cuando el ácido nucleico de prueba codifica un polipéptido de serina proteasa, se lo considera similar a un ácido nucleico de serina proteasa concreto si la comparación tiene como resultado una probabilidad de suma más pequeña inferior a aproximadamente 0,5 y más preferiblemente inferior a aproximadamente 0,2.

[0074] Por ciento «idéntico» o «de identidad», en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias que son iguales o que tienen un porcentaje específico de residuos de ácidos nucleicos o residuos de aminoácidos, respectivamente, cuando se comparan y se alinean para similitud máxima, según se determine utilizando un algoritmo de comparación de secuencias o mediante inspección visual. «Por ciento de identidad de secuencia» o «% de identidad» o «% de identidad de secuencia» o «% de identidad de secuencia de aminoácidos» de una secuencia de aminoácidos sujeto con respecto a una secuencia de aminoácidos de referencia (es decir, de consulta) significa que la secuencia de aminoácidos sujeto es idéntica (es decir, aminoácido a aminoácido) en un porcentaje específico con respecto a la secuencia de aminoácidos de consulta a lo largo de una longitud de comparación cuando las secuencias están alineadas de forma óptima. En consecuencia, un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos o un 80 % de identidad en lo que respecta a dos secuencias de aminoácidos significa que el 80 % de los residuos de aminoácidos en dos secuencias de aminoácidos alineadas de forma óptima son idénticos.

[0075] «Por ciento de identidad de secuencia» o «% de identidad» o «% de identidad de secuencia» o «% de identidad de secuencia de nucleótidos» de una secuencia de ácidos nucleicos sujeto con respecto a una secuencia de ácidos nucleicos de referencia (es decir, de consulta) significa que la secuencia de ácidos nucleicos sujeto es idéntica (es decir, nucleótido a nucleótido para una secuencia polinucleotídica) en un porcentaje específico con respecto a la secuencia de consulta a lo largo de una longitud de comparación cuando las secuencias están alineadas de forma óptima. En consecuencia, un 80 % de identidad de secuencia de nucleótidos o un 80 % de identidad en lo que respecta a dos secuencias de ácidos nucleicos significa que el 80 % de los residuos de nucleótidos en dos secuencias de ácidos nucleicos alineadas de forma óptima son idénticos.

[0076] En un aspecto, el porcentaje de identidad de secuencia o «% de identidad de secuencia» o «% de identidad» de una secuencia sujeto con respecto a una secuencia de consulta puede calcularse alineando de forma óptima las dos secuencias y comparando las dos secuencias alineadas de forma óptima a lo largo de una longitud de comparación. Se determina el número de posiciones en el alineamiento óptimo en las que se dan

5 residuos idénticos en ambas secuencias, proporcionando así el número de posiciones emparejadas, y entonces se divide el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones de la longitud de comparación (que, a menos que se especifique otra cosa, es la longitud de la secuencia de consulta). El número resultante se multiplica por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia de la secuencia sujeto con respecto a la secuencia de consulta.

10 **[0077]** Los términos «alineamiento óptimo» o «alineado/a(s) de forma óptima» se refieren al alineamiento de dos (o más) secuencias que tienen la puntuación más alta de porcentaje de identidad. Por ejemplo, el alineamiento óptimo de dos secuencias de proteínas puede obtenerse alineando de forma manual las secuencias de forma que se alinee el máximo número de residuos de aminoácidos idénticos en cada secuencia o utilizando programas de *software* o procedimientos descritos en el presente documento o conocidos en el ámbito de

15 especialización. El alineamiento óptimo de dos secuencias de ácidos nucleicos puede obtenerse alineando de forma manual las secuencias de forma que se alinee el máximo número de residuos de nucleótidos idénticos en cada secuencia o utilizando programas de *software* o procedimientos descritos en el presente documento o conocidos en el ámbito de especialización.

20 **[0078]** En un aspecto de ejemplo, dos secuencias polipeptídicas se consideran «alineadas de forma óptima» cuando se alinean utilizando distintos parámetros, como una matriz de sustitución de aminoácidos definida, una penalización por existencia de hueco (también denominada penalización por hueco abierto) y una penalización por extensión de hueco, con el fin de conseguir la máxima puntuación de similitud posible para dicho par de secuencias. La matriz de puntuación de BLOSUM62 (Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(22):10915 (1992)) suele utilizarse como matriz de sustitución de puntuación por defecto en algoritmos de

25 alineamiento de secuencias de polipéptidos (como BLASTP). La penalización por existencia de hueco se impone para la introducción de un solo hueco de aminoácido en una de las secuencias alineadas, y la penalización por extensión de hueco se impone para cada posición de residuo en el hueco. Algunos ejemplos de parámetros de alineamiento utilizados son: Matriz de puntuación de BLOSUM62, penalización por existencia de hueco =11 y penalización por extensión de hueco =1. La puntuación del alineamiento se define por las posiciones de

30 aminoácidos de cada secuencia en las que el alineamiento empieza y acaba (p. ej., la ventana de alineamiento), y opcionalmente por la inserción de un hueco o múltiples huecos en una o ambas secuencias, con el fin de conseguir la máxima puntuación de similitud posible.

[0079] El alineamiento óptimo entre dos o más secuencias puede determinarse manualmente mediante inspección visual o utilizando un ordenador, como por ejemplo, sin carácter limitativo, el programa BLASTP para

35 secuencias de aminoácidos y el programa BLASTN para secuencias de ácidos nucleicos (véase, e.g., Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402 (1997); véase también la página web del National Center for Biotechnology Information (NCBI)).

[0080] Puede decirse que un polipéptido de interés es «sustancialmente idéntico» a un polipéptido de referencia si el polipéptido de interés comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un

40 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 %, o al menos aproximadamente un 99,5 % de identidad de secuencia

45 con respecto a la secuencia de aminoácidos del polipéptido de referencia. El porcentaje de identidad entre dos polipéptidos tales puede determinarse manualmente mediante la inspección de las dos secuencias polipeptídicas alineadas de forma óptima o utilizando programas de *software* o algoritmos (p. ej., BLAST, ALIGN, CLUSTAL) con parámetros estándar. Una indicación de que dos polipéptidos son sustancialmente idénticos es que el primer polipéptido reacciona inmunitariamente de forma cruzada con el segundo polipéptido. Normalmente, los

50 polipéptidos que difieren en sustituciones de aminoácidos conservadoras reaccionan inmunitariamente de forma cruzada. En consecuencia, un polipéptido es sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren solamente en una sustitución de aminoácidos conservativa o en una o más sustituciones de aminoácidos conservativas.

[0081] Puede decirse que un ácido nucleico de interés es «sustancialmente idéntico» a un ácido nucleico de referencia si el ácido nucleico de interés comprende una secuencia de nucleotídica que tiene al menos

55 aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 %, o al menos aproximadamente un 99,5 % de

60 identidad de secuencia con respecto a la secuencia nucleotídica del ácido nucleico de referencia. El porcentaje de identidad entre dos ácidos nucleicos tales puede determinarse manualmente mediante la inspección de las

dos secuencias de ácidos nucleicos alineadas de forma óptima o utilizando programas de *software* o algoritmos (p. ej., BLAST, ALIGN, CLUSTAL) con parámetros estándar. Una indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas de ácidos nucleicos se hibridan entre sí en condiciones astringentes (p. ej., dentro de un rango de astringencia media a elevada). Una variante de proteasa

5 codificada por un ácido nucleico que comprende una secuencia polinucleotídica capaz de hibridarse con la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:11 en condiciones que varían desde astringencia media a astringencia elevada o la astringencia más elevada puede considerarse «equivalente» a la variante de proteasa que tiene la secuencia polipeptídica de cualquiera de SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:8, respectivamente.

10 **[0082]** Un ácido nucleico o polinucleótido está «aislado» cuando está total o parcialmente separado de otros componentes (como, p. ej., sin carácter limitativo, otras proteínas, ácidos nucleicos, células, etc.). De forma similar, un polipéptido, una proteína o un péptido está «aislado» cuando está total o parcialmente separado de otros componentes (como, p. ej., sin carácter limitativo, otras proteínas, ácidos nucleicos, células, etc.). Desde el punto de vista de la molaridad, una especie aislada es más abundante que otras especies en una composición.

15 Por ejemplo, una especie aislada puede comprender al menos aproximadamente un 50 %, un 70 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % (desde el punto de vista de la molaridad) de todas las especies macromoleculares presentes. De forma preferible, la especie de interés está purificada hasta lograr una homogeneidad esencial (es decir, las especies contaminantes no pueden detectarse en la composición mediante métodos de detección convencionales). La

20 pureza y la homogeneidad pueden determinarse utilizando un número de técnicas ampliamente conocidas en el ámbito de especialización, como electroforesis en gel de agarosa o de poliacrilamida de una muestra de proteína o ácido nucleico, seguido de visualización tras la tinción. Si se desea, puede utilizarse una técnica de alta resolución, como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), o medios similares, para la purificación del material.

25 **[0083]** El término «purificado(s)», en aplicación a ácidos nucleicos o polipéptidos, denota un ácido nucleico o polipéptido que, en esencia, está libre de otros componentes según lo determinado por técnicas analíticas ampliamente conocidas en el ámbito de especialización (p. ej., un polipéptido o un polinucleótido purificado forma una discreta banda en un gel de electroforesis, un eluato cromatográfico y/o un medio sometido a centrifugación en gradiente de densidad). Por ejemplo, un ácido nucleico o polipéptido que da lugar esencialmente a una banda

30 en un gel de electroforesis está «purificado». Un ácido nucleico o polipéptido purificado es al menos un 50 % puro, normalmente al menos aproximadamente un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 %, un 99,5 %, un 99,6 %, un 99,7 %, un 99,8 % o más puro (p. ej., por ciento en peso desde el punto de vista de la molaridad). De forma relacionada, la invención proporciona métodos de enriquecimiento de composiciones para una o más moléculas de la invención, como uno

35 o más polipéptidos o polinucleótidos de la invención. Una composición se enriquece para una molécula cuando hay un incremento sustancial en la concentración de la molécula después de aplicar una técnica de purificación o enriquecimiento. Un polipéptido o un polinucleótido sustancialmente puro de la invención (p. ej., una variante de proteasa sustancialmente pura o un polinucleótido sustancialmente puro que codifica una variante de proteasa de la invención, respectivamente) comprenderán normalmente al menos aproximadamente un 55 %, un 60 %, un

40 70 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 %, un 99,5 % o más en peso (desde el punto de vista de la molaridad) de todas las especies macromoleculares en una composición concreta.

[0084] De forma relacionada, la invención proporciona métodos de enriquecimiento de composiciones para una o más moléculas de la invención, como uno o más polipéptidos de la invención (p. ej., una o más variantes de

45 proteasas de la invención) o uno o más ácidos nucleicos de la invención (p. ej., uno o más ácidos nucleicos que codifican una o más variantes de proteasas de la invención). Una composición se enriquece para una molécula cuando hay un incremento sustancial en la concentración de la molécula después de aplicar una técnica de purificación o enriquecimiento. Un polipéptido o un polinucleótido sustancialmente puro comprenderá normalmente al menos aproximadamente un 55 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un

50 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 %, un 99,5 % o más en peso (desde el punto de vista de la molaridad) de todas las especies macromoleculares en una composición concreta.

[0085] Tal como se utiliza en el presente documento, el término «mutagénesis combinatoria» se refiere a los métodos en los que se generan bibliotecas de variantes de ácidos nucleicos de una secuencia de ácidos nucleicos de referencia. En estas bibliotecas, las variantes contienen una o varias mutaciones escogidas de un

55 conjunto de mutaciones predefinido. Los métodos también proporcionan medios para introducir mutaciones aleatorias que no pertenecían al conjunto de mutaciones predeterminado. Algunos de dichos métodos incluyen los expuestos en la patente de los Estados Unidos con número 6,582,914. Algunos de dichos métodos de mutagénesis combinatoria incluyen abarcan métodos puestos en práctica en kits comercializados (p. ej., el kit de mutagénesis dirigida de sitio múltiple QuikChange® (Stratagene)).

60 **[0086]** Tal como se utiliza en el presente documento, «que tiene propiedades mejoradas», utilizado en relación con una variante de proteasa, se refiere a una variante de proteasa con una eficacia de limpieza o lavado mejorada o potenciada, y/o una estabilidad mejorada o potenciada opcionalmente con eficacia de limpieza o

lavado retenida, en comparación con la correspondiente proteasa de referencia (p. ej., una proteasa natural o de origen natural). Las propiedades mejoradas de una variante de proteasa pueden comprender una eficacia de limpieza o lavado mejorada y/o una estabilidad mejorada. En un aspecto, la invención proporciona variantes de proteasas de la invención que exhiben una o más de las siguientes propiedades: eficacia de lavado a mano mejorada, eficacia de lavado de la vajilla de forma manual o a mano mejorada, eficacia de lavado de la vajilla de forma automática mejorada, eficacia de lavado de la colada mejorada y/o estabilidad mejorada en comparación con una proteasa de referencia (p. ej., proteasa natural, como una subtilisina natural).

[0087] Tal como se utiliza en el presente documento, el término «ensayo funcional» se refiere a un ensayo que proporciona una indicación de la actividad de la proteína. En algunos modos de realización, el término se refiere a sistemas de ensayo en los que se analiza la aptitud de una proteína para funcionar en su capacidad habitual. Por ejemplo, en el caso de las enzimas, un ensayo funcional conlleva la determinación de la efectividad de la enzima para catalizar una reacción.

[0088] Tal como se utiliza en el presente documento, el término «propiedad diana» se refiere a la propiedad del gen inicial que se va a alterar. No se pretende que la presente invención se limite a ninguna propiedad diana en concreto. No obstante, en algunos modos de realización, la propiedad diana es la estabilidad de un producto génico (p. ej., resistencia a desnaturalización, proteólisis u otros factores de degradación), mientras que en otros modos de realización, el nivel de producción se altera en un huésped de producción.

[0089] El término «propiedad» o equivalentes gramaticales del mismo, en el contexto de un ácido nucleico, tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a cualquier característica o atributo de un ácido nucleico que puede seleccionarse o detectarse. Estas propiedades incluyen, sin carácter limitativo, una propiedad que afecta la unión a un polipéptido, una propiedad conferida en una célula que comprende un ácido nucleico concreto, una propiedad que afecta la transcripción de genes (p. ej., fuerza del promotor, reconocimiento del promotor, regulación del promotor, función potenciadora), una propiedad que afecta el procesamiento del ARN (p. ej., corte y empalme del ARN, estabilidad del ARN, conformación del ARN y modificación postranscripcional), una propiedad que afecta la traducción (p. ej., nivel, regulación, unión de ARNm a proteínas ribosómicas, modificación postraduccional). Por ejemplo, un sitio de unión para un factor de transcripción, una polimerasa, un factor regulador, etc., de un ácido nucleico puede alterarse con el fin de producir características deseadas o para identificar características no deseadas.

[0090] El término «propiedad» o equivalentes gramaticales del mismo, en el contexto de un polipéptido (proteínas incluidas), tal como se utiliza en el presente documento, se refieren a cualquier característica o atributo de un polipéptido que puede seleccionarse o detectarse. Estas propiedades incluyen, sin carácter limitativo, estabilidad frente a la oxidación, especificidad de sustrato, actividad catalítica, actividad enzimática, estabilidad térmica, actividad alcalina, perfil de actividad de pH, resistencia a degradación proteolítica, K_M , k_{cat} , ratio de k_{cat}/K_M , plegamiento proteico, inducción de una respuesta inmune, capacidad para unirse a un ligando, capacidad para unirse a un receptor, capacidad para secretarse, capacidad para presentarse sobre la superficie de una célula, capacidad de oligomerizarse, capacidad de señalar, capacidad de estimular la proliferación celular, capacidad de inhibir la proliferación celular, capacidad de inducir la apoptosis, capacidad para modificarse mediante fosforilación o glicosilación, y/o capacidad para tratar enfermedades, etc.

[0091] Tal como se utiliza en el presente documento, el término «cribado» tiene su significado habitual en el ámbito de especialización. En un ejemplo de proceso de cribado, se proporciona un ácido nucleico o una variante de polipéptido codificada en el mismo mutantes y se evalúa o determina una propiedad del ácido nucleico o de la variante de polipéptido mutantes, respectivamente. La propiedad determinada del ácido nucleico o de la variante de polipéptido mutantes puede compararse con una propiedad del ácido nucleico precursor (original) correspondiente o con la propiedad del polipéptido original correspondiente, respectivamente.

[0092] Para los expertos en la materia, resultará evidente que el procedimiento de cribado para obtener una proteína o ácido nucleico con una propiedad alterada depende de la propiedad del material inicial cuya modificación se pretende facilitar mediante la generación del ácido nucleico mutante. En consecuencia, el experto en la materia apreciará que la invención no se limita al cribado de ninguna propiedad específica y que la siguiente descripción de propiedades contempla solamente ejemplos ilustrativos. En el ámbito de especialización, por lo general se describen métodos para el cribado de cualquier propiedad concreta. Por ejemplo, se puede medir la unión, el pH, la especificidad, etc. antes y después de la mutación, donde un cambio indica una alteración. De forma preferible, las cribas se realizan a alto rendimiento, lo que incluye que múltiples muestras se criben de forma simultánea, incluyendo, sin carácter limitativo, ensayos que utilizan chips, *phage display* y múltiples sustratos y/o indicadores.

[0093] Tal como se utiliza en el presente documento, en algunos modos de realización, un proceso de cribado abarca una o más etapas de selección en las que las variantes de interés se enriquecen a partir de una población de variantes. Ejemplos de estos modos de realización incluyen la selección de variantes que confieren una ventaja de crecimiento al organismo huésped, así como *phage display* o cualquier otro método de visualización, donde las variantes pueden capturarse de una población de variantes según sus propiedades catalíticas o de unión. En algunos modos de realización, se expone una biblioteca de variantes a estrés (calor, proteasa, desnaturalización) y, posteriormente, las variantes que todavía se encuentran intactas se identifican en

una criba o se enriquecen por selección. Se pretende que el término abarque cualquier medio de selección adecuado. De hecho, no se pretende que la presente invención se limite a ningún método de cribado concreto.

[0094] Los términos «secuencia de ácido nucleico modificada» y «gen modificado» se utilizan indistintamente en el presente documento para hacer referencia a una secuencia de ácido nucleico que incluye una delección, inserción o interrupción de secuencia de ácido nucleico de origen natural (esto es, natural). En algunos modos de realización, el producto de expresión de la secuencia de ácido nucleico modificada es una proteína truncada (p. ej., si la modificación es una delección o interrupción de la secuencia). En algunos modos de realización, la proteína truncada retiene actividad biológica. En modos de realización alternativos, el producto de expresión de la secuencia de ácido nucleico modificada es una proteína elongada (p. ej., modificaciones que comprenden una inserción en la secuencia de ácido nucleico). En algunos modos de realización, una inserción nucleotídica en la secuencia de ácido nucleico da lugar a una proteína truncada (p. ej., cuando la inserción tiene como resultado la formación de un codón de terminación). En consecuencia, una inserción puede tener como resultado, bien una proteína truncada, bien una proteína elongada, como producto de expresión.

[0095] Una secuencia de ácido nucleico «mutante» se refiere normalmente a una secuencia de ácido nucleico que tiene una alteración en al menos un codón presente en una secuencia natural de la célula huésped de forma que el producto de expresión de la secuencia de ácido nucleico mutante es una proteína con una secuencia de aminoácidos alterada en comparación con la proteína natural. El producto de expresión puede tener una capacidad funcional alterada (p. ej., actividad enzimática potenciada).

[0096] Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión «alteración de la especificidad de sustrato» se refiere a cambios de la especificidad de sustrato de una enzima. En algunos modos de realización, un cambio en la especificidad de sustrato se define como un cambio en k_{cat} y/o K_m para un sustrato concreto, como resultado de mutaciones de la enzima o de la alteración de las condiciones de reacción. La especificidad de sustrato de una enzima se determina por medio de la comparación de las eficiencias catalíticas que esta muestra con distintos sustratos. Estas determinaciones se utilizan concretamente para evaluar la eficiencia de enzimas mutantes, dado que por lo general se desea producir variantes de enzimas que muestren mayores ratios de k_{cat}/K_m para sustratos de interés. No obstante, no se pretende que la presente invención se limite a ninguna composición de sustrato o especificidad de sustrato concretas.

[0097] Tal como se utiliza en el presente documento, «propiedad de superficie» se utiliza en referencia a carga electrostática, así como a propiedades como la hidrofobicidad e hidrofiliidad exhibidas por la superficie de una proteína.

[0098] Los términos «térmicamente estable» y «termoestable» se refieren a proteasas que retienen una cantidad específica de actividad enzimática después de ser expuestas a temperaturas identificadas durante un periodo de tiempo determinado en condiciones imperantes durante el proceso proteolítico, de hidrolización, de limpieza u otro proceso de la invención, como, p. ej., cuando se exponen a temperaturas alteradas. Las temperaturas alteradas incluyen temperaturas incrementadas o disminuidas. En algunos modos de realización, las proteasas retienen al menos aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 75 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 92 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, o aproximadamente un 99 % de actividad proteolítica después de ser expuestas a temperaturas alteradas durante un periodo de tiempo determinado, por ejemplo, al menos aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 120 minutos, aproximadamente 180 minutos, aproximadamente 240 minutos, aproximadamente 300 minutos, etc.

[0099] El término «estabilidad potenciada» en el contexto de una proteasa de pH estable, termoestable, de quelante estable y/o de oxidación estable se refiere a una actividad proteolítica retenida más elevada a lo largo del tiempo en comparación con otras proteasas (p. ej., subtilisina proteasas) y/o enzimas naturales.

[0100] El término «estabilidad reducida» en el contexto de una proteasa de pH estable, termoestable, de quelante estable y/o de oxidación estable se refiere a una actividad proteolítica retenida más baja a lo largo del tiempo en comparación con otras proteasas (p. ej., subtilisina proteasas) y/o enzimas naturales.

[0101] El término «actividad de limpieza» se refiere a una eficacia de limpieza obtenida por una variante de proteasa o proteasa de referencia en condiciones imperantes durante el proceso proteolítico, de hidrolización, de limpieza u otro proceso de la invención. En un aspecto, el rendimiento de limpieza de una variante de proteasa o proteasa de referencia puede determinarse mediante varios ensayos para limpiar una o más varias manchas susceptibles a enzimas en un artículo o superficie, como, p. ej., una mancha de proteínas procedentes de huevo, comida, grasa, sangre o leche. El rendimiento de limpieza de una variante de proteasa o proteasa de referencia puede determinarse sometiendo la mancha del artículo o la superficie a condiciones de lavado estándar y evaluando la medida en la que se elimina la mancha utilizando varias metodologías cromatográficas, espectrofotométricas u otras metodologías cuantitativas. Entre los ejemplos de ensayos y métodos de limpieza se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., los descritos en WO 99/34011 y en la patente de los Estados Unidos con número 6,605,458, así como los ensayos y métodos de limpieza incluidos en los ejemplos que se presentan abajo.

[0102] El término «cantidad de limpieza efectiva» de una variante de proteasa o una proteasa de referencia se refiere a la cantidad de proteasa que obtiene un nivel deseado de actividad enzimática en una composición de limpieza específica. Un experto en la materia determina fácilmente dichas cantidades efectivas, que se fundamentan en muchos factores, como la proteasa concreta utilizada, la aplicación de limpieza, la composición específica de la composición de limpieza, y en si se necesita una composición líquida o seca (p. ej., granulada, de barra), etc.

[0103] El término «material de limpieza adjunto» se refiere a cualquier material líquido, sólido o gaseoso incluido en la composición de limpieza que no sea una variante de proteasa de la invención. Una composición de limpieza de la invención puede incluir uno o más materiales de limpieza adjuntos. Cada material de limpieza adjunto se selecciona normalmente dependiendo del tipo y la forma concretos de la composición de limpieza (p. ej., composición líquida, granulada, en polvo, en barra, de pasta, pulverizada, en pastilla, en gel o de espuma). De forma preferible, cada material de limpieza adjunto es compatible con la enzima de proteasa utilizada en la composición.

[0104] El término «eficacia mejorada» en el contexto de actividad de limpieza se refiere a una actividad de limpieza mayor o incrementada de determinadas manchas susceptibles a enzimas como las de huevo, leche, grasa o sangre, según se determina mediante una evaluación normal después de un ciclo de lavado estándar y/o múltiples ciclos de lavado.

[0105] El término «eficacia disminuida» en el contexto de actividad de limpieza se refiere a una actividad de limpieza menor o reducida de determinadas manchas susceptibles a enzimas como las de huevo, leche, grasa o sangre, según se determina mediante una evaluación normal después de un ciclo de lavado estándar.

[0106] El término «eficacia comparativa» en el contexto de la actividad de limpieza de una variante de proteasa de la invención se refiere a al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 %, al menos aproximadamente un 99,5 % de la actividad de limpieza de una proteasa de referencia o comparativa (p. ej., proteasas comercializadas), entre las que se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., proteasa OPTIMASE™ (Genencor), productos de proteasa PURAFECT™ (Genencor), proteasa SAVINASE™ (Novozymes), variantes de BPN' (véase, p. ej., la patente de los Estados Unidos con número Re 34,606), proteasa RELASE™, DURAZYME™, EVERLASE™, KANNASE™ (Novozymes), proteasas MAXACAL™, MAXAPEM™, PROPERASE™ (Genencor; véase también la patente de los Estados Unidos con número Re 34,606 y las patentes de los Estados Unidos con número 5,700,676; 5,955,340; 6,312,936; y 6,482,628), y productos de variante de proteasa de *B. lentus* (p. ej., los descritos en WO 92/21760, WO 95/23221 y/o WO 97/07770). La eficacia de limpieza puede determinarse comparando las variantes de proteasas de la presente invención con subtilisina proteasas de referencia en varios ensayos de limpieza relativos a manchas susceptibles a enzimas como las causadas por grasa, sangre o leche, según lo determinado por metodologías espectrofotométricas o analíticas tras condiciones de ciclo de lavado estándar.

[0107] Tal como se utilizan en el presente documento, una «composición de limpieza» o «formulación de limpieza» de la invención se refiere a cualquier composición de la invención que resulte útil para quitar o eliminar un compuesto (p. ej., un compuesto no deseado) de un objeto, artículo o superficie que se va a limpiar, entre lo que se incluye, sin carácter limitativo, p. ej., un tejido, un artículo de tejido, un artículo de vajilla, un artículo de mesa, un artículo de cristalería, lente de contacto, otro sustrato sólido, pelo (champú) (incluido pelo humano o animal), piel (jabón o y crema), dientes (enjuagues bucales, pastas de dientes), una superficie de un artículo u objeto (p. ej., superficie dura, como, por ejemplo, la superficie dura de una mesa, un tablero, una pared, un mueble, suelo, techo, un artículo que no sea de vajilla, un artículo que no sea de mesa, etc.), lentes de contacto, etc. El término abarca cualquier material y/o compuesto añadido seleccionado para el tipo concreto de composición de limpieza deseado y la forma del producto (p. ej., composición líquida, en gel, granulada o de pulverización), siempre que la composición sea compatible con la proteasa y otra(s) enzima(s) utilizadas en la composición. La selección específica de los materiales de la composición de limpieza se realiza fácilmente teniendo en cuenta la superficie, el objeto, el artículo o el tejido se va a limpiar, y la forma deseada de la composición para las condiciones de limpieza durante su uso.

[0108] Las composiciones de limpieza y las formulaciones de limpieza incluyen cualquier composición adecuada para limpiar, blanquear, desinfectar y/o esterilizar cualquier objeto, artículo y/o superficie. Dichas composiciones y formulaciones incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., composiciones líquidas y/o sólidas, incluidas composiciones de limpieza o detergentes (p. ej., composiciones detergentes para tejidos delicados y composiciones detergentes o de limpieza para la colada líquidas, en pastillas, en gel, granuladas y/o sólidas; composiciones y formulaciones de limpieza para superficies duras, como para encimeras y ventanas de vidrio, madera, cerámica y metal; limpiadores de alfombras, limpiadores para horno, ambientadores para tejidos, suavizantes de tejidos, y composiciones detergentes o de limpieza potenciadoras para la colada y artículos textiles, composiciones de limpieza aditivas para la colada, y composiciones de limpieza de pretratado para la

colada; composiciones para el lavado de la vajilla, entre las que se incluyen, p. ej., composiciones para el lavado de la vajilla de forma manual o a mano (p. ej., detergentes para el lavado de la vajilla de forma manual o a mano) y composiciones para el lavado de la vajilla de forma automática (p. ej., detergentes para el lavado de la vajilla de forma automática).

- 5 **[0109]** Las composiciones de limpieza o formulaciones de limpieza incluyen, tal como se utilizan en el presente documento y a menos que se indique otra cosa, agentes de lavado potentes o multiusos en polvo o granulados, especialmente detergentes de limpieza; agentes de lavado multiusos en forma líquida, granulada, de gel, sólida, de pastillas o de pasta, especialmente los tipos denominados detergentes líquidos potentes (HDL, por sus siglas en inglés) o detergentes en polvo potentes (HDD, por sus siglas en inglés); los detergentes líquidos para tejidos delicados; los agentes para el lavado de la vajilla de forma manual o a mano, para el lavado de la vajilla de forma automática, o los agentes para el lavado de artículos de vajilla o artículos de mesa, incluidos los tipos en pastillas, en polvo, sólidos, granulados, líquidos, en gel o de enjuague para uso doméstico o institucional; agentes desinfectantes y de limpieza líquidos, incluidos los tipos para el lavado de manos antibacteriano, barras de limpieza, enjuagues bucales, productos para la limpieza de dentaduras, champús para coche, champú para alfombras, limpiadores de baño, champús para pelo y/o enjuagues de pelo para humanos y otros animales; geles de ducha y baños de espuma y limpiadores de metales; así como productos auxiliares de limpieza, como aditivos blanqueadores y productos de tipo «antiadherencia de manchas» o de pretratamiento. En algunos modos de realización, las composiciones granuladas se encuentran en forma «compacta»; en otros modos de realización, las composiciones líquidas se encuentran en forma «concentrada».
- 10
- 15
- 20 **[0110]** Tal como se utiliza en el presente documento, «composiciones de limpieza de tejidos» incluyen composiciones detergentes para el lavado de la colada a mano y a máquina, incluidas composiciones aditivas y composiciones adecuadas para su utilización en el remojo y/o el pretratamiento de tejidos manchados (p. ej., ropa, ropa de hogar y otros materiales textiles).
- 25 **[0111]** Tal como se utiliza en el presente documento, «composiciones de limpieza que no son para tejidos» incluyen composiciones para la limpieza de superficies no textiles (es decir, sin tejido), entre las que se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., composiciones detergentes para el lavado de la vajilla de forma automática, manual o a mano, composiciones de limpieza bucal, composiciones de limpieza de dentaduras y composiciones de aseo personal.
- 30 **[0112]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término «composición detergente» o «formulación detergente» se emplea en referencia a una composición prevista para su utilización en un medio de lavado para la limpieza de objetos sucios o manchados, incluyendo artículos u objetos de tejido o sin tejido concretos. Dichas composiciones de la presente invención no se limitan a ninguna composición o formulación detergente en concreto. De hecho, en algunos aspectos, los detergentes de la invención comprenden al menos una variante de proteasa de la invención y, además, uno o más surfactantes, transferasa(s), enzimas hidrolíticas, óxidorreductasas, mejoradores (como, por ejemplo, una sal mejoradora), agentes de blanqueado, activadores del blanqueado, agentes para teñir de azul, colorantes fluorescentes, inhibidores de aglomerantes, agentes secuestrantes, activadores de enzimas, antioxidantes y/o solubilizadores. En algunos casos, una sal mejoradora es una mezcla de una sal de silicato y una sal de fosfato, preferiblemente con más silicato (p. ej., metasilicato sódico) que fosfato (p. ej., tripolifosfato sódico). Algunas composiciones de la invención, como, sin carácter limitativo, composiciones de limpieza o composiciones detergentes, no contienen ningún fosfato (p. ej., sal de fosfato o mejorador de fosfato).
- 35
- 40
- 45 **[0113]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término «blanqueado» se refiere al tratamiento de un material (p. ej., tejido, colada, pasta, etc.) o una superficie durante un período de tiempo suficiente y/o en condiciones de pH y/o temperatura adecuadas para efectuar un abrillantado (esto es, un blanqueado) y/o limpiar el material. Entre los ejemplos de productos químicos adecuados para efectuar el blanqueado se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., ClO_2 , H_2O_2 , perácidos, NO_2 , etc.
- 50 **[0114]** Tal como se utiliza en el presente documento, la «eficacia de lavado» de una proteasa (p. ej., una variante de proteasa de la invención) se refiere a la contribución de una variante de proteasa al lavado que proporciona una eficacia de limpieza adicional al detergente en comparación con el detergente sin la adición de la variante de proteasa a la composición. La eficacia de lavado se compara en condiciones de lavado pertinentes. En algunos sistemas de prueba, otros factores pertinentes, como la composición detergente, la subconcentración, la dureza del agua, el mecanismo de lavado, el tiempo, el pH y/o la temperatura pueden ser controlados de tal forma que se imite(n) la(s) condición(es) típica(s) para la aplicación doméstica en un determinado segmento de mercado (p. ej., lavado de la vajilla de forma manual o a mano, lavado de la vajilla de forma automática, limpieza de artículos de vajilla, limpieza de artículos de mesa, limpieza de tejidos, etc.).
- 55 **[0115]** El término «condiciones de lavado pertinentes» se utiliza en el presente documento para indicar las condiciones, concretamente la temperatura de lavado, el tiempo, el mecanismo de lavado, la subconcentración, el tipo de detergente y la dureza del agua que se utilizan en el ámbito doméstico en un segmento de mercado de lavado de la vajilla a mano, lavado de la vajilla de forma automática o detergente para la colada.

[0116] El término «eficacia de lavado mejorada» se utiliza para indicar que se obtiene un mejor resultado final en la eliminación de manchas en condiciones de lavado relevantes, o que se necesita una cantidad de menor de variante de proteasa, desde el punto de vista del peso, para obtener el mismo resultado final en comparación con la proteasa original inicial o natural.

5 [0117] Tal como se utiliza en el presente documento, el término «desinfección» designa la eliminación de contaminantes de las superficies, así como la inhibición o destrucción de microbios sobre las superficies de los artículos. No se pretende que la presente invención esté limitada a ninguna superficie ni artículo en concreto ni a contaminante(s) o microbios que van a eliminarse.

10 [0118] La forma «compacta» de las composiciones de limpieza del presente documento se refleja de la mejor forma por densidad y, en lo que respecta a la composición, por la cantidad de sal de relleno inorgánica. Las sales de relleno inorgánicas son ingredientes convencionales de las composiciones de detergentes en polvo. En composiciones detergentes convencionales, las sales de relleno se encuentran presentes en cantidades sustanciales, normalmente desde aproximadamente un 17 % hasta aproximadamente un 35 % en peso de la composición total. En contraste, en composiciones compactas, la sal de relleno se encuentra presente en
15 cantidades que no exceden aproximadamente un 15 % de la composición total. En algunos modos de realización, la sal de relleno se encuentra presente en cantidades que no exceden aproximadamente un 10 %, o más preferiblemente, aproximadamente un 5 % en peso de la composición. En algunos modos de realización, las sales de relleno inorgánicas se seleccionan de las sales alcalinas y las sales metálicas alcalinotérreas de sulfatos y cloruros. En algunos modos de realización, la sal de relleno es sulfato de sodio.

20 [0119] La posición de un residuo de aminoácido en una determinada secuencia de aminoácidos se numera normalmente en el presente documento utilizando la numeración de la posición del residuo de aminoácido correspondiente de la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* mostrada en SEQ ID NO:2. Por tanto, la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* de
25 SEQ ID NO:2 sirve como secuencia de referencia. Una determinada secuencia de aminoácidos, como una secuencia de aminoácidos de una variante de proteasa descrita en el presente documento, puede alinearse con la secuencia de la BPN' (SEQ ID NO:2) utilizando un algoritmo de alineamiento como se describe aquí, y un residuo de aminoácido de la secuencia de aminoácidos dada que se alinea (preferiblemente, se alinea de forma óptima) con el residuo de aminoácido de la secuencia BPN' puede numerarse de forma conveniente por referencia al residuo de aminoácido correspondiente de secuencia de la subtilisina BPN'. Por ejemplo, la variante
30 de proteasa PX4 de la invención puede describirse como una variante de proteasa de la proteasa GG36 mostrada en SEQ ID NO:1 que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende las seis sustituciones de aminoácidos N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A en relación con SEQ ID NO:1, donde las posiciones de los residuos de aminoácidos de la variante de proteasa PX4 se numeran según la numeración de las posiciones de aminoácidos correspondientes en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' mostrada
35 en SEQ ID NO:2, según lo determinado por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de PX4 con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN'.

[0120] De forma alternativa, si las posiciones de los residuos de aminoácidos de la secuencia de la variante de proteasa PX4 se numeran utilizando la numeración de las posiciones de los residuos de aminoácidos en la
40 secuencia de aminoácidos de GG36 (SEQ ID NO:1), y no por referencia a las posiciones de aminoácidos correspondientes en la secuencia de la BPN' tras el alineamiento, la variante de proteasa PX4 puede describirse como una variante de proteasa de la proteasa GG36 mostrada en SEQ ID NO:1 que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende las seis sustituciones de aminoácidos N74D+S85R+G116R+S126L+P127Q+S128A.

45 [0121] Por lo general, la nomenclatura utilizada en el presente documento y muchos de los procedimientos de laboratorio de cultivo celular, genética molecular, biología molecular, química de ácidos nucleicos y química de proteínas descritos posteriormente son ampliamente conocidos y comúnmente empleados por los expertos en la materia. Se utilizan técnicas estándar, como las descritas en Sambrook et al., *Molecular Cloning-A Laboratory Manual* (2a Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 (en lo sucesivo, "Sambrook") y *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, F. M. Ausubel et al., eds., Current
50 Protocols, una iniciativa conjunta de Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc. (1994, complementada con 1999) (en lo sucesivo, "Ausubel"), para métodos de ácido nucleico recombinante, síntesis de ácidos nucleicos, métodos de cultivo celular e incorporación de transgenes, p. ej., transfección, electroporación. Las etapas de síntesis y purificación de oligonucleótidos se realizan normalmente según la memoria. Las técnicas y los procedimientos se realizan por lo general según métodos convencionales ampliamente conocidos
55 en el ámbito de especialización y varias referencias generales que se proporcionan a lo largo del presente documento. Se considera que dichos procedimientos son ampliamente conocidos por los expertos en la materia y se proporcionan para comodidad del lector.

Polipéptidos de la invención

60 [0122] La presente invención proporciona polipéptidos novedosos, a los que se puede hacer referencia de forma colectiva como «polipéptidos de la invención». Los polipéptidos de la invención incluyen polipéptidos de variantes de proteasas aislados, recombinantes, sustancialmente puros o de origen no natural, entre los que se incluyen,

p. ej., polipéptidos de variantes de subtilisina, que tienen actividad enzimática (p. ej., actividad proteolítica). En un aspecto, los polipéptidos de la invención son útiles en aplicaciones de limpieza y pueden incorporarse en composiciones de limpieza que son útiles en métodos para limpiar un artículo o una superficie (p. ej., la superficie de un artículo) que necesita limpiarse.

- 5 **[0123]** En un aspecto, una variante de proteasa de la invención comprende una «variante de subtilisina», tal como se define en las reivindicaciones. En un aspecto, la invención proporciona una «variante de proteasa de *Bacillus sp.*» En un aspecto, la invención proporciona una «variante de subtilisina de *Bacillus sp.*»

[0124] En el presente documento también se expone una variante de proteasa aislada, recombinante, sustancialmente pura o de origen no natural que tiene actividad proteolítica, cuyo polipéptido comprende una
 10 secuencia polipeptídica que tiene al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 86 %, al menos aproximadamente un 87 %, al menos aproximadamente un 88 %, al menos aproximadamente un 89 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, al
 15 menos aproximadamente un 99 %, al menos aproximadamente un 99,5 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, comprendiendo dicha secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa una sustitución de cada uno de los residuos de aminoácidos en las posiciones 76, 87, 118, 128, 129, 130, 188 y 244 de SEQ ID NO:1 por un residuo de aminoácido diferente, donde cada posición de aminoácido se numera según la numeración de la posición de aminoácido correspondiente en la secuencia de
 20 aminoácidos de subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en SEQ ID NO:2, según lo determinado por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* (véase la figura 1). En un aspecto, dichas variantes de proteasas comprenden variantes de subtilisinas.

[0125] En el presente documento también se expone una variante de proteasa aislada, recombinante, sustancialmente pura o de origen no natural (p. ej., variante de subtilisina) que tiene actividad proteolítica, comprendiendo dicha variante de proteasa una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 % o un 100 % de identidad de
 25 secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, comprendiendo dicha secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa una sustitución de cada uno de los residuos de aminoácidos en las posiciones 76, 87, 118, 128, 129, 130, 188 y 244 de SEQ ID NO:1 por un residuo de aminoácido diferente, donde cada posición de aminoácido se numera según la numeración de la posición de aminoácido correspondiente en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en SEQ ID NO:2, según lo determinado por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* (véase la figura 1). En el presente documento
 30 también se expone una variante de proteasa aislada, recombinante o de origen no natural que tiene actividad proteolítica, comprendiendo dicha variante de proteasa una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, comprendiendo dicha
 35 secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa una sustitución de cada uno de los residuos de aminoácidos en las posiciones 76, 87, 118, 128, 129, 130, 188 y 244 de SEQ ID NO:1 por un residuo de aminoácido diferente, donde cada posición de aminoácido se numera según la numeración de la posición de aminoácido correspondiente en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en SEQ ID NO:2, según lo determinado por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la
 40 variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*. En algunas de dichas variantes de proteasas, la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa comprende una sustitución del residuo de aminoácido en cada una de las posiciones de aminoácido 76, 87, 118, 128, 129, 130, 188 y 244 de SEQ ID NO:1 por un residuo de aminoácido diferente para producir una variante de proteasa que tiene una carga global de -2, -1, 0, +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7 o +8; o, en un aspecto, una variante de
 45 proteasa que tiene una carga global de -2, -1, 0, +1, +2, +3 o +4; o, en un aspecto, -2, -1, 0, +1 o +2; o, en un aspecto, +1. En algunas de dichas variantes de proteasas, en la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa, (i) se sustituye el residuo de aminoácido en cada una de las posiciones 76 y 188 por un residuo de aminoácido de carga negativa seleccionado del grupo que consta de ácido aspártico y ácido glutámico; (ii) se sustituye el residuo de aminoácido en cada una de las posiciones 87, 118 y 244 con un residuo de aminoácido
 50 de carga positiva seleccionado del grupo que consta de arginina, histidina y lisina; y (iii) se sustituye el residuo de aminoácido en cada una de las posiciones 128, 129, y 130 por un residuo de aminoácido neutro seleccionado del grupo que consta de serina, treonina, asparagina, glutamina, alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, tirosina y valina. En algunas de dichas variantes de proteasas, la secuencia de aminoácidos de dicha variante de proteasa comprende las sustituciones de aminoácidos
 55 N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+V244R. En un aspecto, la variante de proteasa comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:8.

[0126] En el presente documento también se expone un polipéptido aislado, recombinante, sustancialmente puro o de origen no natural que tiene actividad proteolítica, comprendiendo dicho polipéptido una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 % o un 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8. En el presente documento también se expone una variante de proteasa aislada, recombinante, sustancialmente pura o de origen no natural (p. ej., variante de subtilisina) que tiene actividad proteolítica, comprendiendo dicha variante de proteasa una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, comprendiendo dicha secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa una sustitución del residuo de aminoácido en cada una de las posiciones de aminoácido 76, 87, 118, 128, 129 y 130 en relación con SEQ ID NO:1 por un residuo de aminoácido diferente, y (i) un residuo de serina en la posición de aminoácido 188 o una sustitución del residuo de serina en la posición 188 por un residuo de aminoácido diferente que no sea un residuo de ácido aspártico y/o (ii) un residuo de asparagina en la posición de aminoácido 248 o una sustitución del residuo de asparagina en la posición 248 por un residuo de aminoácido diferente que no sea un residuo de arginina, donde las posiciones de aminoácidos se numeran según la numeración de las posiciones de aminoácido correspondientes en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en SEQ ID NO:1, según lo determinado por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* (véase la figura 1).

[0127] También se expone una variante de proteasa aislada, recombinante, sustancialmente pura o de origen no natural que tiene actividad proteolítica, comprendiendo dicha variante de proteasa una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, comprendiendo dicha secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa una sustitución del residuo de aminoácido en cada una de las posiciones de aminoácido 76, 87, 118, 128, 129 y 130 en relación con SEQ ID NO:1 por un residuo de aminoácido diferente, y (i) un residuo de serina en la posición de aminoácido 188 o una sustitución del residuo de serina en la posición 188 por un residuo de aminoácido diferente que no sea un residuo de ácido aspártico, y/o (ii) un residuo de asparagina en la posición de aminoácido 248 o una sustitución del residuo de asparagina en la posición 248 por un residuo de aminoácido diferente que no sea un residuo de arginina, donde las posiciones de aminoácidos se numeran según la numeración de las posiciones de aminoácido correspondientes en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en SEQ ID NO:2, según lo determinado por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* (véase la figura 1). En algunas de dichas variantes de proteasas, la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa comprende un residuo de serina en la posición de aminoácido 188 y/o un residuo de arginina en la posición de aminoácido 248. En algunas de dichas variantes de proteasas, la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa comprende una sustitución del residuo de aminoácido en cada una de las posiciones de aminoácido 76, 87, 118, 128, 129 y 130 en relación con SEQ ID NO:2 por un residuo de aminoácido diferente para producir una variante de proteasa que tiene una carga global de -2, -1, 0, +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7 o +8; o, en un aspecto, una variante de proteasa que tiene una carga global de -2, -1, 0, +1, +2, +3 o +4; o, en un aspecto, una variante de proteasa que tiene una carga global de +1. En algunas de dichas variantes de proteasas, en la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa, (i) se sustituye el residuo de aminoácido en la posición 76 por un residuo de aminoácido de carga negativa seleccionado del grupo que consta de ácido aspártico y ácido glutámico, (ii) se sustituye el residuo de aminoácido en cada una de las posiciones 87 y 118 con un residuo de aminoácido de carga positiva seleccionado del grupo que consta de arginina, histidina y lisina, y (iii) se sustituye el residuo de aminoácido en cada una de las posiciones 128, 129, y 130 por un residuo de aminoácido sin carga (neutro) seleccionado del grupo que consta de serina, treonina, asparagina, glutamina, alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, tirosina y valina. En algunas de dichas variantes de proteasas, la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa comprende las sustituciones de aminoácidos N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A. En un aspecto, la variante de proteasa comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:7.

[0128] También se expone una variante de proteasa aislada, recombinante, sustancialmente pura o de origen no natural que tiene actividad proteolítica, comprendiendo dicha variante de proteasa una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, comprendiendo dicha secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa una sustitución del residuo de aminoácido en cada una de las posiciones de aminoácido 76, 87, 118, 128, 129 y 130 en relación con SEQ ID NO:1 por un residuo de aminoácido diferente, y (i) un residuo de serina en la posición de aminoácido 188 o una sustitución del residuo de serina en la posición 188 por un residuo de aminoácido diferente que no sea un residuo de ácido aspártico, y (ii) una sustitución del residuo de asparagina en la posición 248 por un residuo de arginina, donde las posiciones de aminoácidos se numeran según la numeración de las posiciones de aminoácido correspondientes en la

secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en SEQ ID NO:2, según lo determinado por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* (véase la figura 1). En algunas de dichas variantes de proteasas, la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa comprende una sustitución del residuo de aminoácido en cada una de las posiciones de aminoácido 76, 87, 118, 128, 129 y 130 en relación con SEQ ID NO:2 por un residuo de aminoácido diferente para producir una variante de proteasa que tiene una carga global de -2, -1, 0, +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7 o +8; o, en un aspecto, una variante de proteasa que tiene una carga global de -2, -1, 0, +1, +2, +3 o +4; o, en un aspecto, una variante de proteasa que tiene una carga global de +1. En algunas de dichas variantes de proteasas, en la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa, (i) se sustituye el residuo de aminoácido en la posición 76 por un residuo de aminoácido de carga negativa seleccionado del grupo que consta de ácido aspártico y ácido glutámico, (ii) se sustituye el residuo de aminoácido en cada una de las posiciones 87 y 118 con un residuo de aminoácido de carga positiva seleccionado del grupo que consta de arginina, histidina y lisina, y (iii) se sustituye el residuo de aminoácido en cada una de las posiciones 128, 129 y 130 por un residuo de aminoácido sin carga (neutro) seleccionado del grupo que consta de serina, treonina, asparagina, glutamina, alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, tirosina y valina. En algunas de dichas variantes de proteasas, la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa comprende las sustituciones de aminoácidos N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+N248R.

[0129] También se expone una variante de proteasa aislada, recombinante, sustancialmente pura o de origen no natural que tiene actividad proteolítica, comprendiendo dicha variante de proteasa una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, comprendiendo dicha secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa una sustitución del residuo de aminoácido en cada una de las posiciones de aminoácido 76, 87, 118, 128, 129 y 130 en relación con SEQ ID NO:1 por un residuo de aminoácido diferente, y (i) una sustitución del residuo de serina en la posición 188 por un residuo de ácido aspártico, y (ii) un residuo de asparagina en la posición de aminoácido 248 o una sustitución del residuo de asparagina en la posición 248 por un residuo de aminoácido diferente que no sea un residuo de arginina, donde las posiciones de aminoácidos se numeran según la numeración de las posiciones de aminoácido correspondientes en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en SEQ ID NO:2, según lo determinado por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* (véase la figura 1). En algunas de dichas variantes de proteasas, la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa comprende una sustitución del residuo de aminoácido en cada una de las posiciones de aminoácido 76, 87, 118, 128, 129 y 130 en relación con SEQ ID NO:2 por un residuo de aminoácido diferente para producir una variante de proteasa que tiene una carga global de -2, -1, 0, +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7 o +8; o, en un aspecto, una variante de proteasa que tiene una carga global de -2, -1, 0, +1, +2, +3 o +4; o, en un aspecto, una variante de proteasa que tiene una carga global de +1. En algunas de dichas variantes de proteasas, en la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa, (i) se sustituye el residuo de aminoácido en la posición 76 por un residuo de aminoácido de carga negativa seleccionado del grupo que consta de ácido aspártico y ácido glutámico, (ii) se sustituye el residuo de aminoácido en cada una de las posiciones 87 y 118 por un residuo de aminoácido de carga positiva seleccionado del grupo que consta de arginina, histidina y lisina, y (iii) se sustituye el residuo de aminoácido en cada una de las posiciones 128, 129 y 130 por un residuo de aminoácido sin carga (neutro) seleccionado del grupo que consta de serina, treonina, asparagina, glutamina, alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, tirosina y valina. En algunas de dichas variantes de proteasas, la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa comprende las sustituciones de aminoácidos N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D.

[0130] También se expone una variante de proteasa aislada, recombinante, sustancialmente pura o de origen no natural que tiene actividad proteolítica, comprendiendo dicha variante de proteasa una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, comprendiendo dicha secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa una sustitución del residuo de aminoácido en cada una de las posiciones 76, 87, 118, 128, 129, 130, 188 y 248 en relación con SEQ ID NO:1 por un residuo de aminoácido diferente, donde las posiciones de aminoácidos se numeran según la numeración de las posiciones de aminoácidos correspondientes en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en SEQ ID NO:2, según lo determinado por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* (véase la figura 1). En algunas de dichas variantes de proteasas, la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa comprende una sustitución del residuo de aminoácido en cada una de las posiciones de aminoácido 76, 87, 118, 128, 129 y 130 en relación con SEQ ID NO:2 por un aminoácido diferente para producir una variante de proteasa que tiene una carga global de -2, -1, 0, +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7 o +8; o, en un aspecto, una variante de proteasa que tiene una carga global de -2, -1, 0, +1, +2, +3 o +4; o, en un aspecto, una variante de proteasa que tiene una carga global de +1. En algunas de dichas variantes de proteasas, en la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa, (i) se sustituye el residuo de aminoácido en las posiciones

76 y 188 por un residuo de aminoácido de carga negativa seleccionado del grupo que consta de ácido aspártico y ácido glutámico, (ii) se sustituye el residuo de aminoácido en cada una de las posiciones 87, 118 y 248 con un residuo de aminoácido de carga positiva seleccionado del grupo que consta de arginina, histidina y lisina, y (iii) se sustituye el residuo de aminoácido en cada una de las posiciones 128, 129 y 130 por un residuo de aminoácido sin carga (neutro) seleccionado del grupo que consta de serina, treonina, asparagina, glutamina, alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, tirosina y valina. En algunas de dichas variantes de proteasas, la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa comprende las sustituciones de aminoácidos N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+N248R. En un aspecto, la variante de proteasa comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:6.

[0131] En el presente documento también se expone una variante de proteasa aislada, recombinante, sustancialmente pura o de origen no natural (p. ej., variante de subtilisina) que tiene actividad proteolítica, comprendiendo dicha variante de proteasa una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, comprendiendo dicha variante de proteasa uno de los siguientes conjuntos de sustituciones de aminoácidos en relación con SEQ ID NO:1:

(i) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A, con la condición de que dicha variante de proteasa no comprenda ambas N248R+S188D, o

(ii) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+V244R,

donde las posiciones de aminoácido se numeran según la numeración de las posiciones de aminoácido correspondientes en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en SEQ ID NO:2, según lo determinado por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* (véase la figura 1).

[0132] En el presente documento también se expone una variante de proteasa aislada, recombinante, sustancialmente pura o de origen no natural (p. ej., variante de subtilisina) que tiene actividad proteolítica, comprendiendo dicha variante de proteasa una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, comprendiendo dicha variante de proteasa uno de los siguientes conjuntos de sustituciones de aminoácidos en relación con SEQ ID NO:1:

(i) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A, con la condición de que dicha variante de proteasa no comprenda ambas N248R+S188D, o

(ii) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+V244R,

donde las posiciones de aminoácido se numeran según la numeración de las posiciones de aminoácido correspondientes en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en SEQ ID NO:2, según lo determinado por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* (véase la figura 1).

[0133] En el presente documento también se expone una variante de proteasa aislada, recombinante, sustancialmente pura o de origen no natural (p. ej., variante de subtilisina) que tiene actividad proteolítica, comprendiendo dicha variante de proteasa una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, comprendiendo dicha variante de proteasa uno de los siguientes conjuntos de sustituciones de aminoácidos en relación con SEQ ID NO:1:

(i) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A, con la condición de que dicha variante de proteasa no comprenda ambas N248R y S188D, o

(ii) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+V244R,

donde las posiciones de aminoácido se numeran según la numeración de las posiciones de aminoácido correspondientes en la secuencia de aminoácidos de subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en SEQ ID NO:2, según lo determinado por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* (véase la figura 1).

[0134] En el presente documento también se expone una variante de proteasa aislada, sustancialmente pura o recombinante (p. ej., variante de subtilisina) de una proteasa original (p. ej., subtilisina), comprendiendo dicha variante de proteasa una secuencia de aminoácidos que comprende uno de los siguientes conjuntos de sustituciones de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de la proteasa original:

- (i) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A, con la condición de que dicha variante de proteasa no comprenda ambas N248R y S188D, o
- (ii) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+V244R.

5 **[0135]** En el presente documento también se expone una variante de subtilisina aislada, sustancialmente pura o recombinante de una subtilisina original, comprendiendo dicha variante de subtilisina una secuencia de aminoácidos que comprende uno de los siguientes conjuntos de sustituciones de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina original:

- (i) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A, con la condición de que dicha variante de subtilisina no comprenda ambas N248R y S188D, o
- 10 (ii) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+V244R.

[0136] En el presente documento también se expone una variante de proteasa aislada, recombinante o de origen no natural (p. ej., variante de subtilisina) de una proteasa original, comprendiendo dicha proteasa original una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 % o un 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, teniendo dicha variante de proteasa actividad proteolítica y comprendiendo uno de los siguientes conjuntos de sustituciones de aminoácidos frente a dicha proteasa original:

- (i) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A, con la condición de que dicha variante de proteasa no comprenda ambas N248R y S188D, o
- (ii) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+V244R,

20 donde las posiciones de aminoácido se numeran según la numeración de las posiciones de aminoácido correspondientes en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en SEQ ID NO:2, según lo determinado por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* (véase la figura 1).

25 **[0137]** En el presente documento también se expone una variante de proteasa aislada, recombinante o de origen no natural (p. ej., variante de subtilisina) que tiene actividad proteolítica, comprendiendo dicha variante de proteasa una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, comprendiendo dicha secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa una sustitución del residuo de aminoácido en cada una de las posiciones de aminoácido 87, 118, 128, 129 y 130 en relación con SEQ ID NO:1 por un residuo de aminoácido diferente, y (i) un residuo de serina en la posición de aminoácido 188 o una sustitución del residuo de serina en la posición 188 por un residuo de aminoácido diferente que no sea un residuo de ácido aspártico y/o (ii) un residuo de asparagina en la posición de aminoácido 248 o una sustitución del residuo de asparagina en la posición 248 por un residuo de aminoácido diferente que no sea un residuo de arginina y/o (iii) una asparagina en la posición 76 o una sustitución del residuo de asparagina en la posición 248 por un residuo de aminoácido diferente que no sea un residuo de ácido aspártico, donde las posiciones de aminoácidos se numeran según la numeración de las posiciones de aminoácido correspondientes en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en SEQ ID NO:2, según lo determinado por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* (véase la figura 1). En algunas de dichas variantes de proteasas, la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa comprende un residuo de serina en la posición de aminoácido 188 o un residuo de arginina en la posición de aminoácido 248. En algunas de dichas variantes de proteasas, la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa comprende una sustitución del residuo de aminoácido en cada una de las posiciones de aminoácido 87, 118, 128, 129 y 130 en relación con SEQ ID NO:1 por un residuo de aminoácido diferente para producir una variante de proteasa que tiene una carga neta de -2, -1, 0, +1, +2, +3 o +4. En algunas de dichas variantes de proteasas, en la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa, (i) el residuo de aminoácido en la posición 76 comprende un residuo de asparagina, un residuo de ácido glutámico o un residuo de aminoácido sin carga (neutro) seleccionado del grupo que consta de serina, treonina, asparagina, glutamina, alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, tirosina y valina neutro, (ii) se sustituye el residuo de aminoácido en la posición 118 con un residuo de aminoácido de carga positiva seleccionado del grupo que consta de arginina, histidina y lisina, y (iii) se sustituye el residuo de aminoácido en cada una de las posiciones 128, 129 y 130 por un residuo de aminoácido sin carga seleccionado del grupo que consta de serina, treonina, asparagina, glutamina, alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, tirosina y valina. En algunas de dichas variantes de proteasas, la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa comprende las sustituciones de aminoácidos S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A.

60 **[0138]** En el presente documento también se expone una variante de proteasa aislada, recombinante o de origen no natural (p. ej., variante de subtilisina) que tiene actividad proteolítica, comprendiendo dicha variante de proteasa una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia

de aminoácidos de SEQ ID NO:1, comprendiendo dicha variante de proteasa uno de los siguientes conjuntos de sustituciones de aminoácidos en relación con SEQ ID NO:1:

- (i) S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A, con la condición de que dicha variante de proteasa no comprenda ninguno de N248R, S188D y N76D, o
- 5 (ii) S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+V244R, con la condición de que dicha variante de proteasa no comprenda N76D,

10 donde las posiciones de aminoácido se numeran según la numeración de las posiciones de aminoácido correspondientes en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' mostrada en SEQ ID NO:2, según lo determinado por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN'.

[0139] En el presente documento también se expone una variante de proteasa aislada, recombinante o de origen no natural (p. ej., variante de subtilisina) que tiene actividad proteolítica, comprendiendo dicha variante de proteasa una secuencia de aminoácidos que (a) difiere de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:1 de 9 a 15 residuos de aminoácidos y (b) comprende las sustituciones de aminoácidos N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+N248R, donde las posiciones de aminoácido se numeran según la numeración de las posiciones de aminoácido correspondientes en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' mostrada en SEQ ID NO:2, según lo determinado por el alineamiento.

[0140] En el presente documento también se expone una variante de proteasa aislada, recombinante o de origen no natural (p. ej., variante de subtilisina) que tiene actividad proteolítica, comprendiendo dicha variante de proteasa una secuencia de aminoácidos que (a) difiere de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:1 en no más de 30, no más de 25, no más de 20, no más de 15, no más de 14, no más de 13, no más de 12, no más de 11, no más de 10, no más de 9, o no más de 8 residuos de aminoácidos; y (b) comprende una sustitución del residuo de aminoácido en cada una de las posiciones de aminoácidos 76, 87, 118, 128, 129, 130, 188 y 244 de SEQ ID NO:1 por un residuo de aminoácido diferente, donde las posiciones de aminoácido se numeran según la numeración de las posiciones de aminoácido correspondientes en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' mostrada en SEQ ID NO:2, según lo determinado por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN'. Algunos de dichos polipéptidos de variantes de proteasas difieren de la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO:1 en una o más delecciones de aminoácidos, adiciones o inserciones de aminoácidos y/o sustituciones de aminoácidos. Una sustitución de aminoácido suele realizarse con uno de los otros 19 aminoácidos de origen natural y puede ser una sustitución de aminoácidos conservativa o no conservativa. En otra parte del presente documento, se analizan ejemplos de sustituciones conservativas de aminoácidos. En un aspecto, se deleciona al menos un aminoácido y/o se sustituye al menos un aminoácido en la secuencia de forma que el polipéptido resultante exhibe actividad enzimática (p. ej., actividad proteolítica), tal como determinan los ensayos estándar ampliamente conocidos en el ámbito de especialización, entre los que se incluye, por ejemplo, un ensayo descrito en el presente documento.

[0141] Algunas de dichas variantes de proteasas (p. ej., variantes de subtilisinas) que tienen actividad proteolítica comprenden una secuencia de aminoácidos que (a) difiere de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:1 en no más de 25, no más de 20, no más de 15, no más de 14, no más de 13, no más de 12, no más de 11, no más de 10, no más de 9, o no más de 8 residuos de aminoácidos; y (b) comprende una sustitución del residuo de aminoácido en cada una de las posiciones de aminoácidos 76, 87, 118, 128, 129, 130, 188 y 244 de SEQ ID NO:1, donde las posiciones de aminoácido se numeran según la numeración de las posiciones de aminoácido correspondientes en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' mostrada en SEQ ID NO:2, según lo determinado por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN'. Algunos de dichos polipéptidos de variantes de proteasas difieren de la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO:1 en una o más delecciones de aminoácidos, adiciones o inserciones de aminoácidos y/o sustituciones de aminoácidos. Una sustitución de aminoácido suele realizarse con uno de los otros 19 aminoácidos de origen natural y puede ser una sustitución de aminoácidos conservativa o no conservativa. En otra parte del presente documento, se analizan ejemplos de sustituciones conservativas de aminoácidos. En un aspecto, se deleciona al menos un aminoácido y/o se sustituye al menos un aminoácido en la secuencia de forma que el polipéptido resultante exhibe actividad enzimática (p. ej., actividad proteolítica), tal como determina un ensayo ampliamente conocido en el ámbito de especialización, incluido, por ejemplo, un ensayo descrito en el presente documento.

[0142] También se expone una variante de proteasa aislada, recombinante o de origen no natural (p. ej., variante de subtilisina) que tiene actividad proteolítica, comprendiendo dicha variante de proteasa una secuencia de aminoácidos que:

- (a) difiere de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:1 en o en no más de 30, no más de 25, no más de 20, no más de 15, no más de 14, no más de 13, no más de 12, no más de 11, no más de 10, no más de 9, no más de 8, no más de 7, o no más de 6 residuo(s) de aminoácidos; y
- 60 (b) comprende una sustitución del residuo de aminoácido en cada una de las posiciones de aminoácido 76, 87, 118, 128, 129 y 130 de SEQ ID NO:1 por un residuo de aminoácido diferente, y (i) un residuo de

serina en la posición de aminoácido 188 o una sustitución del residuo de serina en la posición 188 por un residuo de aminoácido diferente que no sea un residuo de ácido aspártico y/o (ii) un residuo de asparagina en la posición 248 o una sustitución del residuo de asparagina en la posición 248 por un residuo de aminoácido diferente que no sea un residuo de arginina, donde las posiciones de aminoácido se numeran según la numeración de las posiciones de aminoácido correspondientes en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' mostrada en SEQ ID NO:2, según lo determinado por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN'. Algunos de dichos polipéptidos de variantes de proteasas difieren de la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO:1 en una o más delecciones de aminoácidos, adiciones o inserciones de aminoácidos y/o sustituciones de aminoácidos. Una sustitución de aminoácido suele realizarse con uno de los otros 19 aminoácidos de origen natural y puede ser una sustitución de aminoácidos conservativa o no conservativa. En otra parte del presente documento, se analizan ejemplos de sustituciones conservativas de aminoácidos. En un aspecto, se deleciona al menos un aminoácido y/o se sustituye al menos un aminoácido en la secuencia de forma que el polipéptido resultante exhibe actividad enzimática (p. ej., actividad proteolítica), tal como determina un ensayo ampliamente conocido en el ámbito de especialización, incluido, por ejemplo, un ensayo descrito en el presente documento.

[0143] También se expone una variante de proteasa aislada, recombinante o de origen no natural (p. ej., variante de subtilisina) que tiene actividad proteolítica, comprendiendo dicha variante de proteasa una secuencia de aminoácidos que:

- (a) difiere de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 en no más de 25, no más de 20, no más de 15, no más de 14, no más de 13, no más de 12, no más de 11, no más de 10, no más de 9, no más de 8, no más de 7, o no más de 6 residuo(s) de aminoácidos; y
- (b) comprende una sustitución del residuo de aminoácido en cada una de las posiciones de aminoácido 76, 87, 118, 128, 129 y 130 de SEQ ID NO:1 por un residuo de aminoácido diferente, y (i) un residuo de serina en la posición de aminoácido 188 o una sustitución del residuo de serina en la posición 188 por un residuo de aminoácido diferente que no sea un residuo de ácido aspártico y/o (ii) un residuo de asparagina en la posición 248 o una sustitución del residuo de asparagina en la posición 248 por un residuo de aminoácido diferente que no sea un residuo de arginina, donde las posiciones de aminoácido se numeran según la numeración de las posiciones de aminoácido correspondientes en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' mostrada en SEQ ID NO:2, según lo determinado por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN'. En un aspecto, algunas de dichas variantes de proteasas comprenden (i) un residuo de serina en la posición 188 o una sustitución del residuo de serina en la posición 188 por un residuo de aminoácido diferente que no sea un residuo de ácido aspártico, y (ii) una sustitución del residuo de asparagina en la posición 248 por un residuo de arginina. En un aspecto, algunas de dichas variantes de proteasas comprenden (i) una sustitución del residuo de serina en la posición 188 por un residuo de ácido aspártico, y (ii) un residuo de asparagina en la posición 248 o una sustitución del residuo de asparagina en la posición 248 por un residuo de aminoácido diferente que no sea un residuo de arginina.

[0144] Algunos de dichos polipéptidos de variantes de proteasas difieren de la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO:1 en una o más delecciones de aminoácidos, adiciones o inserciones de aminoácidos y/o sustituciones de aminoácidos. Una sustitución de aminoácido suele realizarse con uno de los otros 19 aminoácidos de origen natural y puede ser una sustitución de aminoácidos conservativa o no conservativa. En otra parte del presente documento, se analizan ejemplos de sustituciones conservativas de aminoácidos. En un aspecto, se deleciona al menos un aminoácido y/o se sustituye al menos un aminoácido en la secuencia de forma que el polipéptido resultante exhibe actividad enzimática (p. ej., actividad proteolítica), tal como determina un ensayo ampliamente conocido en el ámbito de especialización, incluido, por ejemplo, un ensayo descrito en el presente documento. En algunas de dichas variantes de proteasas, la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa comprende un residuo de serina en la posición de aminoácido 188 o un residuo de arginina en la posición de aminoácido 248. En algunas de dichas variantes de proteasas, la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa comprende una sustitución del residuo de aminoácido en cada una de las posiciones de aminoácido 76, 87, 118, 128, 129 y 130 en relación con SEQ ID NO:2 por un residuo de aminoácido diferente para producir una variante de proteasa que tiene una carga neta de -2, -1, 0, +1, +2, +3 o +4. En algunas de dichas variantes de proteasas, en la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa, (i) se sustituye el residuo de aminoácido en la posición 76 por un residuo de aminoácido de carga negativa seleccionado del grupo que consta de ácido aspártico y ácido glutámico, (ii) se sustituye el residuo de aminoácido en cada una de las posiciones 87 y 118 con un residuo de aminoácido de carga positiva seleccionado del grupo que consta de arginina, histidina y lisina, y (iii) se sustituye el residuo de aminoácido en cada una de las posiciones 128, 129 y 130 por un residuo de aminoácido sin carga (neutro) seleccionado del grupo que consta de serina, treonina, asparagina, glutamina, alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, tirosina y valina. En algunas de dichas variantes de proteasas, la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa comprende las sustituciones de aminoácidos N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A.

[0145] En el presente documento también se expone una variante de proteasa aislada, recombinante o de origen no natural (p. ej., variante de subtilisina) que tiene actividad proteolítica, comprendiendo dicha variante de proteasa una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 99 % o 99,5 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:8.

5 **[0146]** En el presente documento también se expone una variante de proteasa aislada, recombinante o de origen no natural que tiene actividad proteolítica, comprendiendo dicha variante de proteasa una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:8 en no más de 1 residuo de aminoácido. Por ejemplo, la secuencia de la variante de proteasa puede diferir de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:8 en una sustitución de aminoácido (como una sustitución de aminoácido conservativa o no conservativa), una delección de aminoácido, o una inserción de aminoácido.

10 **[0147]** En el presente documento también se expone una variante de proteasa aislada, recombinante o de origen no natural que tiene actividad proteolítica, comprendiendo dicha variante de proteasa una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:7 en no más de 1 sustitución de aminoácido (como una sustitución de aminoácido conservativa o no conservativa), en no más de 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 delección(es) de aminoácido(s), y/o en no más de 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 delección(es) de aminoácido(s), inserción(es) o adición(es) de aminoácido(s).

20 **[0148]** En el presente documento también se expone una variante de proteasa aislada, recombinante o de origen no natural que tiene actividad proteolítica, comprendiendo dicha variante de proteasa una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:8 en no más de 1 sustitución de aminoácido (como una sustitución de aminoácido conservativa o no conservativa), en no más de 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 delección(es) de aminoácido(s), y/o en no más de 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 delección(es) de aminoácido(s), inserción(es) o adición(es) de aminoácido(s).

25 **[0149]** Como se ha indicado anteriormente, los polipéptidos de variantes de proteasas de la invención tienen actividades enzimáticas (como, p. ej., actividades proteolíticas) y, en consecuencia, son útiles en aplicaciones de limpieza como, p. ej., sin carácter limitativo, métodos para limpiar artículos de vajilla, artículos de mesa, tejidos y artículos que tengan superficies duras (p. ej., la superficie dura de una mesa, tablero, pared, mueble, suelo, techo, etc.). Algunos ejemplos de composiciones de limpieza que comprenden uno o más polipéptidos de variantes de proteasas se describen posteriormente. La actividad enzimática (p. ej., la actividad de proteasa) de un polipéptido de variante de proteasa de la invención puede determinarse fácilmente utilizando procedimientos ampliamente conocidos por los expertos en la materia. Los ejemplos presentados posteriormente describen métodos para evaluar la actividad enzimática, la eficacia de limpieza y/o la eficacia de lavado. La eficacia de las variantes de proteasas de la invención para eliminar manchas como, p. ej., una mancha inducida por proteína(s), limpiar superficies duras o lavar artículos de la colada, la vajilla o de mesa puede determinarse fácilmente utilizando procedimientos ampliamente conocidos en el ámbito de especialización y/o utilizando procedimientos expuestos en los ejemplos.

35 **[0150]** Un polipéptido expuesto en el presente documento puede someterse a varios cambios, como una o más inserciones, delecciones y/o sustituciones de aminoácidos, ya sean conservativas o no conservativas, incluido donde, por ejemplo, dichos cambios no alteran de forma sustancial la actividad enzimática del polipéptido. De forma similar, un ácido nucleico de la invención también puede someterse a varios cambios, como una o más sustituciones de uno o más ácidos nucleicos en uno o más codones de forma que un codón concreto codifique el mismo o aminoácido o uno diferente, teniendo como resultado bien una variación silenciosa (p. ej., una mutación en una secuencia nucleotídica tiene como resultado una mutación silenciosa en la secuencia de aminoácidos, p. ej., cuando el aminoácido codificado no es alterado por la mutación del ácido nucleico) o una variación no silenciosa, una o más delecciones de uno o más ácidos nucleicos (o codones) en la secuencia, una o más adiciones o inserciones de uno o más ácidos nucleicos (o codones) en la secuencia, y/o la escisión de o uno o más truncamientos de uno o más ácidos nucleicos (o codones) en la secuencia. Muchos de estos cambios en la secuencia de ácido nucleico pueden no alterar de forma sustancial la actividad enzimática de la variante de proteasa codificada resultante en comparación con la variante de proteasa codificada por la secuencia de ácido nucleico original. Un ácido nucleico de la invención también puede modificarse para incluir uno o más codones que proporcionen una expresión óptima en un sistema de expresión (p. ej., sistemas de expresión en bacterias), aunque, si se desea, dichos uno o más codones todavía codifiquen el/los mismo(s) aminoácido(s).

50 **[0151]** En un aspecto, un género de polipéptidos expuesto en el presente documento puede comprender polipéptidos de variantes de proteasas que tengan la actividad enzimática deseada (p. ej., actividad de proteasa o actividad de eficacia de limpieza) que comprendan secuencias que tengan las sustituciones de aminoácidos descritas en el presente documento y que también comprendan una o más sustituciones de aminoácidos adicionales, como sustituciones conservativas o no conservativas, donde el polipéptido exhibe, mantiene o mantiene de forma aproximada la actividad enzimática deseada (p. ej., actividad de proteasa o actividad de subtilisina), p. ej., como se refleja en la actividad o en la eficacia de limpieza de la variante de proteasa. Las sustituciones de aminoácidos según la presente exposición pueden incluir, p. ej., sin carácter limitativo, una o más sustituciones no conservativas de aminoácidos y/o una o más sustituciones conservativas de aminoácidos. Una sustitución de residuo de aminoácido conservativa conlleva normalmente el intercambio de un miembro

dentro de una clase funcional de residuos de aminoácidos por un residuo que pertenece a la misma clase funcional (los residuos de aminoácidos idénticos se consideran funcionalmente homólogos o se conservan calculando el porcentaje de homología funcional). Una sustitución de aminoácido conservativa conlleva normalmente la sustitución de un aminoácido en una secuencia de aminoácidos con un aminoácido funcionalmente similar. Por ejemplo, la alanina, la glicina, la serina y la treonina son funcionalmente similares y, en consecuencia, pueden servir como sustituciones conservativas de aminoácidos entre sí. El ácido aspártico y el ácido glutámico pueden servir como sustituciones conservativas entre sí. La asparagina y la glutamina pueden servir como sustituciones conservativas entre sí. La arginina, la lisina y la histidina pueden servir como sustituciones conservativas entre sí. La isoleucina, la leucina, la metionina y la valina pueden servir como sustituciones conservativas entre sí. La fenilalanina, la tirosina y el triptófano pueden servir como sustituciones conservativas entre sí.

[0152] Pueden concebirse otros grupos de sustituciones conservativas de aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos pueden agruparse por estructura química, composición o función similar (p. ej., ácidos, básicos, alifáticos, aromáticos, contenedores de sulfuro). Por ejemplo, un grupo Alifático puede comprender: Glicina (G), Alanina (A), Valina (V), Leucina (L), Isoleucina (I). Otros grupos que contienen aminoácidos que se consideran sustituciones conservativas entre sí incluyen: Aromáticos: Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); Contenedores de sulfuro: Metionina (M), Cisteína (C); Básicos: Arginina (R), Lisina (K), Histidina (H); Ácidos: Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); Residuos sin carga no polares, Cisteína (C), Metionina (M) y Prolina (P); Residuos sin carga hidrofílicos: Serina (S), Treonina (T), Asparagina (N) y Glutamina (Q). Véase también Creighton (1984) *Proteins: STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES* (2a Ed. 1993), W.H. Freeman and Company para grupos de aminoácidos adicionales. El listado de una secuencia polipeptídica en el presente documento, junto con los anteriores grupos de sustituciones, proporciona una relación expresa de todas las secuencias polipeptídicas sustituidas de forma conservativa.

[0153] Existen más sustituciones conservativas dentro de las clases de residuos de aminoácidos descritas anteriormente, que también pueden ser adecuadas de forma alternativa o adicional. Los grupos de conservación para sustituciones más conservativas incluyen: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, y asparagina-glutamina. En consecuencia, por ejemplo, en el presente documento se expone un polipéptido de variante de proteasa recombinante o aislado (p. ej., variante de subtilisina) que tiene actividad proteolítica, comprendiendo dicho polipéptido de variante de proteasa una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 %, o un 99,5 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, comprendiendo dicha secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa una sustitución del residuo de aminoácido en cada una de las posiciones de aminoácido 76, 87, 118, 128, 129 y 130 de SEQ ID NO:1 por un residuo de aminoácido diferente, y (i) un residuo de serina en la posición de aminoácido 188 o una sustitución del residuo de serina en la posición 188 por un residuo de aminoácido diferente que no sea un residuo de ácido aspártico y/o (ii) un residuo de asparagina en la posición 248 o una sustitución del residuo de asparagina en la posición 248 por un residuo de aminoácido diferente que no sea un residuo de arginina, donde las posiciones de aminoácido se numeran según la numeración de las posiciones de aminoácido correspondientes en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' mostrada en SEQ ID NO:2, según lo determinado por el alineamiento óptimo de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de la BPN', y donde un residuo de aminoácido en la secuencia de la variante de proteasa en una posición de aminoácido distinta a la posición 76, 87, 118, 128, 129 o 130 difiere de la posición de aminoácido correspondiente en SEQ ID NO:1 (según lo determinado por alineamiento utilizando el esquema de numeración de la BPN') por una sustitución de aminoácido conservativa, donde la variante de proteasa resultante exhibe o mantiene una actividad enzimática o una actividad de eficacia de limpieza deseadas. No se espera que una sustitución conservativa de un aminoácido por otro en la variante de proteasa de la invención altere de forma significativa la actividad enzimática o la actividad de eficacia de limpieza de la variante de proteasa. La actividad enzimática o la actividad de eficacia de limpieza de la proteasa resultante puede determinarse fácilmente utilizando ensayos estándar y los ensayos descritos en el presente documento. Por consiguiente, la variante de proteasa puede incluir una o más sustituciones conservativas de aminoácidos en posiciones distintas a las especificadas anteriormente manteniendo la actividad enzimática o la actividad de eficacia de limpieza deseadas. En algunos aspectos, al menos un 10 %, un 20 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, o más (p. ej., al menos un 75 %, un 80 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 %, un 99,5 %) de las sustituciones en una secuencia de aminoácidos de una variante de proteasa comprenden sustituciones de uno o más residuos de aminoácidos en posiciones de aminoácidos distintas a las posiciones 76, 87, 118, 128, 129 y 130 en una secuencia polipeptídica de una variante de proteasa de la invención en relación con SEQ ID NO:1, donde las posiciones de aminoácidos se numeran por alineación con SEQ ID NO:2 y utilizan el esquema de numeración de BPN', con uno o más residuos de aminoácidos, respectivamente, que se encuentran dentro de la misma clase de homología funcional (según lo determinado por cualquier sistema de clasificación adecuado) que los residuos de aminoácidos de la secuencia polipeptídica que reemplaza cada uno.

[0154] Las variaciones de una secuencia polipeptídica de la exposición sustituidas de forma conservativa (p. ej., variante de proteasa de la exposición) incluyen sustituciones de un pequeño porcentaje, en ocasiones menor a un 25 %, un 20 %, un 15 %, un 14 %, un 13 %, un 12 %, un 11 %, un 10 %, un 9 %, un 8 %, un 7 % o un 6 % de los aminoácidos de la secuencia polipeptídica, o menos de un 5 %, un 4 %, un 3 %, un 2 % o un 1 % de los

aminoácidos de la secuencia polipeptídica, con un aminoácido seleccionado de forma conservativa del mismo grupo de sustitución conservativa.

5 [0155] Como se describe con mayor detalle en otro lugar del presente documento (y en los ejemplos expuestos posteriormente), los polipéptidos de la invención pueden tener capacidades de limpieza que pueden compararse con proteasas conocidas, entre las que se incluyen subtilisinas conocidas. Entre los ejemplos de subtilisina proteasas se incluyen, sin carácter limitativo, la subtilisina GG36 de *B. lentus* (también denominada en el presente documento «GCI-P036»), la subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens*, la subtilisina BPN'-Y217L de *B. amyloliquefaciens*, y PB92 de *B. clausii* (también denominada en el presente documento «GCI-P037»). Otra subtilisina proteasa conocida utilizada como referencia para comparación en el presente documento se denomina 10 "GCI-P038".

[0156] La secuencia de aminoácidos de la proteína de la subtilisina GG36 de *B. lentus* madura (GCI-P036) es:

AQSVPWGISRVQAPAAHNRLTGSGVKVAVLDTGIS:THPDLNIRGGASFVPGEPT:QDGNHGHT
THVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGS
PSPSATLEQAVNSATSRGVLVVAASGNSGAGSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFQYAGAG
LDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNVQIRNHL
KNTATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR (SEQ ID NO:1)

[0157] La secuencia de aminoácidos de la proteína de la subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* madura es:

AQSVPYGVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGASMVPSETNPFQDNNSH
GTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPSASLYAVKVLGADGSGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSLG
GPSGSAALKAAVDKAVASGVVVVAAAGNEGTSAGSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQASFS
SVGPELDVMAPGVSIQSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSL
ENTTTKLGDsfyyGKGLINVQAAAQ (SEQ ID NO:2)

15 [0158] La secuencia de aminoácidos de la proteína de la subtilisina BPN'-Y217L de *B. amyloliquefaciens* madura (también denominada "FNA") es:

AQSVPYGVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGASMVPSETNPFQDNNSH
GTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPSASLYAVKVLGADGSGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSLG
GPSGSAALKAAVDKAVASGVVVVAAAGNEGTSAGSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQASFS
SVGPELDVMAPGVSIQSTLPGNKYGALNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSL
ENTTTKLGDsfyyGKGLINVQAAAQ (SEQ ID NO:3)

[0159] La secuencia de aminoácidos de la proteína de la subtilisina proteasa de referencia PB92 (GCI-P037) madura es:

AQSVPWGISRVQAPAAHNRLTGSGVKVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPTQDGNHGHT
HVAGTIAALNNSIGVLGVAPNAELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGS
SPSATLEQAVNSATSRGVLVVAASGNSGAGSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFQYAGAGL
DIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNVQIRNHLKNTATSLGS
20 TNLYGSGLVNAEAATR (SEQ ID NO:4)

[0160] La secuencia de aminoácidos de la proteína de la subtilisina proteasa de referencia GCI-P038 madura es:

AQSVPWGISRVQAPAAHNRLTGSGVKVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPTQDGNHGHT
HVAGTIAALNNSIGVLGVAPNAELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNVMHVNLSLGLQ
APSATLEQAVNSATSRGVLVVAASGNSGAGSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFQYAGAGL
DIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNVQIRNHLKNTATSLGS
TNLYGSGLVNAEAATR (SEQ ID NO:5)

Ácidos nucleicos de la invención

25 [0161] La invención proporciona ácidos nucleicos aislados, de origen no natural o recombinantes (también denominados en el presente documento polinucleótidos), a los que se puede hacer referencia de forma colectiva

como «ácidos nucleicos de la invención» o «polinucleótidos de la invención», que codifican polipéptidos de la invención, tal como se define en las reivindicaciones. Los ácidos nucleicos de la invención, tal como se definen en las reivindicaciones, son útiles en la producción recombinante (p. ej., expresión) de polipéptidos de la invención, normalmente a través de la expresión de un vector de expresión plásmido que comprende una

5 secuencia que codifica el polipéptido de interés o un fragmento del mismo. Como se ha analizado previamente, los polipéptidos incluyen polipéptidos de variante de proteasa, entre los que se incluyen, p. ej., polipéptidos de variante de subtilisina, que tienen actividad enzimática (p. ej., actividad proteolítica) que son útiles en aplicaciones de limpieza y composiciones de limpieza para limpiar un artículo o una superficie (p. ej., la superficie de un artículo) que necesita limpiarse.

10 **[0162]** En un aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico aislado, recombinante, sustancialmente puro o de origen no natural que comprende una secuencia nucleotídica que codifica cualquier polipéptido (incluida cualquier proteína de fusión, etc.) de la invención tal como se define en las reivindicaciones. La invención también proporciona un ácido nucleico aislado, recombinante, sustancialmente puro o de origen no natural que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una combinación de dos o más de cualquier polipéptido de la

15 invención descrito anteriormente y en cualquier otra parte del presente documento.

[0163] Por ejemplo, en el presente documento se expone un ácido nucleico aislado, recombinante, sustancialmente puro o de origen no natural que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una variante de proteasa (p. ej., variante de subtilisina) que tiene actividad proteolítica, comprendiendo dicha variante de proteasa una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85%, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un

20 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 %, un 99,5 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, comprendiendo dicha secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa una sustitución de cada uno de los residuos de aminoácidos en las posiciones 76, 87, 118, 128, 129, 130, 188 y 244 de SEQ ID NO:1 por un residuo de aminoácido diferente, donde cada posición de aminoácido se numera según la numeración de la posición de aminoácido correspondiente en la secuencia de aminoácidos de

25 la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en SEQ ID NO:2, según lo determinado por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* (véase la figura 1). Algunas de dichas variantes de proteasas comprenden una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución del residuo de aminoácido en cada una de las posiciones de aminoácido 76, 87, 118, 128, 129, 130, 188 y 244 de SEQ ID NO:1 por un residuo de

30 aminoácido diferente para producir una variante de proteasa que tiene una carga neta de -2, -1, 0, +1, +2, +3 o +4. En algunas de dichas variantes de proteasas: (i) se sustituye el residuo de aminoácido en cada una de las posiciones 76 y 188 por un residuo de aminoácido de carga negativa seleccionado del grupo que consta de ácido aspártico y ácido glutámico, (ii) se sustituye el residuo de aminoácido en cada una de las posiciones 87, 118 y 244 por un residuo de aminoácido de carga positiva seleccionado del grupo que consta de arginina, histidina y

35 lisina, y (iii) se sustituye el residuo de aminoácido en cada una de las posiciones 128, 129, y 130 por un residuo de aminoácido neutro seleccionado del grupo que consta de serina, treonina, asparagina, glutamina, alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, tirosina y valina. En algunas de dichas variantes de proteasas, donde la secuencia de aminoácidos de dicha variante de proteasa comprende las sustituciones de aminoácidos N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+V244R.

40 **[0164]** En el presente documento también se expone un ácido nucleico aislado, recombinante, sustancialmente puro o de origen no natural que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una variante de proteasa (p. ej., variante de subtilisina) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:6. En otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico aislado, recombinante, sustancialmente puro o de origen no natural que comprende una secuencia polinucleotídica que tiene al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia nucleotídica con la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO:9 o una secuencia polinucleotídica complementaria de la misma. En el presente documento también se expone un ácido nucleico aislado, recombinante, sustancialmente puro o de origen no natural que comprende la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO:9 o una secuencia polinucleotídica complementaria de la misma.

45

50 **[0165]** En el presente documento también se expone un ácido nucleico aislado, recombinante, sustancialmente puro o de origen no natural que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una variante de proteasa (p. ej., variante de subtilisina) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:8. En el presente documento también se expone un ácido nucleico aislado, recombinante, sustancialmente puro o de origen no natural que comprende una secuencia polinucleotídica que tiene al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia nucleotídica con la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO:11 o una secuencia polinucleotídica complementaria de la misma. En el presente documento también se expone un ácido nucleico aislado, recombinante, sustancialmente puro o de origen no natural que comprende la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO:11 o una secuencia polinucleotídica complementaria de la misma.

55

60 **[0166]** En el presente documento también se expone un ácido nucleico aislado, recombinante, sustancialmente puro o de origen no natural que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una variante de proteasa (p. ej., variante de subtilisina) que tiene actividad proteolítica, comprendiendo dicha variante de proteasa una

5 secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85%, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 %, un 99,5 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, comprendiendo dicha secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa una sustitución del residuo de aminoácido en cada una de las posiciones de aminoácido 76, 87, 118, 128, 129 y 130 en relación con SEQ ID NO:1 por un residuo de aminoácido diferente, y (i) un residuo de serina en la posición de aminoácido 188 o una sustitución del residuo de serina en la posición 188 por un residuo de aminoácido diferente que no sea un residuo de ácido aspártico y/o (ii) un residuo de asparagina en la posición de aminoácido 248 o una sustitución del residuo de asparagina en la posición 248 por un residuo de aminoácido diferente que no sea un residuo de arginina, donde las posiciones de aminoácidos se numeran según la numeración de las posiciones de aminoácido correspondientes en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' mostrada en SEQ ID NO:2, según lo determinado por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN'. Algunas de dichas variantes de proteasas codificadas comprenden una secuencia de aminoácidos que comprende un residuo de serina en la posición de aminoácido 188 o un residuo de arginina en la posición de aminoácido 248. Algunas de dichas variantes de proteasas comprenden (i) un residuo de serina en la posición 188 o una sustitución del residuo de serina en la posición 188 por un residuo de aminoácido diferente que no sea un residuo de ácido aspártico, y (ii) una sustitución del residuo de asparagina en la posición 248 por un residuo de arginina. Algunas de dichas variantes de proteasas comprenden (i) una sustitución del residuo de serina en la posición 188 por un residuo de ácido aspártico, y (ii) un residuo de asparagina en la posición 248 o una sustitución del residuo de asparagina en la posición 248 por un residuo de aminoácido diferente que no sea un residuo de arginina. Algunas de dichas variantes de proteasas comprenden una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución del residuo de aminoácido en cada una de las posiciones de aminoácido 76, 87, 118, 128, 129 y 130 en relación con SEQ ID NO:1 por un aminoácido diferente para producir una variante de proteasa que tiene una carga neta de -2, -1, 0, +1, +2, +3 o +4. En algunas de dichas variantes de proteasas: (i) se sustituye el residuo de aminoácido en la posición 76 por un residuo de aminoácido de carga negativa seleccionado del grupo que consta de ácido aspártico y ácido glutámico, (ii) se sustituye el residuo de aminoácido en cada una de las posiciones 87 y 118 por un residuo de aminoácido de carga positiva seleccionado del grupo que consta de arginina, histidina y lisina, y (iii) se sustituye el residuo de aminoácido en cada una de las posiciones 128, 129 y 130 por un residuo de aminoácido sin carga seleccionado del grupo que consta de serina, treonina, asparagina, glutamina, alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, tirosina y valina.

[0167] En un aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico aislado, recombinante, sustancialmente puro o de origen no natural que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una variante de proteasa (p. ej., variante de subtilisina) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:7.

35 **[0168]** En el presente documento también se expone un ácido nucleico aislado, recombinante, sustancialmente puro o de origen no natural que comprende una secuencia polinucleotídica que tiene al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia nucleotídica con la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO:10 o una secuencia polinucleotídica complementaria de la misma. En el presente documento también se expone un ácido nucleico aislado, recombinante, sustancialmente puro o de origen no natural que comprende la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO:10 o una secuencia polinucleotídica complementaria de la misma.

[0169] También se expone un ácido nucleico aislado, recombinante, sustancialmente puro o de origen no natural que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una variante de proteasa que tiene actividad proteolítica, comprendiendo dicha variante de proteasa (p. ej., variante de subtilisina) una secuencia de aminoácidos que:

45 (a) difiere de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 en no más de 25, no más de 20, no más de 15, no más de 14, no más de 13, no más de 12, no más de 11, no más de 10, no más de 9, no más de 8, no más de 7, o no más de 6 residuos de aminoácidos; y
 (b) comprende una sustitución del residuo de aminoácido en cada una de las posiciones de aminoácido 76, 87, 118, 128, 129 y 130 de SEQ ID NO:1 por un residuo de aminoácido diferente, y (i) un residuo de serina en la posición de aminoácido 188 o una sustitución del residuo de serina en la posición 188 por un residuo de aminoácido diferente que no sea un residuo de ácido aspártico y/o (ii) un residuo de asparagina en la posición 248 o una sustitución del residuo de asparagina en la posición 248 por un residuo de aminoácido diferente que no sea un residuo de arginina, donde las posiciones de aminoácido se numeran según la numeración de las posiciones de aminoácido correspondientes en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en SEQ ID NO:2, según lo determinado por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*. Algunas de dichas variantes de proteasas codificadas comprenden una secuencia de aminoácidos que comprende (i) un residuo de serina en la posición de aminoácido 188 o una sustitución del residuo de serina en la posición 188 por un residuo de aminoácido diferente que no sea un residuo aspártico, y (ii) una sustitución del residuo de asparagina en la posición 248 por un residuo de arginina. Algunas de dichas variantes de proteasas codificadas comprenden una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución del

residuo de serina en la posición 188 por un residuo de ácido aspártico, y (ii) un residuo de asparagina en la posición 248 o una sustitución del residuo de asparagina en la posición 248 por un residuo de aminoácido diferente que no sea un residuo de arginina.

- 5 **[0170]** En el presente documento también se expone una variante de proteasa aislada, recombinante, sustancialmente pura o de origen no natural (p. ej., variante de subtilisina) que tiene actividad proteolítica, comprendiendo dicha variante de proteasa una secuencia de aminoácidos que (a) difiere de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:1 en no más de 25, no más de 20, no más de 15, no más de 14, no más de 13, no más de 12, no más de 11, no más de 10, no más de 9 o no más de 8 residuos de aminoácidos, y (b) comprende una sustitución del residuo de aminoácido en cada una de las posiciones de aminoácidos 76, 87, 10 118, 128, 129, 130, 188 y 244 de SEQ ID NO:1, donde las posiciones de aminoácido se numeran según la numeración de las posiciones de aminoácido correspondientes en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en SEQ ID NO:2, según lo determinado por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.
- 15 **[0171]** En el presente documento también se expone un ácido nucleico aislado, recombinante, sustancialmente puro o de origen no natural que comprende una secuencia polinucleotídica que tiene al menos un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 %, un 99,5 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia polinucleotídica de cualquiera de SEQ ID NO:9, 10 y 11.
- 20 **[0172]** Los ácidos nucleicos de la invención pueden generarse utilizando cualquier técnica adecuada de síntesis, manipulación y/o aislamiento, o combinaciones de las mismas. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede producirse utilizando técnicas de síntesis de ácido nucleico estándar, como técnicas de síntesis en fase sólida que son ampliamente conocidas por los expertos en la materia. En dichas técnicas, normalmente se sintetizan fragmentos de hasta 50 o más bases nucleotídicas, que después se unen (p. ej., con métodos de 25 ligadura química o enzimática, o métodos de recombinación mediante polimerasa) para formar básicamente cualquier secuencia de ácido nucleico continuada que se desee. La síntesis de los ácidos nucleicos de la invención también puede facilitarse (o, de forma alternativa, conseguirse) por síntesis química utilizando, p. ej., el método con fosoramidita clásico, que se describe, p. ej., en Beaucage et al. (1981) *Tetrahedron Letters* 22:1859-69, o el método descrito por Matthes et al. (1984) *EMBO J.* 3:801-05, p. ej., como se suele practicar en métodos sintéticos automatizados. Los ácidos nucleicos de la invención también pueden producirse utilizando un 30 sintetizador de ADN automático. Pueden adquirirse ácidos nucleicos personalizados de una variedad de fuentes comerciales, como The Midland Certified Reagent Company (mrcr@oligos.com), the Great American Gene Company (página web para todo el mundo: genco.com), Operon Technologies Inc. (Alameda, Calif.) y DNA2.0 (Menlo Park, CA). Otras técnicas para sintetizar ácidos nucleicos y principios relacionados se describen, p. ej., en Itakura et al., *Annu. Rev. Biochem.* 53:323 (1984) e Itakura et al., *Science* 198:1056 (1984).
- 35 **[0173]** Las técnicas de ADN recombinantes útiles en la modificación de ácidos nucleicos son ampliamente conocidas en el ámbito de especialización. Por ejemplo, técnicas como la digestión con endonucleasas de restricción, la ligadura, la transcripción inversa y la producción de ADNc, así como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) son conocidas y ampliamente utilizadas por los expertos en la materia. Algunas técnicas de tecnología de ADN recombinante útiles y principios relacionados con las mismas se 40 describen en Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, así como en su tercera edición (2001); Ausubel et al. (1994-1999) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers; y Berger y Kimmel, "Guide to Molecular Cloning Techniques," en *Methods in Enzymol.* Vol. 152, Acad. Press, Inc., San Diego, CA.
- 45 **[0174]** Los nucleótidos de la invención también pueden obtenerse cribando bibliotecas de ADNc (generadas mediante técnicas de mutagénesis utilizadas en el ámbito de especialización, incluidas las descritas en el presente documento) utilizando una o más sondas de oligonucleótidos que puedan hibridarse con polinucleótidos que codifican uno o más polipéptidos de variante de proteasa de la invención, o que puedan amplificarlos con PCR. Los procedimientos para cribar y aislar clones de ADNc y los procedimientos de amplificación con PCR son ampliamente conocidos por los expertos en la materia y se describen en Berger, Sambrook, y Ausubel, todos 50 mencionados con anterioridad. Algunos ácidos nucleicos de la invención pueden obtenerse alterando la columna vertebral del polinucleótido de origen natural (p. ej., que codifica una enzima o proteasa original) mediante, p. ej., un procedimiento de mutagénesis conocido (p. ej., mutagénesis de sitio dirigido, mutagénesis de saturación de sitio y recombinación *in vitro*).

Métodos para elaborar variantes de proteasas modificadas de la invención

- 55 **[0175]** En el ámbito de especialización se conoce una variedad de métodos que son adecuados para generar polinucleótidos modificados de la invención que codifican variantes de proteasas de la invención, entre los que se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., mutagénesis de saturación de sitio, mutagénesis de rastreo, mutagénesis aleatoria, mutagénesis de sitio dirigido y evolución dirigida, así como otros varios enfoques de recombinación. Los métodos para elaborar polinucleótidos y proteínas modificados (p. ej., variantes de proteasas) incluyen 60 metodologías de barajado de ADN (véase, p. ej., Stemmer WP, 91(22):10747-51 (1994)), métodos basados en la recombinación de genes no homóloga, p. ej., ITCHY (Ostermeier et al., 7(10):2139-44 (1999)), SCRACHY (Lutz

- et al. 98(20):11248-53 (2001)), SHIPREC (Sieber et al., 19(5):456-60 (2001)), yNRR (Bittker et al., 20(10):1024-9 (2001); Bittker et al., 101(18):7011-6 (2004)), y métodos que se fundamentan en el uso de oligonucleótidos para insertar delecciones, inserciones y/o mutaciones aleatorias y dirigidas (Ness et al., 20(12):1251-5 (2002); Coco et al., 20(12):1246-50 (2002); Zha et al., 4(1):34-9 (2003), Glaser et al., 149(12):3903-13 (1992), y Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(8):3581-5 (1992), Yáñez et al., 32(20):e158 (2004), Osuna et al., 32(17):e136 (2004), Gaytán et al., 29(3):E9 (2001), y Gaytán et al., 30(16):e84 (2002)).

Vectores, células y métodos para producir variantes de proteasas de la invención

- [0176]** La presente invención proporciona vectores aislados o recombinantes que comprenden al menos un polinucleótido de la invención descrito en el presente documento (p. ej., un polinucleótido que codifica una variante de proteasa de la invención descrito en el presente documento), casetes de expresión o vectores de expresión aislados o recombinantes que comprenden al menos un ácido nucleico o polinucleótido de la invención, constructos de ADN aislados, sustancialmente puros o recombinantes que comprenden al menos un ácido nucleico o polinucleótido de la invención, células aisladas o recombinantes que comprenden al menos un polinucleótido de la invención, cultivos celulares que comprenden células que comprenden al menos un polinucleótido de la invención, cultivos celulares que comprenden al menos un ácido nucleico o polinucleótido de la invención, y composiciones que comprenden uno o más de dichos vectores, ácidos nucleicos, vectores de expresión, casetes de expresión, constructos de ADN, células, cultivos celulares o cualquier combinación o mezcla de los mismos.

- [0177]** En un aspecto, la invención proporciona células recombinantes que comprenden al menos un vector (p. ej., vector de expresión o constructo de ADN) de la invención que comprende al menos un ácido nucleico o polinucleótido de la invención, como se define en las reivindicaciones. Algunas de dichas células recombinantes se transforman o se transfectan con dicho al menos un vector. Dichas células se denominan normalmente células huésped. Algunas de dichas células comprenden células bacterianas, entre las que se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., las células de *Bacillus sp.*, como, p. ej., las células de *Bacillus subtilis*. La invención también proporciona células recombinantes (p. ej., células huésped recombinantes) que comprenden al menos una variante de proteasa de la invención.

- [0178]** En un aspecto, la invención proporciona un vector que comprende un ácido nucleico o polinucleótido de la invención. En un aspecto, el vector es un vector de expresión o un casete de expresión en el que una secuencia polinucleotídica de la invención que codifica una variante de proteasa de la invención se encuentra ligada de forma operativa a un segmento de ácido nucleico, o segmentos adicionales, necesarios para una expresión genética eficiente (p. ej., un promotor ligado de forma operativa al polinucleótido de la invención que codifica una variante de proteasa de la invención). Un vector puede incluir un terminador de la transcripción y/o un gen de selección, como un gen de resistencia a los antibióticos que permite el mantenimiento continuo en el cultivo de células huésped infectadas con plásmidos mediante el cultivo en medios antimicrobianos.

- [0179]** Un vector de expresión puede derivarse de ADN plasmídico o viral o, en modos de realización alternativos, contiene elementos de ambos. Algunos ejemplos de vectores incluyen, sin carácter limitativo, pXX, pC194, pJH101, pE194, pHP13 (Harwood y Cutting (eds.), Molecular Biological Methods for Bacillus, John Wiley & Sons (1990), véase, p. ej., el capítulo 3; los plásmidos de replicación adecuados para *B. subtilis* incluyen los listados en la pág. 92; Perego, M. (1993) Integrational Vectors for Genetic Manipulations in *Bacillus subtilis*, págs. 615-624; A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, y R. Losick (ed.), *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

- [0180]** Para la expresión y la producción de una proteína de interés (p. ej., variante de proteasa) en una célula, al menos un vector de expresión que comprende al menos una copia de un polinucleótido que codifica la proteasa modificada, y que preferiblemente comprende múltiples copias, se transforma en la célula en condiciones adecuadas para la expresión de la proteasa. En un aspecto, una secuencia polinucleotídica que codifica la variante de proteasa (así como otras secuencias incluidas en el vector) se integra en el genoma de la célula huésped, mientras que en otro aspecto, un vector plasmídico que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una variante de proteasa permanece como elemento extracromosómico autónomo en el interior de la célula. La invención proporciona tanto elementos de ácido nucleico extracromosómico como secuencias nucleotídicas entrantes que están integradas en el genoma de la célula huésped. Los vectores descritos en el presente documento son útiles para la producción de las variantes de proteasas de la invención. En un aspecto, un constructo polinucleotídico que codifica la variante de proteasa se encuentra presente en un vector de integración que permite la integración y, opcionalmente, la amplificación del polinucleótido que codifica la variante de proteasa en el cromosoma bacteriano. Los ejemplos de sitios de integración son ampliamente conocidos por los expertos en la materia. En algunos modos de realización, la transcripción de un polinucleótido que codifica una variante de proteasa de la invención es efectuada por un promotor que es el promotor natural para la proteasa precursora seleccionada. En algunos modos de realización, el promotor es heterólogo a la proteasa precursora, pero es funcional en la célula huésped. Concretamente, entre los ejemplos de promotores adecuados para su uso en células huésped bacterianas se incluyen, sin carácter limitativo, los promotores amyE, amyQ, amyL, pstS, sacB, pSPAC, pAprE, pVeg, pHall, el promotor del gen de amilasa maltogénica de *B. stearothermophilus*, el gen de amilasa (BAN) de *B. amyloliquefaciens*, el gen de proteasa alcalina de *B.*

subtilis, el gen de proteasa alcalina de *B. clausii*, el gen de xilosidasa de *B. pumilis*, el cryIIIA de *B. thuringiensis* y el gen de alfa-amilasa de *B. licheniformis*. Entre los promotores adicionales se incluyen, sin carácter limitativo, el promotor A4, así como los promotores P_R o P_L de lambda, y los promotores lac trp o tac de *E. coli*.

5 **[0181]** Las variantes de proteasas de la invención se pueden producir en células huésped de cualquier microorganismo grampositivo adecuado, incluidos hongos y bacterias. Por ejemplo, en algunos modos de realización, la variante de proteasa se produce en células huésped de origen fúngico y/o bacteriano. En algunos modos de realización, las células huésped son *Bacillus sp.*, *Streptomyces sp.*, *Escherichia sp.* o *Aspergillus sp.* En algunos modos de realización, las variantes de proteasas son producidas por células huésped de *Bacillus sp.* Entre los ejemplos de células huésped de *Bacillus sp.* que son de utilidad en la producción de variantes de proteasas de la invención se incluyen, sin carácter limitativo, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. pumilis*, *B. thuringiensis*, *B. clausii*, *B. megaterium*, así como otros organismos del género *Bacillus*. En algunos modos de realización, las células huésped de *B. subtilis* son útiles para la producción de variantes de proteasas. Las patentes de los Estados Unidos con número 5,264,366 y 4,760,025 (RE 34,606) describen varias cepas huésped de *Bacillus* que pueden utilizarse para producir variantes de proteasas de la invención, aunque puede utilizarse otras cepas adecuadas.

10 **[0182]** Varias cepas bacterianas industriales que pueden utilizarse para producir variantes de proteasas de la invención incluyen cepas de *Bacillus sp.* no recombinantes (esto es, naturales), así como variantes de cepas de origen natural y/o cepas recombinantes. En algunos modos de realización, la cepa huésped es una cepa recombinante, donde un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés se ha introducido en el huésped. En algunos modos de realización, la cepa huésped es una cepa huésped de *B. subtilis* y, en particular, una cepa huésped de *Bacillus subtilis* recombinante. Se conocen numerosas cepas de *B. subtilis*, entre las que se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., 1A6 (ATCC 39085), 168 (1A01), SB19, W23, Ts85, B637, PB1753 a PB1758, PB3360, JH642, 1A243 (ATCC 39,087), ATCC 21332, ATCC 6051, MI113, DE100 (ATCC 39,094), 25 GX4931, PBT 110 y PEP 211 (véase, p. ej., Hoch et al., Genetics 73:215-228 (1973)) (véase también las patentes de los Estados Unidos con número 4,450,235 y 4,302,544, así como EP 0134048). El uso de *B. subtilis* como células huésped de expresión es ampliamente conocido en el ámbito de especialización (véase, p. ej., Palva et al., Gene 19:81-87 (1982); Fahnestock and Fischer, J. Bacteriol., 165:796-804 (1986); y Wang et al., Gene 69:39-47 (1988)).

30 **[0183]** En algunos modos de realización, la célula huésped de *Bacillus* es una *Bacillus sp.* que incluye una mutación o delección en al menos uno de los siguientes genes: *degU*, *degS*, *degR* y *degQ*. Preferiblemente, la mutación se produce en un gen *degU*, y más preferiblemente la mutación es *degU(Hy)32*. Véase, p. ej., Msadek et al., J. Bacteriol. 172:824-834 (1990) y Olmos et al., Mol. Gen. Genet. 253:562-567 (1997)). Una cepa huésped preferida es una *Bacillus subtilis* que porta una mutación *degU32(Hy)*. En algunos modos de realización, el huésped de *Bacillus* comprende una mutación o delección en *scoC4* (véase, p. ej., Caldwell et al., J. Bacteriol. 35 183:7329-7340 (2001)); *spoIIIE* (véase, p. ej., Arigoni et al., Mol. Microbiol. 31:1407-1415 (1999)); y/o *oppA* u otros genes del operón *opp* (véase, p. ej., Perego et al., Mol. Microbiol. 5:173-185 (1991)). De hecho, se contempla que cualquier mutación en el operón *opp* que cause el mismo fenotipo que una mutación en el gen *oppA* se utilizará en algunos modos de realización de la cepa de *Bacillus* alterada de la invención. En algunos modos de realización, estas mutaciones ocurren de forma independiente, mientras que en otros modos de realización se dan combinaciones de mutaciones. En algunos modos de realización, una célula huésped de *Bacillus* que puede utilizarse para producir una variante de proteasa de la invención es una cepa huésped de *Bacillus* que ya incluye una mutación en uno o más de los genes anteriormente mencionados. Además, son de utilidad las células huésped de *Bacillus sp.* que comprenden mutaciones y/o delecciones de genes de proteasa 45 endógenos. En algunos modos de realización, la célula huésped de *Bacillus* comprende una delección de los genes *aprE* y *nprE*. En otros modos de realización, la célula huésped de *Bacillus sp.* comprende una delección de 5 genes de proteasa, mientras que en otros modos de realización, la célula huésped de *Bacillus sp.* comprende una delección de 9 genes de proteasa (véase, p. ej., la solicitud de patente de los Estados Unidos con número 2005/0202535).

50 **[0184]** Las células huésped se transforman con al menos un ácido nucleico que codifica al menos una variante de proteasa de la invención utilizando cualquier método adecuado conocido en el ámbito de especialización. Tanto si el ácido nucleico se incorpora en un vector como si se utiliza sin la presencia de ADN plasmídico, este se introduce normalmente en un microorganismo, en algunos modos de realización, preferiblemente una célula de *E. coli* o una célula de *Bacillus* competente. Los métodos para introducir un ácido nucleico (p. ej., ADN) en 55 células de *Bacillus* o células de *E. coli* utilizando vectores o constructos de ADN plasmídico y transformando dichos vectores o constructos de ADN plasmídico en dichas células son ampliamente conocidos. En algunos modos de realización, posteriormente los plásmidos se aíslan de células de *E. coli* y se transforman en células de *Bacillus*. No obstante, no es esencial utilizar microorganismos de intervención como *E. coli*, y en algunos modos de realización, un vector o constructo de ADN se introduce directamente en un huésped de *Bacillus*.

60 **[0185]** Los expertos en la materia están bien informados de métodos adecuados para introducir secuencias de ácido nucleico o polinucleotídicas de la invención en células de *Bacillus* (véase, p. ej., Ferrari et al., "Genetics," in Harwood et al. (ed.), *Bacillus*, Plenum Publishing Corp. (1989), pp. 57-72; Saunders et al., J. Bacteriol. 157:718-

726 (1984); Hoch et al., J. Bacteriol. 93:1925-1937 (1967); Mann et al., Current Microbiol. 13:131-135 (1986); y Holubova, Folia Microbiol. 30:97 (1985); Chang et al., Mol. Gen. Genet. 168:11-115 (1979); Vorobjeva et al., FEMS Microbiol. Lett. 7:261-263 (1980); Smith et al., Appl. Env. Microbiol. 51:634 (1986); Fisher et al., Arch. Microbiol. 139:213-217 (1981); y McDonald, J. Gen. Microbiol. 130:203 (1984)). De hecho, dichos métodos como la transformación, incluyendo la transformación y la congregación de protoplastos, la transducción y la fusión de protoplastos, son ampliamente conocidos y adecuados para su utilización en la presente invención. Se utilizan métodos de transformación para introducir un vector o constructo de ADN que comprende un ácido nucleico que codifica una variante de proteasa de la invención en una célula huésped. Los métodos conocidos en el ámbito de especialización para transformar células de *Bacillus* incluyen métodos como transformación de recuperación de un marcador plasmídico, que conlleva la absorción de un plásmido donante por células competentes que portan un plásmido residente parcialmente homólogo (Contente et al., Plasmid 2:555-571 (1979); Haima et al., Mol. Gen. Genet. 223:185-191 (1990); Weinrauch et al., J. Bacteriol. 154:1077-1087 (1983); y Weinrauch et al., J. Bacteriol. 169:1205-1211 (1987)). En este método, el plásmido donante entrante se recombina con la región homóloga del plásmido «auxiliar» residente en un proceso que imita la transformación cromosómica.

[0186] Además de los métodos utilizados comúnmente, en algunos modos de realización, las células huésped se transforman directamente con un vector o constructo de ADN que comprende un ácido nucleico que codifica una variante de proteasa de la invención (esto es, no se utiliza una célula intermedia para amplificar o procesar de cualquier otra forma el vector o constructo de ADN antes de su introducción en la célula huésped). La introducción del vector o constructo de ADN de la invención en la célula huésped incluye los métodos físicos y químicos conocidos en el ámbito de especialización para introducir una secuencia de ácido nucleico (p. ej., secuencia de ADN) en una célula huésped sin inserción en un plásmido o vector. Dichos métodos incluyen, sin carácter limitativo, precipitación con cloruro de calcio, electroporación, ADN desnudo, liposomas y similares. En modos de realización adicionales, el vector o los constructos de ADN se cotransforman con un plásmido sin insertarse en el plásmido. En otros modos de realización, se deleciona un marcador selectivo de la cepa de *Bacillus* alterada utilizando métodos conocidos en el ámbito de especialización (véase Stahl et al., J. Bacteriol. 158:411-418 (1984); y Palmeros et al., Gene 247:255-264 (2000)).

[0187] En algunos modos de realización, las células transformadas de la presente invención se cultivan en medios nutrientes convencionales. Las condiciones de cultivo específicas adecuadas, como la temperatura, el pH y similares son conocidas por los expertos en la materia. Además, algunas condiciones de cultivo pueden encontrarse en la literatura científica, como en Hopwood (2000) Practical Streptomyces Genetics, John Innes Foundation, Norwich UK; Hardwood et al., (1990) Molecular Biological Methods for Bacillus, John Wiley y de la American Type Culture Collection (ATCC). En un aspecto, la invención proporciona un cultivo (p. ej., cultivo celular) que comprende al menos una variante de proteasa o al menos un ácido nucleico de la invención. También se proporciona una composición que comprende al menos un ácido nucleico, vector o constructo de ADN de la invención.

[0188] En algunos modos de realización, las células huésped transformadas con al menos una secuencia polinucleotídica que codifica al menos una variante de proteasa de la invención se cultivan en un medio nutriente adecuado en condiciones que permiten la expresión de la proteasa presente, tras lo cual se recupera la proteasa resultante del cultivo. El medio utilizado para cultivar las células comprende cualquier medio convencional adecuado para el cultivo de las células huésped, como medios complejos o mínimos que contienen suplementos apropiados. Los medios adecuados han sido comercializados por proveedores comerciales o pueden prepararse de acuerdo con las fórmulas publicadas (p. ej., en catálogos de la American Type Culture Collection). En algunos modos de realización, la proteasa producida por las células se recupera del medio de cultivo por procedimientos convencionales, incluyendo, sin carácter limitativo, p. ej., separar las células huésped del medio por centrifugación o filtración, precipitar los componentes proteínicos del sobrenadante o filtrado mediante una sal (p. ej., sulfato de amonio), purificación cromatográfica (p. ej., intercambio de iones, filtración por gel, afinidad, etc.). Puede utilizarse cualquier método adecuado para recuperar o purificar una variante de proteasa de la invención.

[0189] En un aspecto, una variante de proteasa producida por una célula huésped recombinante se secreta en el medio de cultivo. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio que facilita la purificación puede utilizarse para facilitar la purificación de proteínas solubles. Un vector o constructo de ADN que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una variante de proteasa puede comprender también una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio que facilita la purificación para facilitar la purificación de la variante de proteasa (véase, p. ej., Kroll, D.J. et al., DNA Cell Biol. 12:441-53 (1993)). Dichos dominios que facilitan la purificación incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., péptidos quelantes de metal como módulos histidina-triptófano que permiten la purificación en metales inmovilizados (Porath J., Protein Expr. Purif. 3:263-281 (1992)), dominios de proteína A que permiten la purificación en inmunoglobulina inmovilizada, y el dominio utilizado en el sistema de purificación por afinidad/extensión FLAGS (Immunex Corp., Seattle, WA). La inclusión de una secuencia de enlace escindible como un Factor XA o enterocinasa (Invitrogen, San Diego, CA) entre el dominio de purificación y la proteína heteróloga también resulta de utilidad para facilitar la purificación.

[0190] Son ampliamente conocidos los ensayos para detectar y medir la actividad enzimática de una enzima, como una variante de proteasa de la invención. También son ampliamente conocidos por los expertos en la materia varios ensayos para detectar y medir la actividad de las proteasas, como, p. ej., las variantes de

proteasas de la invención. En concreto, se dispone de ensayos para medir la actividad de proteasa que se basan en la liberación de péptidos solubles en ácido de caseína o hemoglobina, medida como absorbancia a 280 nm o de forma colorimétrica utilizando el método de Folin (véase, p. ej., Bergmeyer et al., "Methods of Enzymatic Analysis" vol. 5, Peptidasas, Proteinases and their Inhibitors, Verlag Chemie, Weinheim (1984)). Otros ejemplos de ensayos implican la solubilización de sustratos cromogénicos (véase, p. ej., Ward, "Proteinases," en Fogarty (ed.), Microbial Enzymes and Biotechnology, Applied Science, London, (1983), pp. 251-317). Otros ejemplos de ensayos incluyen, sin carácter limitativo, el ensayo con succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-para nitroanilida (SAAPFpNA) y el ensayo con ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfónico (ensayo TBNS). Numerosas referencias adicionales conocidas por los expertos en la materia proporcionan métodos adecuados (véase, p. ej., Wells et al., Nucleic Acids Res. 11:7911-7925 (1983); Christianson et al., Anal. Biochem. 223:119 -129 (1994); y Hsia et al., Anal Biochem. 242:221-227 (1999)).

[0191] Puede utilizarse una variedad de métodos para determinar el nivel de producción de una proteasa madura (p. ej., variante de proteasa madura de la invención) en una célula huésped. Dichos métodos incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., métodos que utilizan anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para la proteasa. Entre los ejemplos de métodos se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., los ensayos de inmunoabsorción enzimática (ELISA, por sus siglas en inglés), los radioinmunoensayos (RIA, por sus siglas en inglés), los inmunoensayos fluorescentes (FIA, por sus siglas en inglés) y la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés). Estos y otros ensayos son ampliamente conocidos en el ámbito de especialización (véase, p. ej., Maddox et al., J. Exp. Med. 158:1211 (1983)).

[0192] En otro aspecto, la invención proporciona métodos para elaborar o producir una variante de proteasa madura de la invención, tal como se define en las reivindicaciones. Una variante de proteasa madura no incluye un péptido señal o una secuencia propeptídica. Algunos de dichos métodos comprenden la elaboración o producción de una variante de proteasa de la invención en una célula huésped bacteriana recombinante, como, p. ej., una célula de *Bacillus* sp. incluida, p. ej., una célula de *Bacillus subtilis*. En un aspecto, la invención proporciona un método para producir una variante de proteasa de la invención, comprendiendo el método el cultivo de una célula huésped recombinante que comprende un vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica una variante de proteasa de la invención en condiciones propicias para la producción de la variante de proteasa. Algunos de dichos métodos comprenden también recuperar la variante de proteasa del cultivo.

[0193] En un aspecto, la invención proporciona un método para producir una variante de proteasa de la invención, comprendiendo el método: (a) introducir un vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica una variante de proteasa de la invención en una población celular (p. ej., células bacterianas, como células de *Bacillus subtilis*); y (b) cultivar las células en un medio de cultivo en condiciones propicias para producir la variante de proteasa codificada por el vector de expresión. Algunos de dichos métodos comprenden también: (c) aislar la variante de proteasa de las células o del medio de cultivo.

Composiciones de limpieza de la invención

[0194] En otro aspecto, la invención proporciona una composición (p. ej., una composición de limpieza) que comprende uno o más polipéptidos (p. ej., variantes de proteasas) de la invención, tal como se define en las reivindicaciones. Dichas composiciones pueden comprender al menos un excipiente o portador y/u otro sustituyente, componente o material. Tal como se analiza en mayor profundidad en el presente documento, los polipéptidos de la invención, entre los que se incluyen las variantes de proteasas de la invención, son de utilidad en una variedad de aplicaciones de limpieza, incluidas aplicaciones de limpieza de la colada, aplicaciones de lavado de la vajilla de forma automática, aplicaciones de lavado de la vajilla a mano, aplicaciones de limpieza para superficies duras y otras aplicaciones descritas en el presente documento. En consecuencia, por ejemplo, en un aspecto, la invención proporciona composiciones de limpieza que comprenden al menos un polipéptido (p. ej., variante de proteasa) de la invención, tal como se define en las reivindicaciones. Como se ha indicado previamente, dichas composiciones de limpieza incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., composiciones detergentes para el lavado de la vajilla de forma automática y manual, composiciones detergentes para la colada (incluyendo, p. ej., composiciones detergentes para la colada líquidas y en polvo), composiciones de limpieza para superficies duras (incluyendo, sin carácter limitativo, p. ej., superficies duras de un artículo que no sea un artículo de vajilla, un artículo que no sea un artículo de mesa, una mesa, un tablero, un mueble, una pared, el suelo, el techo, etc.). Dichas composiciones de limpieza, que son útiles en métodos para limpiar un artículo o una superficie que sea necesario limpiar, pueden comprender, p. ej., sin carácter limitativo, al menos un excipiente o portador y/u otro sustituyente, componente o material. En un aspecto, la invención proporciona cualquier composición de la invención (p. ej., composición de limpieza o composición detergente) descrita en el presente documento y a lo largo del mismo, comprendiendo dicha composición cualquier polipéptido de la invención (p. ej., cualquier variante de proteasa o variante de subtilisina de la invención) descrito en el presente documento y a lo largo del mismo, pero donde dicha composición no es una composición para el lavado de la vajilla de forma automática (p. ej., composición detergente para el lavado de la vajilla de forma automática).

[0195] Salvo que se indique otra cosa, todos los niveles de componentes o composiciones que se proporcionan en la presente memoria se realizan en referencia al nivel activo de dicho componente o composición y no

incluyen impurezas, como por ejemplo subproductos o disolventes residuales, que pueden estar presentes en fuentes comercializadas. Los pesos de los componentes enzimáticos están basados en la proteína activa total. Todos los porcentajes y ratios se calculan en peso salvo que se indique otra cosa. Todos los porcentajes y ratios se calculan en función de la composición total salvo que se indique otra cosa. En las composiciones detergentes ejemplificadas, los niveles de enzimas se expresan por enzima pura en peso de la composición total y, a menos que se indique otra cosa, los componentes detergentes se expresan en peso de las composiciones totales.

[0196] Tal como se indica en el presente documento, en algunos modos de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención pueden comprender también uno o más materiales adjuntos entre los que se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., uno o más surfactantes, mejoradores, blanqueadores, activadores del blanqueado, catalizadores del blanqueado, otras enzimas, sistemas de estabilizadores de enzimas, quelantes, abrillantadores ópticos, polímeros quitamanchas, agentes de transferencia de tintes, dispersantes, supresores de jabonaduras, tintes, perfumes, colorantes, sales de relleno, hidrótrofos, fotoactivadores, fluorescentes, suavizantes de tejidos, surfactantes hidrolizables, conservantes, antioxidantes, agentes contra el encogimiento, agentes contra la formación de arrugas, germicidas, fungicidas, motas de color, agentes para el cuidado de la plata, contra la pérdida de lustre y/o contra la corrosión, fuentes de alcalinidad, agentes solubilizantes, portadores, coadyuvantes de elaboración, pigmentos, abrillantador (p. ej., un abrillantador que contenga al menos un surfactante para evitar la formación de gotas de agua haciendo que el agua se drene de la superficie del artículo que se está limpiando en una fina lámina, en lugar de formando gotas) y/o agentes de control del pH (véase, p. ej., las patentes de los Estados Unidos con número 6,610,642, 6,605,458, 5,705,464, 5,710,115, 5,698,504, 5,695,679, 5,686,014 y 5,646,101). A continuación, se ejemplifican de forma detallada algunos modos de realización de materiales específicos que constituyen la composición de limpieza. Si algún material de limpieza adjunto no es compatible con una variante de proteasa de la presente invención en una composición de limpieza deseada, se utiliza un método adecuado para mantener separados el material de limpieza adjunto y la(s) variante(s) de proteasa(s) (esto es, no en contacto entre sí) hasta que la combinación de los dos componentes sea apropiada. Dichos métodos de separación incluyen cualquier método adecuado conocido en el ámbito de especialización (p. ej., cápsulas recubiertas de gelatina, encapsulación, pastillas, separación física, etc.).

[0197] Las composiciones de limpieza de la presente invención se emplean, de forma ventajosa, por ejemplo, en aplicaciones de lavado de la colada, aplicaciones de limpieza de superficies duras, aplicaciones de lavado de la vajilla de forma manual o a mano, aplicaciones de lavado de la vajilla de forma automática, aplicaciones de limpieza de lentes oculares, así como aplicaciones cosméticas, como para el lavado de dentaduras, los dientes, el pelo y la piel. Debido a las ventajas únicas de la efectividad incrementada en soluciones con temperaturas más bajas, las enzimas de variantes de proteasas de la presente invención son adecuadas para aplicaciones de lavado de la colada y aplicaciones de lavado de la vajilla, incluidas las aplicaciones de lavado de la vajilla de forma automática y a mano. Además, las enzimas de variantes de proteasas de la presente invención son de utilidad en composiciones sólidas, líquidas, granuladas y/o en gel, incluidas formulaciones y/o composiciones detergentes sólidas, líquidas, granuladas y/o en gel.

[0198] Las variantes de proteasas de la presente invención también son de utilidad en composiciones de productos de limpieza aditivos. En algunos modos de realización, una variante de proteasa de la invención es útil en métodos y aplicaciones de limpieza con solución a baja temperatura. En un aspecto, la invención proporciona composiciones de productos aditivos de limpieza que incluyen al menos una enzima de variante de proteasa de la presente invención y que son ideales para su inclusión en un proceso de lavado cuando se desea una efectividad de blanqueado adicional. Dichos ejemplos incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., aplicaciones de limpieza con solución a baja temperatura. En algunos modos de realización, la composición de producto aditivo se encuentra en su forma más simple, esto es, una o más variantes de proteasas de la invención. En algunos modos de realización, la composición de producto aditivo se envasa en forma de dosis para su adición en un proceso de limpieza. En algunos modos de realización, la composición de producto aditivo se envasa en forma de dosis para su adición en un proceso de limpieza donde se emplea una fuente de peróxígeno y se desea una efectividad de blanqueado incrementada. Puede utilizarse cualquier forma de unidad de dosis única adecuada, incluyendo, sin carácter limitativo, p. ej., píldoras, pastillas, cápsulas recubiertas de gelatina u otra unidad de dosis única, como líquidos o polvos medidos previamente. En consecuencia, en un aspecto, la invención proporciona una composición de producto de limpieza que comprende al menos una variante de proteasa de la invención, donde el producto se formula en de forma adecuada (p. ej., como un líquido, un sólido en polvo, una píldora, una pastilla, una cápsula recubierta de gelatina u otra forma adecuada) en una unidad de dosis única adecuada de forma que se proporcione una dosis única de la variante de proteasa. Dichos productos de limpieza son útiles en una variedad de métodos y aplicaciones de limpieza, entre los que se incluyen, sin carácter limitativo, métodos y aplicaciones de lavado de la colada a máquina o a mano, métodos y aplicaciones de lavado de la vajilla a mano o de forma automática, etc. Dichos métodos y aplicaciones de limpieza pueden llevarse a cabo a una temperatura baja o en condiciones de pH bajo. En algunos modos de realización, se incluye al menos un material portador y/o al menos un material de relleno para incrementar el volumen de dichas composiciones. Entre los materiales portadores o de relleno se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., varias sales de sulfato, carbonato y silicato, así como talco, arcilla y similares. Entre los materiales portadores o de relleno adecuados para composiciones líquidas se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., agua o alcoholes primarios y secundarios

de bajo peso molecular que incluyen polioles y dioles. Entre los ejemplos de dichos alcoholes se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., metanol, etanol, propanol e isopropanol. En algunos modos de realización, las composiciones contienen desde aproximadamente un 5 % hasta aproximadamente un 90 % de dichos materiales portadores o de relleno. Pueden incluirse materiales de relleno ácidos en dichas composiciones para reducir el pH de la solución resultante en el método o la aplicación de limpieza. De forma alternativa, en algunos modos de realización, el aditivo de limpieza incluye uno o más componentes adjuntos, como se describe de forma más completa posteriormente.

[0199] Las presentes composiciones de limpieza y aditivos de limpieza requieren una cantidad efectiva de al menos una variante de proteasa de la invención, sola o en combinación con otras proteasas y/o enzimas adicionales. El nivel requerido de enzima se obtiene mediante la adición de una o más variantes de proteasas de la invención. Normalmente, una composición de limpieza comprende al menos aproximadamente un 0,0001 por ciento en peso hasta aproximadamente un 20 por ciento en peso, desde aproximadamente un 0,0001 hasta aproximadamente un 10 por ciento en peso, desde aproximadamente un 0,0001 hasta aproximadamente un 1 por ciento en peso, desde aproximadamente un 0,001 hasta aproximadamente un 1 por ciento en peso, o desde aproximadamente un 0,01 hasta aproximadamente un 0,1 por ciento en peso de al menos una variante de proteasa de la invención. En un aspecto, una composición de la invención (p. ej., composición de limpieza de la invención) comprende desde aproximadamente 0,01 miligramos (mg) hasta aproximadamente 10 mg, aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 5 mg, aproximadamente 0,01 mg hasta aproximadamente 2 mg, aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 1 mg, aproximadamente 0,5 mg hasta aproximadamente 10 mg, aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 5 mg, aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 4 mg, aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 4 mg, aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 3 mg, aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 2 mg, aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 1 mg, aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 10 mg, aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 5 mg, aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 4 mg, aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 3 mg, aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 2 mg, aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 2 mg, aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 1 mg, aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 0,5 mg de al menos una variante de proteasa activa de la invención por gramo de la composición.

[0200] Las composiciones de limpieza de la invención se formulan normalmente de forma que, durante su uso en operaciones de limpieza acuosa, el agua de lavado tenga un pH desde aproximadamente 5.0 hasta aproximadamente 11.5 o incluso desde aproximadamente 7.5 hasta aproximadamente 10.5. Las formulaciones o composiciones de producto líquido se formulan normalmente para tener un pH puro desde aproximadamente 3.0 hasta aproximadamente 9.0 o desde aproximadamente 3.0 a aproximadamente 5.0. Las composiciones de producto de lavado para la colada granulado se formulan normalmente para tener un pH desde aproximadamente 9 hasta aproximadamente 11. Las composiciones detergentes de lavado de vajilla de forma automática y a mano se formulan normalmente para tener un pH desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 11.5, entre los que se incluyen, sin carácter limitativo, rangos de pH de aproximadamente 8 hasta aproximadamente 10, desde aproximadamente 9 hasta aproximadamente 11.5, y desde aproximadamente 9.5 hasta aproximadamente 11.5 dependiendo del método y de la aplicación específica. Las técnicas para controlar el pH en los niveles de uso recomendados incluyen el uso de tampones, álcalis, ácidos, etc., y son ampliamente conocidas por los expertos en la materia.

[0201] Las composiciones de limpieza con pH bajo adecuadas tienen normalmente un pH puro desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 5 y no suelen contener surfactantes que se hidrolicen en tal entorno de pH. Dichos surfactantes incluyen surfactantes de alquil sulfato de sodio que comprenden al menos una fracción de óxido de etileno o incluso desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 16 moles de óxido de etileno. Dichas composiciones de limpieza comprenden normalmente una cantidad suficiente de un modificador de pH, como hidróxido sódico, monoetanolamina o ácido clorhídrico, para proporcionar a dicha composición de limpieza un pH puro desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 5. Dichas composiciones comprenden normalmente al menos una enzima estable en ácido. En algunos modos de realización, las composiciones son líquidas, mientras que en otros modos de realización, estas son sólidas. El pH de dichas composiciones líquidas se mide normalmente como un pH puro. El pH de dichas composiciones sólidas se mide como un 10 % de solución de sólidos de dicha composición donde el disolvente es agua destilada. En estos modos de realización, todas las mediciones del pH se toman a 20 °C, a menos que se indique otra cosa.

[0202] En algunos modos de realización, cuando la(s) variante(s) de proteasa(s) de la invención se emplea(n) en una composición granulada o líquida, se desea que la variante de proteasa se encuentre en la forma de una partícula encapsulada para proteger la variante de proteasa de otros componentes de la composición granulada durante su almacenamiento. Además, la encapsulación también es un medio para controlar la disponibilidad de la(s) variante(s) de proteasa(s) durante el proceso de limpieza. En algunos modos de realización, la encapsulación potencia la eficacia de la(s) variante(s) de proteasa(s) y/o enzimas adicionales. En este sentido, las variantes de proteasas de la presente invención se encapsulan con cualquier material de encapsulación adecuado conocido en el ámbito de especialización. En algunos modos de realización, el material de encapsulación normalmente encapsula al menos parte del catalizador para la(s) variante(s) de proteasa(s) de la invención. Normalmente, el material de encapsulación es soluble en agua y/o dispersable en agua. En algunos

modos de realización, el material de encapsulación tiene una temperatura de transición vítrea (Tg) de 0 °C o mayor. La temperatura de transición vítrea se describe en mayor detalle en WO 97/11151. El material de encapsulación se selecciona normalmente del grupo que consta de carbohidratos, gomas sintéticas o naturales, quitina, quitosán, celulosa y derivados de celulosa, silicatos, fosfatos, boratos, alcohol polivinílico, polietilenglicol, ceras de parafina y combinaciones de los mismos. Cuando el material de encapsulación es un carbohidrato, se selecciona normalmente de entre monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos y combinaciones de los mismos. En algunos modos de realización típicos, el material de encapsulación es un almidón (véase, p. ej., EP 0 922 499; las patentes de los Estados Unidos con número 4,977,252, 5,354,559 y 5,935,826). En algunos modos de realización, el material de encapsulación es una microesfera hecha de plástico como termoplásticos, acrilonitrilo, metacrilonitrilo, poliacrilonitrilo, polimetacrilonitrilo y mezclas de los mismos; entre las microesferas comercializadas que son de utilidad se encuentran, sin carácter limitativo, las suministradas por EXPANCEL® (Stockviksverken, Suecia) y PM 6545, PM 6550, PM 7220, PM 7228, EXTENDOSPHERES®, LUXSIL®, Q-CEL® y SPHERICEL® (PQ Corp., Valley Forge, PA).

[0203] Como se describe en el presente documento, las variantes de proteasas de la invención son de especial utilidad en los métodos y aplicaciones de limpieza, entre los que se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., composiciones detergentes para el lavado de la vajilla de forma automática, el lavado de la vajilla a mano, la colada y la limpieza. Estas aplicaciones someten las enzimas a varios niveles de exigencia ambiental. Las variantes de proteasas de la invención proporcionan ventajas con respecto a muchas enzimas utilizadas en la actualidad en tales aplicaciones de limpieza debido a su actividad proteolítica y estabilidad en varias condiciones.

[0204] De hecho, existe una variedad de condiciones de lavado, entre las que se incluyen extensiones de tiempo de lavado, temperaturas del agua de lavado, volúmenes del agua de lavado y formulaciones detergentes variables, a las que se exponen las proteasas empleadas en el lavado. Además, las formulaciones detergentes utilizadas en áreas geográficas distintas tienen distintas concentraciones de sus componentes pertinentes presentes en el agua de lavado. Por ejemplo, los detergentes europeos tienen aproximadamente 4500-5000 partes por millón (ppm) de componentes detergentes en el agua de lavado, mientras que los detergentes japoneses tienen aproximadamente 667 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado. En América del Norte, concretamente en los Estados Unidos, los detergentes tienen normalmente aproximadamente 975 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado.

[0205] Un sistema de baja concentración de detergente incluye los detergentes en los que menos de aproximadamente 800 ppm de componentes detergentes se encuentran presentes en el agua de lavado. Los detergentes japoneses suelen adscribirse al sistema de baja concentración de detergente, dado que tienen aproximadamente 667 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado.

[0206] Una concentración de detergente media incluye los detergentes en los que entre aproximadamente 800 ppm y aproximadamente 2000 ppm de componentes detergentes están presentes en el agua de lavado. Los detergentes norteamericanos se adscriben, por lo general, a los sistemas de concentración de detergente media, dado que tienen aproximadamente 975 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado. Brasil tiene normalmente aproximadamente 1500 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado.

[0207] Un sistema de alta concentración de detergente incluye los detergentes en los que más de aproximadamente 2000 ppm de componentes detergentes se encuentran presentes en el agua de lavado. Los detergentes europeos se adscriben, por lo general, a los sistemas de alta concentración de detergente, dado que tienen aproximadamente 4500-5000 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado.

[0208] Los detergentes latinoamericanos son generalmente detergentes con mejoradores de fosfato con altos niveles de jabonadura, y la gama de detergentes utilizada en Latinoamérica puede adscribirse tanto a las concentraciones de detergente medias como a las altas, dado que las mismas varían entre 1500 ppm y 6000 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado. Como se ha mencionado anteriormente, Brasil tiene normalmente aproximadamente 1500 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado. Sin embargo, otras zonas geográficas con detergentes con mejoradores de fosfato con altos niveles de jabonadura, no limitadas a otros países de Latinoamérica, pueden tener sistemas de alta concentración de detergente de hasta aproximadamente 6000 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado.

[0209] En vista de lo anterior, es evidente que las concentraciones de composiciones detergentes en las soluciones típicas de lavado en todo el mundo varían desde menos de aproximadamente 800 ppm de composición detergente ("zonas geográficas con baja concentración de detergente"), por ejemplo, aproximadamente 667 ppm en Japón, hasta aproximadamente 800 ppm a aproximadamente 2000 ppm ("zonas geográficas con concentración de detergente media"), por ejemplo, aproximadamente 975 ppm en EE. UU. y aproximadamente 1500 ppm en Brasil, hasta más de aproximadamente 2000 ppm ("zonas geográficas con alta concentración de detergente"), por ejemplo, aproximadamente 4500 ppm a aproximadamente 5000 ppm en Europa y aproximadamente 6000 ppm en zonas geográficas con mejoradores de fosfato con altos niveles de jabonadura.

[0210] Las concentraciones de las soluciones típicas de lavado se determinan de forma empírica. Por ejemplo, en los EE. UU., una máquina lavadora típica soporta un volumen de aproximadamente 64,4 l de solución de

lavado. Por consiguiente, para obtener una concentración de aproximadamente 975 ppm de detergente en la solución de lavado hay que añadir aproximadamente 62,79 g de composición detergente a los 64,4 l de solución de lavado. Esta cantidad es la cantidad típica introducida en el agua de lavado por el usuario al utilizar la cubeta de medida proporcionada con el detergente.

- 5 **[0211]** Como ejemplo adicional, distintas zonas geográficas utilizan distintas temperaturas de lavado. La temperatura del agua de lavado en Japón es normalmente inferior a la utilizada en Europa. Por ejemplo, la temperatura del agua de lavado en América del Norte y Japón se encuentra normalmente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 °C (p. ej., aproximadamente 20 °C), mientras que la temperatura del agua de lavado en Europa se encuentra normalmente entre aproximadamente 30 y aproximadamente 60 °C (p. ej., aproximadamente 40 °C). No obstante, en aras de ahorrar energía, muchos consumidores están pasando a utilizar el lavado en agua fría. Además, en algunas otras regiones, normalmente se emplea agua fría para la colada, así como para aplicaciones de lavado de la vajilla. En algunos modos de realización, el «lavado en agua fría» de la presente invención utiliza lavado a temperaturas desde aproximadamente 10 °C hasta aproximadamente 40 °C, o desde aproximadamente 20 °C hasta aproximadamente 30 °C, o desde aproximadamente 15 °C hasta aproximadamente 25 °C, así como cualquier otra combinación en el rango que va desde aproximadamente 15 °C hasta aproximadamente 35 °C, y todos los rangos que se encuentran dentro de 10 °C y 40 °C.

- 20 **[0212]** Como ejemplo adicional, distintas zonas geográficas tienen normalmente distinta dureza del agua. La dureza del agua suele describirse en términos de granos por galón de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mezclados. La dureza es una medida de la cantidad de calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}) en el agua. La mayoría del agua en los Estados Unidos es dura, pero el grado de dureza varía. El agua moderadamente dura (60-120 ppm) a dura (121-181 ppm) tiene de 60 a 181 partes por millón (partes por millón convertido a granos por galón estadounidense es # ppm dividido entre 17,1 igual a granos por galón) de minerales de dureza.

Agua	Granos por galón	Partes por millón
Blanda	Menor que 1,0	Menor que 17
Ligeramente dura	1,0 a 3,5	17 a 60
Moderadamente dura	3,5 a 7,0	60 a 120
Dura	7,0 a 10,5	120 a 180
Muy dura	Mayor que 10,5	Mayor que 180

- 25 **[0213]** La dureza del agua europea es normalmente mayor que 10,5 (p. ej., aproximadamente de 10,5 hasta aproximadamente 20,0) granos por galón de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mezclados (p. ej., aproximadamente 15 granos por galón de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mezclados). La dureza del agua norteamericana es normalmente mayor que la dureza del agua japonesa, pero menor que la dureza del agua europea. Por ejemplo, la dureza del agua del agua norteamericana puede ser de entre aproximadamente 3 hasta aproximadamente 10 granos, aproximadamente 3 hasta aproximadamente 8 granos, o aproximadamente 6 granos. La dureza del agua japonesa suele ser menor que la dureza del agua norteamericana, normalmente menor que aproximadamente 4, por ejemplo aproximadamente 3 granos por galón de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mezclados.

- 35 **[0214]** Por consiguiente, en algunos aspectos, la invención proporciona variantes de proteasas que muestran una eficacia de lavado sorprendente en al menos un conjunto de condiciones de lavado (p. ej., temperatura del agua, dureza del agua y/o concentración de detergente). En algunos aspectos, las variantes de proteasas de la invención son comparables en eficacia de lavado con otras subtilisina proteasas. En algunos aspectos, las variantes de proteasas de la presente invención exhiben una eficacia de lavado potenciada en comparación con las subtilisina proteasas comercializadas en la actualidad. En consecuencia, en algunos aspectos de la invención, las variantes de proteasas proporcionadas en el presente documento exhiben una estabilidad oxidativa potenciada, una estabilidad térmica potenciada, capacidades de limpieza potenciadas en varias condiciones y/o estabilidad quelante potenciada. Además, las variantes de proteasas de la invención son de utilidad en composiciones de limpieza que no incluyan detergentes, de nuevo por sí solas o en combinación con mejoradores y estabilizadores.

- 45 **[0215]** En un aspecto, la invención proporciona una composición de limpieza que comprende al menos una variante de proteasa de la presente invención que está presente a un nivel desde aproximadamente un 0,0001 % hasta aproximadamente un 10 % en peso de la composición con el resto (p. ej., aproximadamente un 99,999 % hasta aproximadamente un 90,0 %) comprendiendo uno o más materiales de limpieza adjuntos en peso de la composición. En otro aspecto, la invención proporciona una composición de limpieza que comprende al menos una variante de proteasa de la invención que está presente a un nivel desde aproximadamente un 0,0001 % hasta aproximadamente un 10 %, aproximadamente 0,001 % hasta aproximadamente un 5 %, 50

aproximadamente un 0,001 % hasta aproximadamente un 2 %, o aproximadamente un 0,005 % hasta aproximadamente un 0,5 % en peso de la composición con el resto de la composición de limpieza (p. ej., aproximadamente un 99,9999 % hasta aproximadamente un 90,0 %, aproximadamente un 99,999 % hasta aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99,995 % hasta aproximadamente un 99,5 % en peso) comprendiendo uno o más materiales de limpieza adjuntos.

[0216] En algunos aspectos, una composición de limpieza de la invención comprende, además de al menos una variante de proteasa de la invención, una o más enzimas adicionales, que proporcionan beneficios de eficacia de limpieza y/o cuidado de tejidos y/o lavado de la vajilla de forma manual o a mano y/o lavado de la vajilla de forma automática. Entre los ejemplos de enzimas adecuadas se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., hemicelulasas, celulasas, peroxidases, xilanasas, lipasas, fosfolipasas, esterasas, cutinasas, pectinasas, pectato liasas, mananasas, queratinasas, reductasas, oxidasas, fenoloxidasas, lipoxigenasas, ligninasas, pululaninas, tanasas, pentosanasas, malanasas, β -glucanasas, arabinosidasas, hialuronidasa, condroitinasa, lacasa y/o amilasas, enzimas de metaloproteasa neutra (abreviadas como «nprE»), o mezclas de las mismas. En algunos aspectos, la composición de limpieza comprende, además de al menos una variante de proteasa de la invención, una combinación de enzimas adicionales (esto es, un «cóctel») que comprende enzimas aplicables convencionales como, p. ej., al menos una proteasa, lipasa, cutinasa, celulosa y/o amilasa adicional.

[0217] Además de las variantes de proteasas proporcionadas en el presente documento, cualquier otra proteasa adecuada puede ser de utilidad e incluirse en una composición de la invención. En un aspecto, la invención proporciona una composición (p. ej., composición de limpieza) que comprende al menos una variante de proteasa de la invención y al menos una proteasa adicional. Entre las proteasas adecuadas se incluyen las de origen animal, vegetal o microbiano. En un modo de realización, puede incluirse una proteasa microbiana. Puede incluirse un mutante de una proteasa modificado genéticamente o químicamente. En un aspecto, la al menos una proteasa adicional es una serina proteasa, preferiblemente una proteasa microbiana alcalina o una proteasa similar a la tripsina. Entre los ejemplos de proteasas alcalinas se incluyen las subtilisinas, especialmente las derivadas de *Bacillus* (p. ej., subtilisina, subtilisina de *B. lentus* (esto es, GG36), subtilisina de *B. amyloliquefaciens* (esto es, BPN'), subtilisina Carlsberg, subtilisina 309, subtilisina 147, PB92, y subtilisina 168). Algunos ejemplos adicionales incluyen las proteasas mutantes (esto es, variantes de proteasas) descritas en las patentes de los Estados Unidos con número RE 34,606, 5,955,340, 5,700,676, 6,312,936 y 6,482,628. Algunas proteasas adicionales incluyen, sin carácter limitativo, la tripsina (p. ej., de origen porcino o bovino) y la proteasa de *Fusarium* descrita en WO 89/06270. Una composición de la invención que comprende al menos una variante de proteasa de la invención también puede comprender al menos una enzima de proteasa comercializada. Las enzimas de proteasa comercializadas que son de utilidad en las composiciones de la presente invención incluyen, sin carácter limitativo, MAXATASE®, MAXACAL™, MAXAPEM™, OPTICLEAN®, OPTIMASE®, PROPERASE®, PURAFECT®, PURAFECT® OXP, PURAMAX™, EXCELLASE™, y PURAFAST™ (Genencor); ALCALASE®, SAVINASE®, PRIMASE®, DURAZYM™, POLARZYME®, OVOZYME®, KANNASE®, LIQUANASE®, NEUTRASE®, RELASE® y ESPERASE® (Novozymes); subtilisina de *Bacillus alkalophilus* KAP con A230V+S256G+S259N (Kao); y proteasa de *B. lentus* BLAP™, BLAP X y BLAP S ((Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien, Düsseldorf, Alemania). Algunas proteasas adicionales que pueden incluirse en composiciones de la invención incluyen las descritas en WO95/23221, WO 92/21760, la patente de los Estados Unidos con número de publicación 2008/0090747, y las patentes de los Estados Unidos con número 5,801,039, 5,340,735, 5,500,364, 5,855,625, RE 34,606, 5,955,340, 5,700,676, 6,312,936 y 6,482,628, así como en varias otras patentes. Pueden incluirse metaloproteasas en las composiciones de la invención. Entre dichas metaloproteasas se incluye, sin carácter limitativo, la enzima de metaloproteasa neutra (nprE) descrita en WO 07/044993.

[0218] En un aspecto, la invención proporciona una composición (p. ej., composición de limpieza) que comprende al menos una variante de proteasa de la invención y al menos una lipasa. Entre las lipasas adecuadas se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., las de origen bacteriano o fúngico. En la composición de la invención, puede incluirse un mutante de una lipasa modificado genéticamente o químicamente. Entre los ejemplos de lipasas útiles se incluyen la lipasa de *Humicola lanuginosa* (véase, p. ej., EP 258 068 y EP 305 216), la lipasa de *Rhizomucor miehei* (véase, p. ej., EP 238 023), la lipasa de *Candida*, como la lipasa de *C. antarctica* (p. ej., lipasa de *C. antarctica* A o B; véase, p. ej., EP 214 761), las lipasas de *Pseudomonas* como la lipasa de *P. alcaligenes* y la lipasa de *P. pseudoalcaligenes* (véase, p. ej., EP 218 272), la lipasa de *P. cepacia* (véase, p. ej., EP 331 376), la lipasa de *P. stutzeri* (véase, p. ej., GB 1,372,034), la lipasa de *P. fluorescens*, la lipasa de *Bacillus* (p. ej., la lipasa de *B. subtilis* (Dartois et al., Biochem. Acta 1131:253-260 (1993)); la lipasa de *B. stearothermophilus* (véase, p. ej., JP 64/744992); y la lipasa de *B. pumilus* (véase, p. ej., WO 91/16422)).

[0219] Además, un número de lipasas clonadas son de utilidad en composiciones (p. ej., composiciones de limpieza) de la presente invención, entre las que se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., la lipasa de *Penicillium camembertii* (Yamaguchi et al., Gene 103:61-67 (1991)), la lipasa de *Geotrichum candidum* (Schimada et al., J. Biochem. 106:383-388 (1989)) y varias lipasas de *Rhizopus*, como la lipasa de *R. deleamar* (Hass et al., Gene 109:117-113 (1991)), una lipasa de *R. niveus* (Kugimiya et al., Biosci. Biotech. Biochem. 56:716-719 (1992)) y la lipasa de *R. oryzae*.

[0220] Otros tipos de enzimas lipolíticas, como las cutinasas, también son de utilidad en algunos modos de realización de la presente invención, entre los que se incluyen, sin carácter limitativo, por ejemplo, la cutinasa derivada de *Pseudomonas mendocina* (véase WO 88/09367) y la cutinasa derivada de *Fusarium solani pisi* (véase WO 90/09446).

- 5 **[0221]** Las lipasas adecuadas adicionales incluyen lipasas comercializadas como M1 LIPASE™, LUMA FAST™ y LIPOMAX™ (Genencor); LIPOLASE® y LIPOLASE® ULTRA (Novozymes); y LIPASE P™ "Amano" (Amano Pharmaceutical Co. Ltd., Japón).

10 **[0222]** En algunos modos de realización, la invención proporciona composiciones (p. ej., composiciones de limpieza) que comprenden al menos una variante de proteasa de la invención y al menos una lipasa que está presente a un nivel de aproximadamente un 0,00001 % hasta aproximadamente un 10 % de lipasa adicional en peso de la composición y el resto de uno o más materiales de limpieza adjuntos en peso de la composición. En un aspecto, una composición de limpieza de la presente invención comprende, además de al menos una variante de proteasa de la invención, al menos una lipasa a un nivel de aproximadamente un 0,0001 % hasta aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 0,001 % hasta aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 0,001 % hasta aproximadamente un 2 % o aproximadamente un 0,005 % hasta aproximadamente un 0,5 % de lipasa en peso de la composición de limpieza.

20 **[0223]** También se incluye una composición (p. ej., composición de limpieza) que comprende al menos una variante de la invención y al menos una amilasa. Cualquier amilasa (p. ej., alfa y/o beta) adecuada para su utilización en soluciones alcalinas puede ser útil para su inclusión en tal composición. Entre las amilasas adecuadas se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., las de origen bacteriano o fúngico. Puede incluirse un mutante de una amilasa modificado genéticamente o químicamente. Entre las amilasas que son de utilidad en composiciones de la invención se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., las alfa-amilasas obtenidas de *B. licheniformis* (véase, p. ej., GB 1,296,839). Entre las amilasas comercializadas que son de utilidad en composiciones de la invención se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., DURAMYL®, TERMAMYL®, FUNGAMYL®, STAINZYME®, STAINZYME PLUS®, STAINZYME ULTRA® y BAN™ (Novozymes), así como POWERASE™, RAPIDASE® y MAXAMYL® P (Genencor).

30 **[0224]** En un aspecto, la invención proporciona una composición de limpieza que comprende al menos una variante de proteasa o al menos una amilasa, donde la amilasa está presente a un nivel de aproximadamente un 0,00001 % hasta aproximadamente un 10 % de amilasa adicional en peso de la composición y el resto de uno o más materiales de limpieza adjuntos en peso de la composición. En otro aspecto, la invención incluye una composición de limpieza que comprende al menos una variante de proteasa y al menos una amilasa que está presente a un nivel de aproximadamente un 0,0001 % hasta aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 0,001 % hasta aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 0,001 % hasta aproximadamente un 2 %, aproximadamente un 0,005 % hasta aproximadamente un 0,5 % de amilasa en peso de la composición.

35 **[0225]** Cualquier celulasa adecuada puede ser de utilidad en una composición de limpieza de la presente invención. En un aspecto, la invención proporciona una composición de limpieza que comprende al menos una variante de proteasa de la invención y una o al menos una celulasa. Entre las celulasas adecuadas se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., las de origen bacteriano o fúngico. En una composición de la invención, puede incluirse un mutante de una celulasa modificado genéticamente o químicamente. Entre las celulasas adecuadas se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., las celulasas de *Humicola insolens* (véase, p. ej., la patente de los Estados Unidos con número 4,435,307) y las celulasas que tienen beneficios para el cuidado del color (véase, p. ej., EP 0 495 257). En el ámbito de especialización, se conocen celulasas adecuadas adicionales. Entre las celulasas comercializadas que son de utilidad y pueden incluirse en una composición de la invención se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., CELLUZIME®, CAREZYME® (Novozymes) y KAC-500(B)™ (Kao Corporation). En algunos modos de realización, las celulasas se incorporan como partes o fragmentos de celulasas naturales o variantes de celulasas maduras, donde se deleciona una parte del N-terminal (véase, p. ej., la patente de los Estados Unidos con número 5,874,276). En un aspecto, una composición de limpieza de la invención comprende al menos una variante de proteasa de la invención y al menos una celulasa a un nivel desde aproximadamente un 0,00001 % hasta aproximadamente un 10 % de celulasa adicional en peso de la composición y el resto de uno o más materiales de limpieza adjuntos en peso de la composición. En otro aspecto, la invención proporciona una composición de limpieza que comprende al menos una variante de proteasa de la invención y al menos una celulasa a un nivel de aproximadamente un 0,0001 % hasta aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 0,001 % hasta aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 0,001 % hasta aproximadamente un 2 %, aproximadamente un 0,005 % hasta aproximadamente un 0,5 % de celulasa en peso de la composición.

55 **[0226]** Cualquier mananasa adecuada para su utilización en composiciones detergentes también es de utilidad y, por tanto, puede incluirse en una composición de limpieza de la invención. En un aspecto, la invención proporciona una composición de limpieza que comprende al menos una variante de proteasa de la invención y al menos una mananasa. Entre las mananasas adecuadas se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., las de origen bacteriano o fúngico. En una composición de la invención, puede incluirse un mutante de una mananasa modificado genéticamente o químicamente. Se conocen varias mananasas que son útiles y pueden incluirse en una composición de la invención (véase, p. ej., las mananasas descritas en las patentes de los Estados Unidos

con número 6,566,114, 6,602,842 y 6,440,991). En un aspecto, la invención proporciona una composición de limpieza que comprende al menos una variante de proteasa de la invención y al menos una mananasa a un nivel desde aproximadamente un 0,00001 % hasta aproximadamente un 10 % de mananasa adicional en peso de la composición y el resto de uno o más materiales de limpieza adjuntos en peso de la composición. En algunas de

5 dichas composiciones de limpieza, cada mananasa está presente a un nivel de aproximadamente un 0,0001 % hasta aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 0,001 % hasta aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 0,001 % hasta aproximadamente un 2 % o aproximadamente un 0,005 % hasta aproximadamente un 0,5 % de mananasa en peso de la composición.

[0227] En una composición de la invención, puede utilizarse una peroxidasa en combinación con peróxido de hidrógeno o una fuente del mismo (p. ej., un percarbonato, perborato o persulfato) en una composición de la invención. En una composición de la invención, puede utilizarse una oxidasa en combinación con oxígeno. Ambos tipos de enzimas se utilizan para una «solución de blanqueado» (esto es, para evitar la transferencia de un tinte textil de un tejido tintado a otro tejido cuando los tejidos se lavan juntos en un baño de lavado), preferiblemente junto con un agente potenciador (véase, p. ej., WO 94/12621 y WO 95/01426). Entre las

10 peroxidosas/oxidosas adecuadas que pueden incluirse en composiciones de la invención se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., las de origen bacteriano, fúngico o vegetal. En una composición de la invención, puede incluirse un mutante de una peroxidasa u oxidasa modificado genéticamente o químicamente. En un aspecto, la invención proporciona una composición de limpieza que comprende al menos una variante de proteasa de la invención y al menos una enzima oxidasa y/o al menos una peroxidasa. Cada dicha peroxidasa u oxidasa puede

15 estar presente en la composición a un nivel desde aproximadamente un 0,00001 % hasta aproximadamente un 10 % de peroxidasa u oxidasa adicional en peso de la composición y el resto de uno o más materiales de limpieza adjuntos en peso de la composición. En otro aspecto, la invención proporciona una composición de limpieza que comprende al menos una variante de proteasa de la invención y al menos una enzima oxidasa y/o al menos una peroxidasa, donde cada dicha peroxidasa u oxidasa está presente a un nivel de aproximadamente

20 un 0,0001 % hasta aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 0,001 % hasta aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 0,001 % hasta aproximadamente un 2 %, o aproximadamente un 0,005 % hasta aproximadamente un 0,5 % de enzima oxidasa o peroxidasa en peso de la composición.

[0228] En un aspecto, la invención proporciona una composición (p. ej., composición de limpieza) que comprende al menos una variante de proteasa de la invención y una o más enzimas adicionales son de utilidad, entre las que se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., una o más perhidrolasas (véase, p. ej., WO 05/056782).

30

[0229] En otro aspecto, la invención proporciona una composición (p. ej., composición de limpieza) que comprende al menos una variante de proteasa de la invención y abarca una o más mezclas de las enzimas anteriormente mencionadas, como, p. ej., una o más proteasas, amilasas, lipasas, mananasas y/o celulasas adicionales. De hecho, se contempla que varias mezclas de estas enzimas serán de utilidad en composiciones de la presente invención. También se contempla que los niveles variables de la(s) variante(s) de proteasa(s) y una o más enzimas adicionales pueden variar de forma independiente hasta aproximadamente un 10 %, constituyendo uno o más materiales de limpieza adjuntos el resto de la composición de limpieza. La selección específica de un material de limpieza adjunto se realiza fácilmente teniendo en cuenta la superficie o el artículo (p. ej., artículo de vajilla, artículo de mesa o artículo de tejido) o el tejido que se va a limpiar, y la forma deseada de la composición para las condiciones de limpieza durante su uso (p. ej., uso en detergente para el lavado de la vajilla de forma automática o a mano).

35

40

[0230] En un aspecto, la invención proporciona una composición (p. ej., composición de limpieza) que comprende al menos una variante de proteasa de la invención (y, opcionalmente, al menos una enzima adicional, si así se desea) y uno o más materiales de limpieza adjuntos. Entre los ejemplos de materiales de limpieza adjuntos se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., surfactantes, mejoradores, blanqueadores, activadores del blanqueado, catalizadores del blanqueado, otras enzimas, sistemas de estabilizadores de enzimas, quelantes, abrillantadores ópticos, polímeros quitamanchas, agentes de transferencia de tintes, agentes inhibidores de la transferencia de tintes, materiales catalíticos, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, perácidos preformados, agentes dispersantes poliméricos, agentes de eliminación de la suciedad de arcilla, agentes elastificantes de la estructura, dispersantes, supresores de jabonaduras, tintes, perfumes, colorantes, sales de relleno, hidrótrofos, fotoactivadores, fluorescentes, suavizantes de tejidos, portadores, hidrótrofos, coadyuvantes de elaboración, disolventes, pigmentos, surfactantes hidrolizables, conservantes, antioxidantes, agentes contra el encogimiento, agentes contra la formación de arrugas, germicidas, fungicidas, motas de color, agentes para el cuidado de la plata, contra la pérdida de lustre y/o contra la corrosión, fuentes de alcalinidad,

45

50

55

60

agentes solubilizantes, portadores, coadyuvantes de elaboración, pigmentos y/o agentes de control del pH (véase, p. ej., las patentes de los Estados Unidos con número 6,610,642, 6,605,458, 5,705,464, 5,710,115, 5,698,504, 5,695,679, 5,686,014 y 5,646,101). A continuación, se ejemplifican de forma detallada algunos modos de realización de materiales de composición de limpieza específicos. Como se ha indicado anteriormente, si un material de limpieza adjunto no es compatible con una variante de proteasa de la presente invención incluida en una composición de limpieza deseada, se utiliza un método adecuado para mantener separados el/los material(es) de limpieza adjunto(s) y la(s) proteasa(s) (esto es, no en contacto entre sí) hasta que la combinación de los componentes sea apropiada. Dichos métodos de separación incluyen cualquier método adecuado

conocido en el ámbito de especialización (p. ej., cápsula recubierta de gelatina, encapsulación, pastillas, separación física, etc.).

[0231] En algunos aspectos, una composición (p. ej., composición de limpieza) de la invención comprende una cantidad efectiva de al menos una variante de proteasa de la invención que es útil o efectiva para limpiar una superficie de la que sea necesario quitar una mancha proteínica. Dichas composiciones de limpieza incluyen composiciones de limpieza para aplicaciones como limpiar superficies duras, la colada, tejidos, platos, artículos de mesa o artículos de vajilla (p. ej., mediante el lavado de la vajilla de forma automática o el lavado de la vajilla de forma manual o a mano). De hecho, en algunos modos de realización, la presente invención proporciona composiciones de limpieza de tejidos, mientras que en otros modos de realización, la presente invención proporciona composiciones de limpieza que no son para tejidos. Especialmente, la presente invención también proporciona composiciones de limpieza que comprenden al menos una variante de proteasa de la invención, donde dichas composiciones de limpieza son adecuadas para el cuidado personal, incluido el cuidado bucal (que incluye dentífricos, pastas de dientes, enjuagues bucales, etc., así como composiciones de limpieza de dentaduras), adecuadas para la limpieza de la piel y el cabello, y adecuadas para la limpieza de gafas. Se pretende que la presente invención abarque composiciones detergentes en cualquier forma (esto es, líquidas, granuladas, en barras, sólidas, semisólidas, en gel, emulsiones, pastillas, cápsulas, etc.).

[0232] Más abajo y a modo de ejemplo, se describen en mayor detalle varias composiciones de limpieza donde las variantes de proteasas de la invención son de utilidad. En algunos modos de realización en los que las composiciones de limpieza de la invención están formuladas como composiciones adecuadas para su uso en métodos de lavado en máquinas lavarropa, las composiciones de la invención contienen preferiblemente al menos un surfactante y al menos un compuesto mejorador, así como uno o más materiales de limpieza adjuntos, incluido, p. ej., uno o más materiales de limpieza adjuntos seleccionados del grupo de compuestos poliméricos orgánicos, agentes blanqueantes, enzimas adicionales, supresores de jabonaduras, dispersantes, dispersantes de jabones de cal, agentes de suciedad en suspensión y contra la redeposición e inhibidores de la corrosión. En algunos modos de realización, las composiciones para la colada también contienen uno o más agentes suavizantes (esto es, como materiales de limpieza adjuntos adicionales). En los ejemplos que se exponen más abajo, se presentan ejemplos adicionales de formulaciones y composiciones de limpieza de tejidos y de la colada a las que puede añadirse una o más variantes de proteasas de la invención.

[0233] Las composiciones de la invención también son de utilidad como productos detergentes aditivos en forma líquida o sólida. Dichos productos aditivos tienen por objeto suplementar y/o potenciar la eficacia de las composiciones detergentes convencionales y pueden añadirse en cualquier fase del proceso de limpieza. En algunos modos de realización, la densidad de la composición detergente para la colada varía desde aproximadamente 400 hasta aproximadamente 1200 g/litro, mientras que en otros modos de realización, varía desde aproximadamente 500 hasta aproximadamente 950 g/litro de composición medida a 20 °C.

[0234] En un aspecto, la invención proporciona composiciones de limpieza como las proporcionadas en la patente de los Estados Unidos con número 6,605,458 que comprenden al menos una variante de proteasa de la invención. En algunos modos de realización, la composición que comprende al menos una variante de proteasa de la invención es una composición de limpieza de tejidos granulada compacta, mientras que en otros modos de realización, la composición es una composición de limpieza de tejidos granulada útil para el lavado de tejidos de color; en otros modos de realización, la composición es una composición de limpieza de tejidos granulada que proporciona suavizado a través de la capacidad de lavado; en modos de realización adicionales, la composición es una composición de limpieza de tejidos líquida para uso intensivo. En algunos modos de realización, las composiciones que comprenden al menos una variante de proteasa de la invención son composiciones de limpieza de tejidos como las descritas en las patentes de los Estados Unidos con número 6,610,642 y 6,376,450. También se proporcionan composiciones detergentes para la colada granuladas (véase, p. ej., la patente de los Estados Unidos con número 6,610,642) que comprenden al menos una variante de proteasa de la invención.

[0235] En algunos aspectos, la invención proporciona composiciones de limpieza para superficies duras que comprenden al menos una variante de proteasa proporcionada en el presente documento. Algunas de dichas composiciones comprenden composiciones de limpieza para superficies duras como las descritas en las patentes de los Estados Unidos con número 6,610,642, 6,376,450 y 6,376,450 que incluyen al menos una de las variantes de proteasas en cuestión.

[0236] En un aspecto, la invención proporciona composiciones detergentes para el lavado de la vajilla de forma automática o el lavado de la vajilla a mano que comprenden al menos una variante de proteasa proporcionada en el presente documento. Algunas de dichas composiciones comprenden composiciones de limpieza para superficies duras como las descritas en las patentes de los Estados Unidos con número 6,610,642 y 6,376,450.

[0237] En un aspecto, la invención proporciona composiciones de limpieza para su uso en métodos de lavado de la vajilla de forma manual o a mano o de lavado de la vajilla de forma automática que comprenden al menos una variante de proteasa de la invención y/o al menos un surfactante y/o al menos un material de limpieza adjunto adicional seleccionado del grupo de componentes poliméricos orgánicos, agentes potenciadores de jabonaduras, iones metálicos de grupo II, disolventes, hidrótrópos y enzimas adicionales.

[0238] En algunos modos de realización en los que las composiciones de limpieza de la invención están formuladas como composiciones adecuadas para su uso en métodos con lavavajillas automático, las composiciones de la invención contienen normalmente al menos un surfactante y/o al menos un componente mejorador y puede contener uno o más materiales de limpieza adjuntos seleccionados preferiblemente de compuestos poliméricos orgánicos, agentes blanqueantes, enzimas adicionales, supresores de jabonaduras, dispersantes, dispersantes de jabones de cal, agentes de suciedad en suspensión y contra la redeposición e inhibidores de la corrosión. En los ejemplos que se exponen más abajo, se presentan ejemplos adicionales de formulaciones y composiciones para el lavado de la vajilla a las que puede añadirse una o más variantes de proteasas de la invención.

[0239] En otro aspecto, la invención proporciona composiciones de cuidado bucal que comprenden al menos una variante de proteasa de la presente invención que son útiles para el cuidado bucal (p. ej., limpieza de dientes y dentaduras); entre los componentes de composiciones de cuidado bucal que pueden ser útiles e incluirse en dichas composiciones se incluyen los descritos en la patente de los Estados Unidos con número 6,376,450. Las composiciones de la invención pueden incluir también componentes y materiales de limpieza adjuntos descritos en las patentes de los Estados Unidos con número 6,376,450, 6,605,458 y 6,610,642.

[0240] Las composiciones de limpieza de la invención se formulan en cualquier forma adecuada y se preparan mediante cualquier proceso seleccionado por el formulador; ejemplos no limitativos de ello se describen en las patentes de los Estados Unidos con número 5,879,584, 5,691,297, 5,574,005, 5,569,645, 5,565,422, 5,516,448, 5,489,392 y 5,486,303. Cuando se desea una composición de limpieza con un pH bajo, el pH de dicha composición se ajusta mediante la adición de un material como monoetanolamina o un material ácido como cloruro de hidrógeno (HCl).

[0241] Aunque no son esenciales a los efectos de la presente invención, los adjuntos ilustrados con carácter no limitativo en lo sucesivo son adecuados para su utilización en las composiciones de limpieza instantánea. En algunos modos de realización, estos adjuntos se incorporan, por ejemplo, para potenciar la eficacia de limpieza, o contribuir a la misma, para el tratamiento del sustrato que se va a limpiar o para modificar la estética de la composición de limpieza, como en el caso de los perfumes, los colorantes, los tintes o similares. Se entiende que tales adjuntos son adicionales a las variantes de proteasas de la presente invención. La naturaleza concreta de estos componentes adicionales, así como los niveles de incorporación de los mismos, dependerán de la forma física de la composición y de la naturaleza de la operación de limpieza para la que se va a utilizar. Entre los materiales adjuntos adecuados se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., los surfactantes, los mejoradores, los agentes quelantes, los agentes inhibidores de la transferencia de tintes, los coadyuvantes de deposición, los dispersantes, las enzimas adicionales y los estabilizadores de enzimas, los materiales catalíticos, los activadores del blanqueado, los potenciadores del blanqueado, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, perácidos preformados, agentes dispersantes poliméricos, agentes de eliminación de la suciedad de arcilla/contrala redeposición, blanqueadores, supresores de jabonaduras, tintes, perfumes, agentes elastificantes de la estructura, suavizantes de telas, vehículos, hidrótrofos, auxiliares de procesamiento y/o pigmentos. Además de en la exposición que se presenta más abajo, pueden encontrarse ejemplos adecuados de dichos otros adjuntos y niveles de uso en las patentes de los Estados Unidos con número 5,576,282, 6,306,812 y 6,326,348. Los componentes adjuntos mencionados con anterioridad pueden constituir el resto de las composiciones de limpieza de la presente invención.

[0242] En algunos aspectos, las composiciones de limpieza de la invención comprenden al menos un surfactante y/o un sistema surfactante, donde el surfactante se selecciona de surfactantes no iónicos, surfactantes aniónicos, surfactantes catiónicos, surfactantes anfóteros, surfactantes anfóteros, surfactantes no iónicos semipolares y mezclas de los mismos. En algunos modos de realización de composiciones limpiadoras con un pH bajo (por ejemplo, composiciones que presenten un pH puro de 3 aproximadamente a 5 aproximadamente), la composición no contiene normalmente sulfato de alquilo etoxilado, puesto que se cree que dicho tensioactivo puede que hidrolice por medio de dichas composiciones los contenidos ácidos. En algunos modos de realización, el surfactante está presente a un nivel desde aproximadamente un 0,1 hasta aproximadamente un 60 %, mientras que en modos de realización alternativos el nivel es desde aproximadamente un 1 % hasta aproximadamente un 50 %, mientras que en otros modos de realización adicionales el nivel es desde aproximadamente un 5 % hasta aproximadamente un 40 % en peso de la composición de limpieza.

[0243] En algunos aspectos, las composiciones de limpieza de la invención comprenden uno o más mejoradores detergentes o sistemas de mejoradores. En algunas de dichas composiciones que incorporan al menos un mejorador, las composiciones de limpieza comprenden al menos aproximadamente un 1 %, desde aproximadamente un 3 % hasta aproximadamente un 60 % o incluso desde aproximadamente un 5 % hasta aproximadamente un 40 % de mejorador en peso de la composición de limpieza. Entre los mejoradores se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., sales de polifosfatos de alcanolamonio, amonio y metales alcalinos; silicatos metálicos alcalinos, carbonatos de metales alcalinos y alcalinotérreos, aluminosilicatos, compuestos de policarboxilato, éter hidroxipolicarboxilatos, copolímeros de anhídrido maleico con etileno o vinilmetiléter, ácido 1, 3, 5-trihidroxi benceno-2, 4, 6-trisulfónico y ácido carboximetiloxisuccínico, las diversas sales de metal alcalino, las sales de amonio y de amonio sustituido de ácidos poliacéticos como el ácido tetraacético de etilendiamina y el ácido nitrilotriacético, así como policarboxilatos como ácido melítico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido

oxidisuccínico, ácido polimaleico, ácido de benceno 1,3,5-tricarboxílico, ácido carboximetiloxisuccínico y sales solubles de estos. Se contempla que cualquier mejorador adecuado será de utilidad en varias composiciones de la invención.

5 **[0244]** En algunas de dichas composiciones, los mejoradores forman complejos con iones de dureza solubles en agua (p. ej., mejoradores secuestrantes), como citratos y polifosfatos (p. ej., tripolifosfato de sodio y tripolifosfato de sodio hexahidratado, tripolifosfato de potasio y tripolifosfato con mezcla de sodio y potasio, etc.). Se contempla que cualquier mejorador adecuado será de utilidad en la presente invención, incluidos los ya conocidos en el ámbito de especialización (véase, p. ej., EP 2 100 949).

10 **[0245]** Algunas composiciones de limpieza de la invención comprenden al menos un agente quelante además de al menos una variante de proteasa. Entre los agentes quelantes adecuados se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., los agentes quelantes de cobre, hierro y/o manganeso y mezclas de los mismos. En los modos de realización en los que se utiliza al menos un agente quelante, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden desde aproximadamente un 0,1 % hasta aproximadamente un 15 % o incluso desde aproximadamente un 3 % hasta aproximadamente un 10 % de agente quelante en peso de la composición de limpieza en cuestión.

15 **[0246]** Algunas composiciones de limpieza proporcionadas en el presente documento comprenden al menos un coadyuvante de deposición además de al menos una variante de proteasa. Entre los coadyuvantes de deposición adecuados se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., polietilenglicol, polipropilenglicol, policarboxilato, polímeros quitamanchas como ácido politereftálico, arcillas como caolinita, montmorillonita, atapulgita, illita, bentonita, halloysita y mezclas de estos.

20 **[0247]** Como se indica en el presente documento, en algunos modos de realización, los agentes contra la redeposición son de utilidad en algunos modos de realización de la presente invención. En algunos modos de realización, son de utilidad los surfactantes no iónicos. Estos surfactantes no iónicos también son de utilidad en la prevención de la redeposición de suciedad. En algunos modos de realización, el agente contra la redeposición es un surfactante no iónico como se conoce en el ámbito de especialización (véase, p. ej., EP 2 100 949).

25 **[0248]** En algunos modos de realización, las composiciones de limpieza de la presente invención incluyen uno o más agentes inhibidores de la transferencia de tintes. Los inhibidores de la transferencia de tintes poliméricos adecuados incluyen, sin carácter limitativo, polímeros de polivinilpirrolidona, polímeros de N-óxido de poliamina, copolímeros de N-vinilpirrolidona y N-vinilimidazol, poliviniloxazolidonas y polivinilimidazoles o mezclas de estos. En los modos de realización en los que se utiliza al menos un agente inhibidor de la transferencia de tintes, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden desde aproximadamente un 0,0001 % hasta aproximadamente un 10 %, desde aproximadamente un 0,01 % hasta aproximadamente un 5 %, o incluso desde aproximadamente un 0,1 % hasta aproximadamente un 3 % en peso de la composición de limpieza.

30 **[0249]** En algunos modos de realización, se incluyen silicatos en las composiciones de la presente invención. En algunos de dichos modos de realización, son de utilidad los silicatos de sodio (p. ej., disilicato de sodio, metasilicato de sodio y filosilicatos cristalinos). En algunos modos de realización, los silicatos están presentes a un nivel desde aproximadamente un 1 % hasta aproximadamente un 20 %. En algunos modos de realización, los silicatos están presentes a un nivel desde aproximadamente un 5 % hasta aproximadamente un 15 % en peso de la composición.

35 **[0250]** En algunos modos de realización adicionales, las composiciones de limpieza de la invención también comprenden dispersantes. Entre los materiales orgánicos solubles en agua adecuados se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., los ácidos homopoliméricos o copoliméricos o sus sales, en los que el ácido policarboxílico comprende al menos dos radicales carboxilo separados entre sí por no más de dos átomos de carbono.

40 **[0251]** En algunos modos de realización adicionales, las enzimas (p. ej., las variantes de proteasas de la invención u otras enzimas adicionales) utilizadas en las composiciones de limpieza se estabilizan con cualquier técnica adecuada. En algunos modos de realización, las enzimas empleadas en el presente documento se estabilizan mediante la presencia de fuentes solubles en agua de iones de magnesio y/o calcio en las composiciones finalizadas que proporcionan dichos iones a las enzimas. En algunos modos de realización, los estabilizadores de enzimas incluyen oligosacáridos, polisacáridos y sales metálicas divalentes inorgánicas, incluidos metales alcalinotérreos, como sales de calcio. Se contempla que se utilizarán diversas técnicas para la estabilización enzimática en la presente invención. Por ejemplo, en algunos modos de realización, las enzimas empleadas en el presente documento se estabilizan mediante la presencia de fuentes solubles en agua de iones de zinc (II), calcio (II) y/o magnesio (II) en las composiciones que proporcionan dichos iones a las enzimas, así como otros iones metálicos (p. ej., bario (II), escandio (II), hierro (II), manganeso (II), aluminio (III), estaño (II), cobalto (II), cobre (II), níquel (II) y oxovanadio (IV)). Los cloruros y los sulfatos también son de utilidad en algunos modos de realización de la presente invención. En el ámbito de especialización, se conocen ejemplos de oligosacáridos y polisacáridos adecuados (p. ej., dextrinas) (véase, p. ej., WO 07/145964). En algunos modos de realización, también son de utilidad los inhibidores de proteasas reversibles, como los compuestos que contienen

boro (p. ej., borato, ácido 4-formil fenil borónico) y/o un tripéptido aldehído en composiciones de la invención para mejorar la estabilidad de forma adicional, según se desee.

[0252] En algunos modos de realización, se incluyen blanqueadores, activadores del blanqueado y/o catalizadores del blanqueado en las composiciones de la invención. En algunos modos de realización, las composiciones de limpieza de la invención comprenden componentes blanqueadores orgánicos y/o inorgánicos. Entre los blanqueadores inorgánicos se incluyen, sin carácter limitativo, las sales perhidratadas (p. ej., sales de perborato, percarbonato, perfosfato, persulfato y persilicato). En algunos modos de realización, las sales perhidratadas inorgánicas son sales metálicas alcalinas. En algunos modos de realización, las sales perhidratadas inorgánicas se incluyen como el sólido cristalino, sin protección adicional, aunque en algunos otros modos de realización, la sal se encuentra recubierta. Cualquier sal adecuada conocida en el ámbito de especialización es de utilidad en las composiciones de la invención (véase, p. ej., EP 2 100 949).

[0253] En algunos modos de realización, se utilizan activadores del blanqueado en las composiciones de la invención. Los activadores del blanqueado son normalmente precursores de perácido orgánico que potencian la acción blanqueante durante la limpieza a temperaturas de 60 °C e inferiores. Entre los activadores del blanqueado adecuados para su uso según el presente documento se incluyen los compuestos que, en condiciones de perhidrólisis, proporcionan ácidos peroxycarboxílicos alifáticos que tienen preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10 átomos de carbono, en concreto desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 4 átomos de carbono y/u opcionalmente ácido perbenzoico sustituido. En el ámbito de especialización, se conocen activadores del blanqueado adicionales que son de utilidad en la composición de la invención (véase, p. ej., EP 2 100 949).

[0254] Además, en algunos modos de realización y como se describe también en el presente documento, las composiciones de limpieza de la invención comprenden también al menos un catalizador del blanqueado. En algunos modos de realización, son de utilidad el triazaciclono-nano de manganeso y otros compuestos relacionados, así como los complejos de hierro, manganeso, cobre y cobalto. En la presente invención, son de utilidad catalizadores del blanqueado adicionales (véase, p. ej., las patentes de los Estados Unidos con número 4,246,612, 5,227,084 y 4,810,410; WO 99/06521; así como EP 2 100 949).

[0255] En algunos modos de realización, las composiciones de limpieza de la invención comprenden uno o más complejos metálicos catalíticos. En algunos modos de realización, se utiliza un catalizador blanqueante que contiene metal. En algunos modos de realización, el catalizador blanqueante metálico comprende un sistema catalizador que comprende un catión de metal de transición de actividad catalítica blanqueante definida (por ejemplo, cationes de cobre, hierro, titanio, rutenio, wolframio, molibdeno o manganeso), un catión de metal auxiliar que presenta una actividad catalítica blanqueante mínima o nula (p. ej., cationes de zinc o aluminio) y un secuestrante que presenta unas constantes de estabilidad definidas para los cationes de metal catalíticos y auxiliares, en concreto ácido etilendiaminotetraacético, ácido etilendiaminotetra (ácido metileno-fosfónico) y sales solubles en agua de los mismos (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos con número 4,430,243). En algunos modos de realización, las composiciones de limpieza de la invención se catalizan por medio de un compuesto de manganeso. Dichos compuestos y niveles de uso son ampliamente conocidos en el ámbito de especialización (véase, p. ej., la patente de los Estados Unidos con número 5,576,282). En modos de realización adicionales, son de utilidad catalizadores del blanqueado de cobalto y se incluyen las composiciones de limpieza de la invención. En el ámbito de especialización, se conocen varios catalizadores del blanqueado de cobalto (véase, p. ej., las patentes de los Estados Unidos con número 5,597,936 y 5,595,967) que se preparan fácilmente con procedimientos conocidos.

[0256] En algunos modos de realización adicionales, las composiciones de limpieza de la invención incluyen un complejo de metal de transición de un ligando macropolicíclico rígido (MRL, por sus siglas en inglés). En la práctica, y sin carácter limitativo, en algunos modos de realización, las composiciones y los procesos de limpieza proporcionados por la invención se ajustan para proporcionar del orden de al menos una parte por cada cien millones de la especie de MRL activa en el medio de lavado acuoso, y en algunos modos de realización, proporcionar desde aproximadamente 0,005 ppm hasta aproximadamente 25 ppm, desde aproximadamente 0,05 ppm hasta aproximadamente 10 ppm, y desde aproximadamente 0,1 ppm hasta aproximadamente 5 ppm del MRL en el baño de lavado.

[0257] En algunos modos de realización, los metales de transición en el catalizador del blanqueado metálico de transición instantáneo incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., el manganeso, el hierro y el cromo. Los MRL preferidos también incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., ligandos ultrarrígidos especiales que son de puente cruzado (p. ej., 5,12-dietil-1,5,8,12-tetraazabicyclo(6.6.2)hexadecano). Los MRL metálicos de transición se preparan fácilmente mediante procedimientos conocidos (véase, p. ej., WO 2000/32601 y la patente de los Estados Unidos con número 6,225,464).

[0258] En un aspecto, la invención proporciona una composición detergente para el lavado de la vajilla de forma automática formulada como una pastilla detergente. Dicha pastilla comprende al menos una variante de proteasa de la invención y un mejorador, como, p. ej., una sal mejoradora. Algunas de dichas pastillas tienen una alcalinidad al menos equivalente a 3 gramos (g) de hidróxido de sodio por cada 100 gramos de la composición en pastilla y una densidad de al menos 1,4 gramos/centímetro cúbico. La sal mejoradora puede comprender una

mezcla de una sal de silicato y una sal de fosfato, preferiblemente con más silicato (p. ej., metasilicato sódico) que fosfato (p. ej., tripolifosfato sódico). Algunas de dichas pastillas no llevan materiales surfactantes y están especialmente adaptadas para su utilización en lavavajillas automáticos.

5 **[0259]** En un aspecto, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden agentes para el cuidado de los metales. Los agentes para el cuidado de los metales son útiles para evitar y/o reducir la pérdida de lustre, la corrosión y/o la oxidación de metales, incluidos el aluminio, el acero inoxidable y materiales no ferrosos (p. ej., plata y cobre). Entre los agentes adecuados para el cuidado de los metales se incluyen los descritos en EP 2 100 949, WO 9426860 y WO 94/26859). En algunas de dichas composiciones de limpieza, el agente para el cuidado de los metales es una sal de zinc. Algunas de dichas composiciones de limpieza
10 comprenden desde aproximadamente un 0,1 % hasta aproximadamente un 5 % en peso de uno o más agentes para el cuidado de los metales.

[0260] Como se ha indicado previamente, las composiciones de limpieza de la presente invención se formulan en cualquier forma adecuada y se preparan mediante cualquier proceso seleccionado por el formulador; ejemplos no limitativos de ello se describen en las patentes de los Estados Unidos con número 5,879,584,
15 5,691,297, 5,574,005, 5,569,645, 5,516,448, 5,489,392 y 5,486,303. En algunos modos de realización en los que se desea una composición de limpieza con un pH bajo, el pH de dicha composición se ajusta mediante la adición de un material ácido como cloruro de hidrógeno (HCl).

[0261] Las composiciones de limpieza expuestas en el presente documento son de utilidad en la limpieza de un sitio (p. ej., una superficie, vajilla, artículos de mesa o tejidos). Normalmente, al menos una parte del sitio se pone
20 en contacto con una composición de limpieza presente de la invención en estado puro o diluida en un baño de lavado, y posteriormente, de forma opcional, el sitio se lava y/o enjuaga. A efectos de la presente invención, «lavar» y «lavado» incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., restregar o agitación mecánica. En algunos modos de realización, las composiciones de limpieza se emplean en concentraciones desde aproximadamente 550 ppm hasta aproximadamente 15 000 ppm en solución. Cuando el disolvente de lavado es agua, la temperatura del
25 agua varía normalmente desde aproximadamente 5 °C hasta aproximadamente 90 °C y cuando el sitio comprende un tejido, la relación entre la masa del agua y de tejido es normalmente desde aproximadamente 1:1 hasta aproximadamente 30:1.

Procesos para elaborar y utilizar composiciones de limpieza

[0262] Las composiciones de limpieza de la invención descritas en el presente documento y a lo largo del mismo pueden formularse en cualquier forma adecuada y prepararse mediante cualquier método adecuado elegido por el formulador (véase, p. ej., las patentes de los Estados Unidos con número 5,879,584, 5,691,297, 5,574,005,
30 5,569,645, 5,565,422, 5,516,448, 5,489,392, 5,486,303, 4,515,705, 4,537,706, 4,515,707, 4,550,862, 4,561,998, 4,597,898, 4,968,451, 5,565,145, 5,929,022, 6,294,514 y 6,376,445).

[0263] En algunos modos de realización, las composiciones de limpieza de la invención se proporcionan en forma de dosis unitaria, lo que incluye pastillas, cápsulas, sobres, bolsas y bolsas con múltiples compartimentos. En algunos modos de realización, el formato de dosis unitaria está diseñado para proporcionar una liberación controlada de los componentes que se encuentran en el interior de una bolsa con múltiples compartimentos (u otro formato de dosis unitaria). Los formatos adecuados de dosis unitaria y liberación controlada son conocidos en el ámbito de especialización (véase, p. ej., EP 2 100 949, WO 02/102955, las patentes de los Estados Unidos
35 con número 4,765,916 y 4,972,017, así como WO 04/111178 para materiales adecuados para su uso en formatos de dosis unitaria y liberación controlada). En algunos modos de realización, el formato de dosis unitaria se proporciona en pastillas envueltas con una película soluble en agua o bolsas solubles en agua. En EP 2 100 947, se proporcionan varios formatos para dosis unitarias, y estos son conocidos en el ámbito de especialización.

Métodos de la invención

45 **[0264]** La invención proporciona métodos para limpiar o lavar un artículo o superficie (p. ej., superficie dura) que necesita limpiarse, incluidos, sin carácter limitativo, p. ej., métodos para limpiar o lavar un artículo de vajilla, un artículo de mesa, un artículo de tejido, un artículo de colada, un artículo de cuidado personal, etc., o similares, como, p. ej., una superficie dura de un artículo.

[0265] En un aspecto, la invención proporciona un método para limpiar un artículo, un objeto o una superficie que necesite limpiarse, comprendiendo el método poner en contacto el artículo o la superficie (o una parte del artículo o la superficie que se desee limpiar) con una variante de proteasa de cualquiera de las de la invención o una composición de la invención durante un tiempo suficiente y/o en condiciones adecuadas o efectivas para limpiar el artículo, el objeto o la superficie hasta un nivel deseado. Algunos de dichos métodos comprenden también enjuagar el artículo, el objeto o la superficie con agua. Para algunos de dichos métodos, la composición de
50 limpieza es una composición detergente para el lavado de la vajilla y el artículo o el objeto que se va a limpiar es un artículo de vajilla o un artículo de mesa. Un artículo de vajilla es un artículo utilizado generalmente para servir o comer alimentos. Un artículo de vajilla puede ser, sin carácter limitativo, p. ej., un plato, un plato llano, un plato hondo, una copa, etc., y similares. Artículo de mesa es un término más amplio que incluye, sin carácter limitativo, p. ej., platos, cubiertos, cuchillos, tenedores, cucharas, palillos chinos, artículos de cristal, jarras, salseras,
55 recipientes para beber, etc., y similares; un artículo de mesa incluye cualquiera de estos artículos para servir o

comer alimentos, o artículos similares. Para algunos de dichos métodos, la composición de limpieza es una composición detergente para el lavado de la vajilla de forma automática o una composición detergente para el lavado de la vajilla a mano y el artículo o el objeto que se va a limpiar es un artículo de vajilla o un artículo de mesa. Para algunos de dichos métodos, la composición de limpieza es una composición detergente para la colada, como, p. ej., una composición detergente para la colada en polvo o una composición detergente para la colada líquida, y el artículo que se va a limpiar es un artículo de tejido.

[0266] En un aspecto, la invención proporciona métodos para limpiar o lavar un artículo de tejido que, de forma opcional, necesita limpiarse o lavarse, respectivamente. Algunos de dichos métodos comprenden proporcionar una composición que comprende la variante de proteasa (como, sin carácter limitativo, p. ej., una composición de limpieza para la colada o tejidos) y un artículo de tejido o artículo de colada que necesite limpiarse, y poner en contacto el artículo de tejido o el artículo de colada (o una parte del artículo que se desee limpiar) con la composición en condiciones suficientes o efectivas para limpiar o lavar el artículo de tejido o de colada hasta un nivel deseado.

[0267] En un aspecto, la invención proporciona un método para limpiar o lavar un artículo o una superficie (p. ej., una superficie dura) que, de forma opcional, necesite limpiarse, comprendiendo el método proporcionar un artículo o una superficie que se va a limpiar o lavar y poner en contacto el artículo o la superficie (o una parte del artículo o la superficie que se desee limpiar o lavar) con al menos una variante de proteasa de la invención o una composición de la invención que comprenda al menos una variante de proteasa tal durante un tiempo suficiente y/o en condiciones suficientes o efectivas para limpiar o lavar el artículo o la superficie hasta un nivel deseado. Dichas composiciones incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., una composición de limpieza o una composición detergente de la invención (entre las que se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., una composición detergente para el lavado de la vajilla a mano, una composición de limpieza para el lavado de la vajilla a mano, una composición de limpieza para tejidos o la colada o una composición detergente para tejidos o la colada, una composición de limpieza para la colada líquida, una composición detergente para la colada líquida, una composición de limpieza para la colada en polvo, una composición detergente para la colada en polvo, una composición detergente para el lavado de la vajilla de forma automática, una composición detergente o de limpieza potenciadora para la colada, un aditivo de limpieza para la colada y una composición de pretratado para la colada, etc.). En algunos casos, si así se desea, el método puede repetirse una o varias veces, especialmente si se desea limpieza o lavado adicional. Por ejemplo, en algunos casos, el método también comprende de forma opcional permitir que el artículo o la superficie permanezca en contacto con la al menos una variante de proteasa o composición durante un período de tiempo suficiente o efectivo para limpiar o lavar el artículo o la superficie hasta el nivel deseado. Algunos de dichos métodos comprenden también enjuagar el artículo o la superficie con agua. Algunos de dichos métodos comprenden también poner en contacto de nuevo el artículo o la superficie con al menos una variante de proteasa de la invención o una composición de la invención y permitir que el artículo o la superficie permanezca en contacto con la al menos una variante de proteasa o composición durante un período de tiempo suficiente para limpiar o lavar el artículo o la superficie hasta el nivel deseado. Para algunos de dichos métodos, la composición de limpieza es una composición detergente para el lavado de la vajilla y el artículo que se va a limpiar es un artículo de vajilla o un artículo de mesa. Para algunos de dichos métodos, la composición de limpieza es una composición detergente para el lavado de la vajilla de forma automática o una composición detergente para el lavado de la vajilla a mano y el artículo que se va a limpiar es un artículo de vajilla o un artículo de mesa. Para algunos de dichos métodos, la composición de limpieza es una composición detergente para la colada y el artículo que se va a limpiar es un artículo de tejido.

[0268] En un aspecto, la invención proporciona un método para limpiar un artículo de mesa o un artículo de vajilla en un lavavajillas automático, comprendiendo el método proporcionar un lavavajillas automático, poner una cantidad de una composición para el lavado de la vajilla de forma automática que comprende al menos una variante de proteasa de la invención o una composición de la invención suficiente para limpiar el artículo de mesa o el artículo de vajilla en el lavavajillas (p. ej., poniendo la composición en un compartimento o dispensador de detergente proporcionado o adecuado en el lavavajillas), colocar un artículo de mesa o de vajilla en el lavavajillas y poner en funcionamiento el lavavajillas con el fin de limpiar el artículo de mesa o el artículo de vajilla (p. ej., de acuerdo con las instrucciones del fabricante). Dicho método puede incluir cualquier composición para el lavado de la vajilla de forma automática descrita en el presente documento, que comprenda, sin carácter limitativo, p. ej., cualquier variante de proteasa descrita también en el presente documento. La cantidad de composición para el lavado de la vajilla de forma automática que se ha de emplear puede determinarse fácilmente según las instrucciones o las sugerencias del fabricante y puede emplearse cualquier forma de la composición para el lavado de la vajilla de forma automática que comprenda al menos una variante de proteasa de la invención (p. ej., líquida, en polvo, sólida, en gel, en pastilla, etc.), incluyendo cualquiera descrita en el presente documento.

[0269] En un aspecto, la invención proporciona un método para limpiar una superficie, un artículo o un objeto que, de forma opcional, necesite limpiarse, comprendiendo el método poner en contacto el artículo o la superficie (o una parte del artículo o la superficie que se desee limpiar) con al menos una variante de proteasa de la invención o una composición de limpieza de la invención en forma pura o diluida en un baño de lavado durante un tiempo suficiente y/o en condiciones suficientes o efectivas para limpiar o lavar el artículo o la superficie hasta un nivel deseado. Posteriormente, la superficie, el artículo o el objeto pueden lavarse y/o enjuagarse (de forma

opcional) si se desea. A los efectos de la presente invención, «lavar» y «lavado» incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., restregar o agitación mecánica. En algunos modos de realización, las composiciones de limpieza se emplean en concentraciones desde aproximadamente 550 ppm hasta aproximadamente 15 000 ppm en solución (p. ej., solución acuosa). Cuando el disolvente de lavado es agua, la temperatura del agua varía normalmente desde aproximadamente 5 °C hasta aproximadamente 90 °C y cuando el sitio comprende un tejido, la relación entre la masa del agua y de tejido es normalmente desde aproximadamente 1:1 hasta aproximadamente 30:1.

[0270] En un aspecto, la invención proporciona un método para limpiar un artículo de colada o un artículo de tejido en una máquina lavadora, comprendiendo el método proporcionar una máquina lavadora, poner una cantidad de una composición detergente para la colada que comprende al menos una variante de proteasa de la invención suficiente para limpiar el artículo de colada o el artículo de tejido en la máquina (p. ej., poniendo la composición en un compartimento o dispensador de detergente proporcionado o adecuado en la máquina), colocar el artículo de colada o el artículo de tejido en la máquina y poner en funcionamiento la máquina con el fin de limpiar el artículo de colada o el artículo de tejido (p. ej., de acuerdo con las instrucciones del fabricante). Dicho método puede incluir cualquier composición detergente para la el lavado de la colada descrita en el presente documento, que comprenda, sin carácter limitativo, p. ej., cualquier variante de proteasa descrita también en el presente documento. La cantidad de composición detergente para la colada que se ha de emplear puede determinarse fácilmente según las instrucciones o las sugerencias del fabricante y puede emplearse cualquier forma de la composición detergente para la colada que comprenda al menos una variante de proteasa de la invención (p. ej., sólida, en polvo, líquida, en pastilla, en gel, etc.), incluyendo cualquiera descrita en el presente documento.

[0271] En los ejemplos que se presentan a continuación, se proporcionan ejemplos de métodos de limpieza adicionales.

Aspectos adicionales de la invención

[0272] En un aspecto, la invención proporciona cualquier composición de la invención (p. ej., composición de limpieza o composición detergente) descrita en el presente documento y a lo largo del mismo, comprendiendo dicha composición cualquier polipéptido de la invención (p. ej., cualquier variante de proteasa o variante de subtilisina de la invención) como se define en las reivindicaciones, pero donde dicha composición no es una composición para el lavado de la vajilla de forma automática. En el presente documento también se expone una composición que comprende cualquier variante de proteasa de la invención descrita en el presente documento y a lo largo del mismo, pero donde dicha composición no incluye una composición detergente para el lavado de la vajilla de forma automática que comprende una variante de proteasa de una proteasa original, comprendiendo dicha proteasa original una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, comprendiendo dicha variante de proteasa de dicha proteasa original uno de los siguientes conjuntos de sustituciones de aminoácidos en comparación con dicha proteasa original:

- (i) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A, con la condición de que dicha variante de proteasa no comprenda N248R+S188D, o
- (ii) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+V244R,
- (iii) y un mejorador,

donde las posiciones de aminoácido se numeran según la numeración de las posiciones de aminoácido correspondientes en la secuencia de aminoácidos de subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en SEQ ID NO:2, según lo determinado por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*. En un aspecto, dicha composición es una composición detergente. En un aspecto, dicha composición es una composición de limpieza. En un aspecto, dicha composición es una composición detergente en polvo o una composición detergente líquida. En un aspecto, dicha composición es una composición de limpieza en forma de líquido, gel, pastilla, polvo, o gránulos. En un aspecto, dicha composición es una composición detergente para el lavado de la vajilla de forma automática. En un aspecto, dicha composición es una composición de limpieza que no contiene fosfato. En cualquier aspecto, dicha composición comprende al menos una enzima adicional. En cualquier aspecto de dicha composición, dicha composición comprende al menos dicha al menos una enzima adicional puede seleccionarse del grupo que consta de hemicelulasa, celulasa, amilasa, peroxidasa, proteasa, xilanas, lipasa, fosfolipasa, esterasa, cutinasa, pectinasa, pectato liasa, mananasa, queratinasa, reductasa, oxidasa, fenoloxidasa, lipoxigenasa, ligninasa, pululanasa, tanasa, pentosanasa, malanasa, β -glucanasa, arabinosidasa, hialuronidasa, condroitinasa y lacasa. En cualquier aspecto de dicha composición, dicha composición puede comprender dos o más enzimas adicionales seleccionadas del grupo que consta de hemicelulasa, celulasa, amilasa, peroxidasa, proteasa, xilanas, lipasa, fosfolipasa, esterasa, cutinasa, pectinasa, pectato liasa, mananasa, queratinasa, reductasa, oxidasa, fenoloxidasa, lipoxigenasa, ligninasa, pululanasa, tanasa, pentosanasa, malanasa, β -glucanasa, arabinosidasa, hialuronidasa, condroitinasa y lacasa. En cualquier aspecto de dicha composición, dicha composición puede comprender también al menos un mejorador y/o al menos un surfactante.

[0273] En un aspecto, la invención proporciona un método para limpiar un artículo o una superficie que necesita limpiarse, comprendiendo el método poner en contacto el artículo o la superficie con cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente. En un aspecto de dicho método, dicho método comprende también enjuagar el artículo o la superficie con agua. En un aspecto de dicho método, la composición de limpieza es una

5 composición detergente para el lavado de la vajilla y el artículo que se va a limpiar es un artículo de vajilla o un artículo de mesa. En un aspecto de dicho método, la composición de limpieza es una composición detergente para el lavado de la vajilla de forma automática y el artículo que se va a limpiar es un artículo de vajilla o un artículo de mesa.

[0274] En un aspecto, la invención proporciona un método para limpiar una superficie, un artículo o un objeto, comprendiendo el método poner en contacto al menos una parte del artículo o de la superficie que se va a limpiar con cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente durante un tiempo suficiente y/o en condiciones suficientes o efectivas para limpiar o lavar el artículo o la superficie hasta un nivel deseado, y comprendiendo también de forma opcional enjuagar la superficie, el artículo o el objeto con agua.

[0275] En un aspecto, la invención proporciona un método para limpiar un artículo de mesa o un artículo de vajilla en un lavavajillas automático, comprendiendo el método (i) proporcionar un lavavajillas automático, (ii) poner una cantidad de cualquiera de dichas composiciones o composiciones para el lavado de la vajilla de forma automática mencionadas anteriormente que sea suficiente para limpiar el artículo de mesa o el artículo de vajilla en el lavavajillas, donde, de forma opcional, dicha composición se pone en un compartimento o dispensador en dicho lavavajillas, (iii) colocar un artículo de mesa o un artículo de vajilla en el lavavajillas y (iv) poner en

20 funcionamiento el lavavajillas con el fin de limpiar el artículo de mesa o el artículo de vajilla.

EJEMPLOS

[0276] Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de demostrar e ilustrar de forma adicional determinados aspectos de la presente invención y no han de interpretarse como limitativos del alcance de la misma.

[0277] En la exposición experimental que sigue en el presente documento, así como en cualquier otra parte del mismo, se aplican las siguientes abreviaturas: PI (inhibidor de la proteinasa), ppm (partes por millón); M (molar); mM (milimolar); μ M (micromolar); nM (nanomolar); mol (mol); mmol (milimol); μ mol (micromol); nmol (nanomol); gm (gramo); mg (miligramo); μ g (microgramo); pg (picogramo); L o l (litro); ml y mL (mililitros); μ l o μ L (microlitro); cm (centímetro); mm (milímetro); μ m (micrómetro); nm (nanómetro); U (unidades); V (voltio); PM (peso molecular); seg (segundo); min(s) (minuto/minutos); h(s) o hr(s) (hora/horas); °C (grados centígrados); ND (no determinado); rpm (revoluciones por minuto); GH (grados de dureza alemana); H₂O (agua); dH₂O (agua desionizada); HCl (ácido clorhídrico); aa (aminoácido); bp (par de base); kb (kilobase); kD (kilodaltones); ADNc (ADN complementario o copia); ADN (ácido desoxirribonucleico); ADNmc (ADN monocatenario); ADNbc (ADN bicatenario); ARN (ácido ribonucleico); MgCl₂ (cloruro magnésico); NaCl (cloruro sódico); BPN' (subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*); PB92 (subtilisina de *Bacillus clausii*); p/v (porcentaje en masa); % v (porcentaje en volumen); p/p (porcentaje en peso); g (gravedad); DO (densidad óptica); ppm (partes por millón); DO₂₈₀ (densidad óptica a 280 nm); DO₆₀₀ (densidad óptica a 600 nm); A₄₀₅ (absorbencia a 405 nm); PAGE (electroforesis en gel de poli(acrilamida)); PBS (solución tampón de fosfatos [150 mM NaCl, 10 mM tampón fosfato de sodio, pH 7.2]); PEG (polietilenglicol); PCR (reacción en cadena de la polimerasa); SDS (dodecilsulfato sódico); TRIS o Tris (tris(hidroximetil)aminometano); HEPES (ácido N-[2-Hidroxietil]piperacina-N-[2-etanosulfónico]); HBS (HEPES solución salina); Tris-HCl (clorhidrato de tris[hidroximetil]aminometano); DMSO (dimetil sulfóxido); SA (ácido sinápico (ácido cinámico s,5-dimetoxi-4-hidroxi); TCA (ácido tricloroacético); HPLC (cromatografía líquida de alta resolución); Taq (ADN polimerasa *Thermus aquaticus*); Klenow (fragmento largo (Klenow) de ADN polimerasa I); EDTA (ácido etilendiaminotetraacético); bla (gen resistente a la ampicilina o β -lactamasa); HDL (líquido de alta densidad); HDD (detergente en polvo para uso intensivo); HSG (detergente granulado con altos niveles de jabonadura); ECO (Europa Central y Oriental); EO (Europa Occidental); NA, cuando se utiliza en referencia a detergentes (Norteamérica); Japón y JPN, cuando se utilizan en referencia a detergentes (Japón); CFT (Center for Testmaterials, Vlaardingen, Países Bajos); P&G y Procter & Gamble (Procter & Gamble, Inc., Cincinnati, OH); DNA2.0 (DNA2.0, Menlo Park, CA); Corning (Corning Life Sciences, Corning, NY); ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD); Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO); NCBI (National Center for Biotechnology Information); Operon Technologies (Operon Technologies, Inc., Alameda, CA); Invitrogen (Invitrogen Corp., San Diego, CA); Qiagen (Qiagen, Inc., Valencia, CA); Molecular Devices (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA); Siegfried Handel (Siegfried Handel AG, Zofingen, Suiza); Stratagene (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA); Monsanto (Monsanto Co., St. Louis, MO); Wintershall (Wintershall AG, Kassel, Alemania); BASF (BASF Co., Florham Park, NJ); Huntsman (Huntsman Petrochemical Corp., Salt Lake City, UT); Enichem (Enichem Iberica, Barcelona, España); Fluka Chemie AG (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza); Gist-Brocades (Gist-Brocades, NV, Delft, Países Bajos); Dow Corning (Dow Corning Corp., Midland, MI); RB (Reckitt-Benckiser, Slough, Reino Unido).

[0278] Tal como se utiliza en el presente documento, en algunas listas, se indica un «0» al principio, con el fin de proporcionar una designación de tres números para cada sitio (p. ej., «001» es lo mismo que «1», por lo que

«A001C» es lo mismo que «A1C»). En algunas listas, no se incluye el «0» inicial. Además, tal como se utiliza en el presente documento, «X» se refiere a cualquier aminoácido.

- 5 **[0279]** En las composiciones detergentes ejemplificadas descritas en el presente documento, los niveles de enzimas se expresan por enzima pura en peso de la composición total y, a menos que se indique otra cosa, los componentes detergentes se expresan en peso de las composiciones totales. Las identificaciones de componentes abreviadas en la presente memoria tienen los siguientes significados:

Abreviatura	Compuesto
LAS	: Sulfonato de alquilbenceno C ₁₁₋₁₃ lineal de sodio
NaC16-17HSAS	: Sulfato de alquilo altamente soluble C ₁₆₋₁₇ de sodio
TAS	: Sulfato de alquilo de sebo de sodio
CxyAS	: Sodio sulfato de alquilo C _{1x} - C _{1y}
CxyEz	: Alcohol primario predominantemente lineal C _{1x} - C _{1y} condensado con un promedio de z moles de óxido de etileno
CxyAEzS	: Sodio sulfato de alquilo C _{1x} - C _{1y} condensado con un promedio de z moles de óxido de etileno. Nombre de molécula añadida en los ejemplos.
No iónico	: Alcohol graso etoxilado/propoxilado mixto p. ej., Plurafac LF404 siendo un alcohol con un grado promedio de etoxilación de 3,8 y un grado medio de propoxilación de 4,5
QAS	: R ₂ .N ⁺ (CH ₃) ₂ (C ₂ H ₄ OH) con R ₂ = C ₁₂ -C ₁₄ .
Silicato	: Silicato de sodio amorfo (ratio de SiO ₂ :Na ₂ O = 1,6-3,2:1)
Metasilicato	: Metasilicato de sodio (ratio de SiO ₂ :Na ₂ O = 1,0)
Zeolita A	: Aluminosilicato hidratado de fórmula Na ₁₂ (AlO ₂ SiO ₂) ₁₂ . 27H ₂ O
SKS-6	: Silicato laminar cristalino de fórmula δ-Na ₂ Si ₂ O ₅
Sulfato	: Sulfato de sodio anhidro.
STPP	: Tripolifosfato de sodio
MA/AA	: Copolímero aleatorio de 4:1 de acrilato/maleato, peso molecular promedio de aproximadamente 70 000-80 000
AA	: Polímero de poliácrito de sodio de peso molecular promedio de 4500.
Policarboxilato	: Copolímero que comprende una mezcla de monómeros carboxilados como acrilato, maleato y metacrilato con un PM que varía entre 2000-80 000 como Sokolan, comercializado por BASF, siendo un copolímero de ácido acrílico, PM de 4500
BB1	: 3-(3,4-Dihidroisoquinolinio) propano sulfonato
BB2	: decano-2-sulfato de 1-(3,4-dihidroisoquinolinio)
PB1	: Perborato de sodio monohidratado
PB4	: Perborato de sodio tetrahidratado de fórmula nominal NaBO ₃ .4H ₂ O.
Percarbonato	: Percarbonato de sodio de fórmula nominal 2Na ₂ CO ₃ .3H ₂ O ₂ .
TAED	: Tetraacetililenodiamina
NOBS	: Nonanoiloxibenceno sulfonato en forma de sal de sodio
DTPA	: Ácido pentético
HEDP	: Ácido difosfónico
DETPMP	: Dietiltriamina penta (metileno) fosfonato, comercializado por Monsanto con el nombre comercial Dequest 2060.

EDDS	: Isómero (S,S) de ácido etilendiamin-N,N'-disuccínico en forma de su sal de sodio
Diamina	: Dimetilaminopropilamina; 1,6-hexanodiamina; 1,3-propanodiamina; 2-metil-1,5-pentanodiamina; 1,3-pentanodiamina; 1-metildiaminopropano.
DETBCHD	: Dicloruro de 5, 12- dietil-1,5,8,12-tetraazabicyclo [6,6,2] hexadecano, sal de Mn(II)
PAAC	: Sal de cobalto (III) de acetato de pentaamina
Parafina	: Aceite de parafina vendido con el nombre comercial de Winog 70 por Wintershall.
Sulfonato de parafina	: Un aceite o cera de parafina donde algunos de los átomos de hidrógeno se han reemplazado por grupos sulfonato
Aldosa oxidasa	: Enzima oxidasa vendida con el nombre comercial de Aldose Oxidase por Novozymes A/S
Galactosa oxidasa	: Galactosa oxidasa de Sigma
nprE	: La forma recombinante de la metaloproteasa neutra expresada en <i>Bacillus subtilis</i> (see e.g., WO 07/044993)
PMN	: Metaloproteasa neutra purificada de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Amilasa	: Una enzima amilolítica adecuada, como las vendidas con los nombres comerciales PURAFECT® Ox descritas en los documentos WO 94/18314, WO96/05295 y vendida por Genencor; NATALASE®, TERMAMYL®, FUNGAMYI® y DURAMYL™, todas disponibles de Novozymes A/S.
Lipasa	: Una enzima lipolítica adecuada como las vendidas con los nombres comerciales LIPEX®, LIPOLASE®, LIPOLASE® Ultra de Novozymes A/S y Lipomax™ de Gist-Brocades
Celulasa	: Una enzima celulítica adecuada como las vendidas con los nombres comerciales CAREZYME®, CELLUZYME® y/o ENDOLASE® de Novozymes A/S
Pectina liasa	: Una pectina liasa adecuada, como las vendidas con los nombres comerciales PECTAWAY® y PECTAWASH® disponibles de Novozymes A/S
PVP	: Polivinilpirrolidona con un peso molecular promedio de 60 000.
PVNO	: N-óxido de polivinilpiridina, con un peso molecular promedio de 50 000
PVPVI	: Copolímero de vinilimidazol y vinilpirrolidona, con un peso molecular promedio de 20 000
Abrillantador 1	: 4,4'-bis(2-sulfoestiril)bifenilo de disodio
Antiespumante de silicona	: Regulador de la espuma de polidimetilsiloxano con un copolímero de siloxano-oxialquileo como agente dispersante, con una ratio de dicho regulador de espuma con respecto a dicho dispersante de 10:1 a 100:1
Supresor de jabonaduras	: 12 % de silicona/sílice, 18 % de alcohol estearílico, 70 % de almidón en forma granulada
SRP 1	: Poliésteres de extremo terminado aniónicamente.
PEG X	: Polietilenglicol, de peso molecular X.
PVP K60®	: Homopolímero de vinilpirrolidona (PM promedio de 160 000)
Jeffamine® ED-2001	: Polietilenglicol con terminación de Huntsman
Isachem® AS	: Sulfato de alquilo de alcohol ramificado de Enichem
MME PEG (2000)	: Monometileterpolietilenglicol (PM 2000) de Fluka Chemie AG

DC3225C	: Supresor de jabonaduras de silicona, mezcla de aceite de silicona y sílice de Dow Corning
TEPAE	: Etoxilato de tetraetilenpentaamina.
BTA	: Benzotriazol
Betaína	: $(\text{CH}_3)_3\text{N}+\text{CH}_2\text{COO}^-$
Azúcar	: D-glucosa de calidad industrial o azúcar de calidad alimentaria
CFAA	: N-metilglucamida alquilo $\text{C}_{12}\text{-C}_{14}$
TPKFA	: Ácidos grasos de fracción completa descabezada $\text{C}_{12}\text{-C}_{14}$.
Arcilla	: Silicato de aluminio hidratado de fórmula general $\text{Al}_2\text{O}_3\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. Tipos: Caolinita, montmorillonita, atapulgita, illita, bentonita, halloysita

- [0280]** Para los detergentes para el lavado de la colada líquidos de uso intensivo (HDL, por sus siglas en inglés) de Norteamérica (NA) y Europa Occidental (EO), la inactivación por calor de las enzimas presentes en detergentes comercializados se realiza poniendo detergente líquido pesado previamente (en una botella de vidrio) en un baño de agua a 95 °C durante 2 horas. El tiempo de incubación para la inactivación por calor de los detergentes para el lavado de la vajilla de forma automática de NA y EO es de 8 horas. Tanto los detergentes calentados como los no calentados se someten a ensayo en el tiempo de 5 minutos tras la disolución del detergente para determinar de forma precisa el porcentaje desactivado. La actividad enzimática se evalúa mediante el ensayo de AAPF.
- 10 **[0281]** Para someter a prueba la actividad enzimática en detergentes inactivados por calor, se elaboran soluciones de trabajo de los detergentes a partir de soluciones madre inactivadas por calor. Se añaden cantidades apropiadas de dureza del agua (p. ej., 6 granos por galón (gpg) o 12 gpg) y de tampón a las soluciones detergentes para cumplir con las condiciones deseadas. Las soluciones se mezclan mediante agitación vortical o inversión de las botellas. En los siguientes ejemplos, se describen algunos detergentes comercializados.

EJEMPLO 1

Construcción de variantes de proteasas

- [0282]** Los polipéptidos de variantes de proteasas de la invención y los ácidos nucleicos de la invención que codifican dichas variantes de proteasas pueden crearse utilizando uno o más de una variedad de métodos estándar ampliamente conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una variante de proteasa de la invención puede construirse mediante la mutagénesis dirigida de un ADN plasmídico que codifica una secuencia nucleotídica expuesta en SEQ ID NO:18 que codifica una proteasa GG36 de *B. lentus* de forma que la variante de proteasa resultante ahí codificada comprenda una o más sustituciones de aminoácidos (mutaciones) deseadas en las posiciones de aminoácidos deseadas en relación con la secuencia de aminoácidos de GG36 expuesta en SEQ ID NO:1. Por ejemplo, un experto en la materia puede emplear fácilmente procedimientos estándar de mutagénesis dirigida utilizando la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO:18 (que codifica el polipéptido de proteasa GG36) para producir un ácido nucleico que codifique un polipéptido de variante de proteasa que comprenda las sustituciones de aminoácidos deseadas en una o más posiciones de aminoácidos de la proteasa GG36 (SEQ ID NO:1). Asimismo, un experto en la materia puede emplear fácilmente procedimientos conocidos de mutagénesis dirigida utilizando la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO:18 para producir un ácido nucleico que codifique un polipéptido de variante de proteasa que comprenda sustituciones de aminoácidos en una o más de las posiciones de aminoácidos de GG36 (SEQ ID NO:1) seleccionados del grupo que consta de 76, 87, 118, 128, 129, 130, 188, 244 y 248, donde cada posición de aminoácido se numera según la numeración de la posición de aminoácido correspondiente en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en SEQ ID NO:2, según lo determinado por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa de interés con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN'.

- [0283]** Dichos procedimientos también pueden emplearse fácilmente, p. ej., para producir ácidos nucleicos que codifican variantes de proteasas PX3 (SEQ ID NO:6), PX4, (SEQ ID NO:7) y PX5 (SEQ ID NO:8) y variantes de proteasas de cada una de ellas, como variantes de PX3, PX4 y PX5 que comprendan sustituciones de aminoácidos adicionales, incluidas, p. ej., sustituciones de aminoácidos conservativas y no conservativas, delecciones de aminoácidos y/o adiciones o inserciones de aminoácidos.

[0284] Una secuencia nucleotídica que codifica una proteasa GG36 es de la siguiente forma:

gtgagaagcaaaaaattgtggatcgtcgcgtcgaccgcactactcatttctgttgccttcagttcatcgatcgcatcggtcgtgaagaagca
aaagaaaaatatttaattggctttaatgagcaggaagctgtcagtgagttttagaacaagtagaggcaaatgacgaggtcgccattctctc
gaggaagaggaagtcgaaattgaattgcttcagtaattgaaacgattcctgtttatccgttgagttaagcccagaagatgtggacgcgcttg
agctcgatccagcgatttcttatattgaagaggatgcagaagtaacgacaatgGCGCAATCAGTGCCATGGGGAATT
AGCCGTGTGCAAGCCCCAGCTGCCATAACCGTGGATTGACAGGTTCTGGTGTA
AGTTGCTGTCCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGG
CGTAGCTTTGTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGCATGGCACGC
ATGTGGCCGGGACGATTGCTGCTTTAAACAATTCGATTGGCGTTCTTGGCGTAGCGC
CGAGCGCGGAACCTATACGCTGTTAAAGTATTAGGGGCGAGCGGTTACAGGTTTCGGTC
AGCTCGATTGCCCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTTGCTAA
TTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCAAGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGC
GACTTCTAGAGGCGTTCTTGTGTAGCGGCATCTGGAAATTCAGGTGCAGGCTCAAT
CAGCTATCCGGCCCGTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGACCAAAACA
ACAACCGCGCCAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGGCTTGACATTGTGCGACCAGGT
GTAAACGTGCAGAGCACATAACCCAGGTTCAACGTATGCCAGCTTAAACGGTACATC
GATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAGCCCTTGTTAAACAAAAGAACCCAT
CTTGGTCCAATGTACAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACGAGCTTAGGA
AGCACGAACTTGTATGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCTGCAACTCGTTAA
(SEQ ID NO:18)

- 5 **[0285]** Como se ha mostrado anteriormente, la secuencia de ADN de SEQ ID NO:18 comprende una secuencia nucleotídica que codifica un péptido señal (mostrado anteriormente sin subrayar, en letras minúsculas), una secuencia nucleotídica que codifica un propéptido (mostrado anteriormente subrayado, en letras minúsculas) y una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido GG36 maduro (mostrado anteriormente en letras mayúsculas).

[0286] En la secuencia de proteínas de GG36 proporcionada más abajo, la secuencia de péptido señal se muestra en letras minúsculas, la secuencia propeptídica se muestra en letras minúsculas subrayadas y la secuencia de proteasa madura GG36 se muestra en letras mayúsculas.

vrskklwivastallisvafssiasaaeeakekyligfneqavsefveqveandevailseeeeveieillhefetipvlsvelspedvdaleldpaisy
ieedaevttmAQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSVKVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPTQD
GNHGHTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVA
NLSLGSPSPSATLEQAVNSATSRGVLVVAASGNSGAGSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFS
QYGAGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNVQIRNHLKN
TATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR (SEQ ID NO:19)

10

- 15 **[0287]** La secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa madura a la que se hace referencia en el presente documento como polipéptido PX3 y que tiene las sustituciones de aminoácidos N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+N248R en relación con SEQ ID NO:1 (utilizando la numeración de BPN' determinada por el alineamiento de la secuencia de polipéptido PX3 con la secuencia de polipéptido BPN' mostrada en SEQ ID NO:2) es:

AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSVKVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPTQDGNHGHT
HVAGTIAALDNSIGVLGVAPRAELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNRMHVANLSLGLQ
APSATLEQAVNSATSRGVLVVAASGNSGAGSISYPARYANAMAVGATDQNNNRADFSQYGAG
LDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNVQIRRHLKNTATSLG
STNLYGSGLVNAEAATR (SEQ ID NO:6).

[0288] La secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa madura (variante de subtilisina) a la que se hace referencia en el presente documento como polipéptido PX4 y que comprende las sustituciones de aminoácidos N76D/S87R/G118R/S128L/P129Q/S130A en relación con SEQ ID NO:1 (utilizando la numeración de BPN' determinada por el alineamiento de la secuencia de polipéptido PX4 con la secuencia de polipéptido BPN' mostrada en SEQ ID NO:2) es:

5

AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSQVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPTQDGNHGHGT
HVAGTIAALDNSIGVLGVAPRAELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNRMHVNLSLGLQ
APSATLEQAVNSATSRGVLVVAASGNSGAGSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFQYAGAGL
DIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNVQIRNHLKNTATSLGS
TNLYGSGLVNAAEATR (SEQ ID NO:7).

[0289] La secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa madura (variante de subtilisina) a la que se hace referencia en el presente documento como polipéptido PX5 y que comprende las sustituciones de aminoácidos N76D/S87R/G118R/S128L/P129Q/S130A/S188D/V244R en relación con SEQ ID NO:1 (utilizando la numeración de BPN' determinada por el alineamiento de la secuencia de polipéptido PX3 con la secuencia de polipéptido BPN' mostrada en SEQ ID NO:2) es:

10

AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSQVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPTQDGNHGHGT
HVAGTIAALDNSIGVLGVAPRAELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNRMHVNLSLGLQ
APSATLEQAVNSATSRGVLVVAASGNSGAGSISYPARYANAMAVGATDQNNNRADFS
QYAGGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNRQIRNHLKN
TATSLGSTNLYGSGLVNAAEATR (SEQ ID NO:8).

[0290] Una secuencia de ácido nucleico que codifica la variante de proteasa madura (variante de subtilisina) PX3 es:

15

GCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGCCGTGTGCAAGCCCCAGCTGCCATAACCGTGGAT
TGACAGGTTCTGGTGTAAGTTGCTGTCCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTA
AATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTTGTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGC
ATGGCACGCATGTGGCCGGGACGATTGCTGCTTTAGACAATTCGATTGGCGTTCTTGGCGTA
GCGCCGAGAGCGGAACCTATACGCTGTAAAGTATTAGGGGCGAGCGGTTTCAGGTTCCGGTCA
GCTCGATTGCCCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATCGTATGCACGTTGCTAATTTGAG
TTTAGGACTGCAGGCACCAAGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTAAATAGCGCGACTTCTAGA
GGCGTTCTTGTGTAGCGGCATCTGGAAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCCG
TTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGACCAAAACAACAACCGCGCCGATTTTTCA
CAGTATGGCGCAGGGCTTGACATTGTGCGACCAGGTGTAAACGTGCAGAGCACATAACCCAG
GTTCAACGTATGCCAGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCA
GCCCTTGTTAAACAAAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTACAAATCCGCAGACATCTAAAGA
ATACGGCAACGAGCTTAGGAAGCACGAACCTGTATGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGC
TGCAACTCGTTAA (SEQ ID NO:9)

[0291] Una secuencia de ácido nucleico que codifica la variante de proteasa madura (variante de subtilisina) PX4 es:

GCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGCCGTGTGCAAGCCCCAGCTGCCATAACCGTGGAT
 TGACAGGTTCTGGTGTAAAAGTTGCTGTCCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTA
 AATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTTGTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGC
 ATGGCACGCATGTGGCCGGGACGATTGCTGCTTTAGACAATTCGATTGGCGTTCTTGGCGTA
 GCGCCGAGAGCGGAACTATACGCTGTAAAGTATTAGGGGCGAGCGGTTTCAGGTTTCGGTCA
 GCTCGATTGCCCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATCGTATGCACGTTGCTAATTTGAG
 TTTAGGACTGCAGGCACCAAGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTAAATAGCGCGACTTCTAGA
 GGCGTTCTTGTGTAGCGGCATCTGGAAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCCG
 TTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGACCAAAACAACAACCGCGCCAGCTTTTCA
 CAGTATGGCGCAGGGCTTGACATTGTCGCACCAGGTGTAAACGTGCAGAGCACATACCCAG
 GTTCAACGTATGCCAGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCA
 GCCCTTGTTAAACAAAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTACAAATCCGCAATCATCTAAAGAA
 TACGGCAACGAGCTTAGGAAGCACGAACTTGTATGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCT
 GCAACTCGTTAA (SEQ ID NO:10)

[0292] Una secuencia de ácido nucleico que codifica la variante de proteasa madura (variante de subtilisina) PX5 es:

GCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGCCGTGTGCAAGCCCCAGCTGCCATAACCGTGGAT
 TGACAGGTTCTGGTGTAAAAGTTGCTGTCCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTA
 AATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTTGTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGC
 ATGGCACGCATGTGGCCGGGACGATTGCTGCTTTAGACAATTCGATTGGCGTTCTTGGCGTA
 GCGCCGAGAGCGGAACTATACGCTGTAAAGTATTAGGGGCGAGCGGTTTCAGGTTTCGGTCA
 GCTCGATTGCCCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATCGTATGCACGTTGCTAATTTGAG
 TTTAGGACTGCAGGCACCAAGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTAAATAGCGCGACTTCTAGA
 GGCGTTCTTGTGTAGCGGCATCTGGAAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCCG
 TTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGACCAAAACAACAACCGCGCCGATTTTTTCA
 CAGTATGGCGCAGGGCTTGACATTGTCGCACCAGGTGTAAACGTGCAGAGCACATACCCAG
 GTTCAACGTATGCCAGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCA
 GCCCTTGTTAAACAAAAGAACCCATCTTGGTCCAATCGTCAAATCCGCAATCATCTAAAGAA
 TACGGCAACGAGCTTAGGAAGCACGAACTTGTATGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCT
 GCAACTCGTTAA (SEQ ID NO:11)

5

[0293] Entre los ejemplos de procedimientos de mutagénesis dirigida ampliamente conocidos en el ámbito de especialización se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., el método de mutagénesis dirigida de sitio múltiple QuikChange® incorporado en el kit QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (QCMS; Agilent Technologies - Stratagene, La Jolla, CA), que permite la mutagénesis dirigida de ADN plasmídico hasta en cinco sitios distintos de forma simultánea. En otras partes del presente documento, se describen ejemplos adicionales conocidos de procedimientos de mutagénesis. Los ácidos nucleicos de la invención que codifican variantes de proteasas de la invención tal como se describe en el presente documento, incluidos, p. ej., los polipéptidos de variante de proteasa PX3, PX4 y PX5 también pueden ser elaborados fácilmente, p. ej., a partir de la secuencia nucleotídica que codifica proteasa GG36 expuesta en SEQ ID NO:18 por un experto en la materia utilizando métodos de síntesis genética y/o métodos de PCR de fusión ampliamente conocidos (véase, p. ej., la solicitud de patente de los Estados Unidos con número 2006/0252155).

10

15

[0294] Los ácidos nucleicos que codifican las variantes de proteasas también pueden elaborarse mediante síntesis química utilizando, p. ej., el método con fosoramidita clásico (véase, p. ej., Beaucage et al., Tetrahedron Letters 22:1859-69 (1981)) o el método descrito por Matthes et al., EMBO J. 3:801-05 (1984), p. ej., como se pone en práctica normalmente en métodos de síntesis automatizada. De forma alternativa, los ácidos nucleicos que codifican las variantes de proteasas pueden adquirirse de una variedad de fuentes comerciales, como de The Midland Certified Reagent Company (Midland, Texas) (página web para todo el mundo: oligos.com), The

20

Great American Gene Company (página web para todo el mundo: genco.com), Operon Technologies, Inc. (Alameda, California) (ahora Qiagen, véase su página web para todo el mundo en qiagen.com) y DNA2.0 (Menlo Park, CA). Otras técnicas para sintetizar ácidos nucleicos y principios relacionados se describen, p. ej., en Itakura et al., Annu. Rev. Biochem. 53:323 (1984) e Itakura et al., Science 198:1056 (1984).

- 5 **[0295]** En un aspecto, por ejemplo, si se utiliza la síntesis genética para crear los ácidos nucleicos que codifican variante de proteasa, dichos ácidos nucleicos pueden diseñarse con sitios de restricción flanqueantes como, p. ej., BglII, que puede utilizarse para clonar los ácidos nucleicos que codifican las variantes en un plásmido de expresión (e.g., un plásmido de expresión de *B. subtilis*) también digerido con BglII, como el plásmido de expresión de *B. subtilis* pHPLT-GG36 descrito en el presente documento. Este ejemplo de vector de expresión
- 10 de *B. subtilis* pHPLT contiene el promotor LAT (Plat) de *B. licheniformis*, promotor HPA2 y elementos adicionales de pUB110 (véase, p. ej., McKenzie et al., Plasmid, 15:93-103 (1986)), incluido un gen de replicasa (reppUB), un gen de resistencia a la neomicina (neo) y un marcador de resistencia a la bleomicina (bleo) (véase también la figura 4 de la patente de los Estados Unidos con número 6,566,112). En la figura 2 se proporciona el mapa del plásmido pHPLT-GG36 y la secuencia del casete de expresión de GG36 se proporciona abajo. Para el kit de mutagénesis dirigida de sitio múltiple QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (kit QCMS) o los métodos
- 15 de PCR de fusión descritos en el presente documento, puede utilizarse el plásmido pHPLT-GG36 que comprende ácido nucleico que codifica GG36 de *B. lentus* como molde de ADN para elaborar las variantes de proteasas de la invención. En un formato de ejemplo, los cebadores nucleotídicos que contienen las mutaciones deseadas se aparean con el ácido nucleico que codifica GG36 en el plásmido pHPLT-GG36 y se extienden con un ADN polimerasa como se describe en el manual del producto QCMS de Stratagene y en la solicitud de
- 20 patente de los Estados Unidos con número 2006/0252155 para PCR de fusión. La tabla 1-1 proporciona ejemplos de secuencias nucleotídicas de los cebadores que pueden utilizarse para la mutagénesis dirigida.

Tabla 1-1 Ejemplos de cebadores utilizados para el método de mutagénesis dirigida de sitio múltiple QuikChange®	
Secuencia del cebador	Nombre del cebador
CGGGACGATTGCTGCTTTAGACAATTCGATTGGCGTTC (SEQ ID NO:12)	N76D
GGCGTTCTTGGCGTAGCGCCGAACGCGGAACCTATACG (SEQ ID NO:13)	S87N
CCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATCGTATGCACGTTG (SEQ ID NO:14)	G118R
TAATTTGAGTTTAGGACTGCAGGCACCAAGTGCCACACTTGAGC (SEQ ID NO:15)	S128L,P129Q,S130A
CCAAAACAACAACCGCGCCGATTTTTCACAGTATGGCGC (SEQ ID NO:16)	S188D
ATCTTGGTCCAATCGTCAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGC (SEQ ID NO:17)	V244R

- 25 **[0296]** La incorporación de mutaciones en cada variante de proteasa puede realizarse en múltiples rondas hasta obtener la variante de proteasa final. La amplificación en círculo rodante (GE Healthcare, Piscataway, NJ) puede utilizarse como lo describe el fabricante para amplificar los plásmidos mutantes contenidos en las reacciones de ligación de la PCR de fusión o el QCMS antes de la transformación en células de *B. subtilis* (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

- 30 **[0297]** Las células de *B. subtilis* competentes (fenotipo: $\Delta aprE$, $\Delta nprE$, $oppA$, $\Delta spoII E$, $degU Hy32$, $\Delta amyE::(xylR,pxyIA-comK)$) pueden transformarse con las variantes de plásmidos o 1 μ L de la reacción de la amplificación en círculo rodante para obtener transformantes positivos en proteasa utilizando procedimientos conocidos en el ámbito de especialización (véase, p. ej., WO 02/14490). Las bacterias pueden hacerse competentes mediante la inducción del gen *comK* bajo el control de un promotor inducible por xilosa (véase, p. ej., Hahn et al., Mol. Microbiol. 21:763-775, 1996). Los clones positivos de variante de proteasa pueden
- 35 seleccionarse en placas de agar/leche desnatada, aislarse, secuenciarse y la proteína de variante de proteasa puede producirse en cultivos en frasco agitador para generar cantidades significativas de muestras de enzimas para caracterización.

EJEMPLO 2

Producción de variantes de proteasas en *Bacillus subtilis*

- 40 **[0298]** Las variantes de proteasas (p. ej., variantes de subtilisin) se produjeron mediante el cultivo de los transformantes de *B. subtilis* durante la noche a 37 °C en 10 ml de medio TSB (caldo basado en triptona y soja). Una alícuota de 250 μ L del cultivo a lo largo de la noche se transfirió a 25 ml de un medio definido basado en MOPS en un frasco agitador de 100 ml y se cultivó a 37 °C durante 68 horas. El medio definido se elaboró

fundamentalmente como se conoce en el ámbito de especialización (véase Neidhardt et al., J Bacteriol. 119: 736-747, 1974), salvo que el NH_4Cl , FeSO_4 y el CaCl_2 se dejaron fuera del medio base, se utilizaron 3 mM de K_2HPO_4 , y se suplementó el medio base con 60 mM de urea, 75 g/L de glucosa y 1 % soytone. Asimismo, los micronutrientes se hicieron como una solución madre de 100 X que contenía, en un litro, 400 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mg de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 10 ml de 1M de CaCl_2 y 10 ml de 0,5 M de citrato de sodio. Las proteasas de interés se aislaron del medio de cultivo.

EJEMPLO 3

Métodos analíticos para determinar la pureza de muestras de variante de proteasa

- 10 [0299] En este ejemplo, se describen métodos utilizados para determinar la pureza de las variantes de proteasas recombinantes (p. ej., variantes de subtilisinas) obtenidas de cultivos de *B. subtilis*. Se consideró que las variantes de proteasas eran puras cuando se encontró una sola banda o pico mediante electroforesis en gel y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), respectivamente.

- 15 [0300] Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, por sus siglas en inglés) en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS, por sus siglas en inglés) como se conoce en el ámbito de especialización (Laemmli, Nature, 227:680-685, 1970). No obstante, antes de la desnaturalización de las muestras de proteínas (p. ej., 10 minutos en tampón de muestra que contenga SDS a 100 °C), era necesaria la inactivación de la actividad de proteasa con el fin de evitar la autodegradación. La inactivación de la proteasa se consiguió mediante la incubación de la muestra de proteína con 1 mM de PMSF durante 30 minutos a temperatura ambiente o
20 mediante la precipitación de la proteína con 8 % de ácido tricloroacético (TCA, por sus siglas en inglés) durante 30 minutos en hielo. Las muestras de proteínas se sometieron a PAGE nativa llevada a cabo con un pH de 7.45. El tampón de gel constaba de 20 mM de histidina y 50 mM de ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS) y el 5 % de geles de poliacrilamida tenía una ratio de acrilamida:bisacrilamida de 20:1. Las muestras de proteínas se cargaron en la parte superior de placas de gel y se sometieron a electroforesis hacia el cátodo. El mismo
25 tampón de histidina/MOPS se utilizó como tampón (tanque) de electroforesis, pero ajustado a pH 6.3. Tras la electroforesis (~1-2 horas a 350 V), el gel se remojó en 8 % de ácido acético para fijar las proteínas en el gel y, posteriormente, este se tintó con azul de Coomassie Brilliant Blue R250 y se destiñó como se conoce en el ámbito de especialización, para ubicar las bandas de proteínas en el gel.

- 30 [0301] La pureza de la muestra de proteasa también se confirmó mediante análisis con HPLC utilizando una columna de intercambio de cationes MonoS y después una columna de filtración por gel TSK 2000. La primera se ejecutó en un tampón de 10 mM de fosfato de sodio a un pH de 5.5 con elución de la proteasa ligada utilizando un gradiente lineal de 10-300 mM de fosfato de sodio a un pH de 5.5. La columna de filtración por gel se ejecutó en 0,25 M de acetato de sodio a un pH de 5.5. Los perfiles de elución de proteínas se monitorizaron a 280 nm para ubicar la proteasa de interés y determinar el porcentaje de pureza de la muestra.

35 EJEMPLO 4

Determinación de la concentración de la variante de proteasa

- [0302] En este ejemplo, se describen métodos utilizados para determinar las concentraciones de las variantes de proteasas. En algunos experimentos, se realizaron mediciones de la extinción (absorbencia) a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción calculado (ϵ) y se utilizaron titulaciones de sitio activo para determinar la concentración
40 de proteína en una solución de proteasa purificada, como se describe más abajo.

- [0303] El coeficiente de extinción a 280 nm se calculó a partir del número de triptófanos (Trp, $\epsilon = 5600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) y tirosinas (Tyr, $\epsilon = 1330 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) por molécula de enzima. Para la proteasa PB92, el coeficiente de extinción molar fue $26\,100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (3 residuos de Trp + 7 de Tyr) equivalente a $\epsilon = 1 \%$, medido a 280 nm = 9,7 ($M_r = 26\,729 \text{ Da}$). En el caso de mutantes de proteasas con un número alterado de residuos de triptófano y/o tirosina, se
45 realizaron las consiguientes correcciones.

- [0304] Se obtuvo una estimación de la concentración de moléculas de enzima activa mediante titulación de sitio activo. Dado que el método ampliamente utilizado de acilación mediante N-transcinnamoylimidazol (Bender et al., J. Amer. Chem. Soc., 88:5890-5931, 1966) no funcionó de manera satisfactoria para la proteasa PB92, en su lugar se desarrolló un método que utilizaba el inhibidor irreversible PMSF. En este método, una solución de
50 proteasas con una concentración de enzimas estimada (a partir de la absorción de 280 nm) se mezcló con 0,25, 0,50, 0,75, 1,00 y 1,25 de equivalentes de PMSF, respectivamente, y se dejó reaccionar durante una hora a temperatura ambiente en 10 mM de fosfato de sodio a pH 6.5. La actividad de proteasa residual se midió de forma espectrofotométrica utilizando succinil-L-alanil-L-alanil-L-prolil-L-fenil-alanil-para-nitroanilida (suc-AAPF-pNA) como sustrato. Para estos estudios, la pureza (y, por tanto, la concentración) del PMSF se determinó
55 mediante espectroscopia de RMN y se prepararon soluciones madre de PMSF en isopropanol. Se halló que los resultados de la titulación de sitio activo concordaban con los resultados de la concentración de proteínas del control de pureza realizado mediante el método con HPLC.

EJEMPLO 5

Ensayos

[0305] En este ejemplo, se describen métodos para evaluar la estabilidad y la eficacia de limpieza de una variante de proteasa de la invención.

Método de hidrólisis de AAPF

- 5 **[0306]** La termoestabilidad de la serina variante de proteasa se determinó sometiendo a ensayo la actividad de proteasa con el ensayo de AAPF tras la incubación de variantes de proteasas a 68 °C durante 1 hora. En las condiciones del ensayo, la actividad residual de la proteasa de referencia (p. ej., GG36 natural = GCI-P036) era de aproximadamente un 50 %. El equipamiento empleado fue: MTP con base plana (Costar, número 9017), Biomek FX y/o Biomek FXp Robot (Beckman Coulter), lector Spectramax Plus 384 MTP Reader (Molecular Devices), incubador/agitador iEMS (1 mm de amplitud) (Thermo/Labsystems), cinta de sellado (Nunc, número 236366) y baño de hielo. Se preparó un tampón de glicina disolviendo 3,75 g de glicina (Merck, número 1.04201.1000) en 960 mL de agua. A esta solución se añadió 1 ml de 5 % Tween®-80 (Sigma, número P-8074) y 10 ml de una solución madre de 1000 mM de CaCl₂ (Merck, número 1.02382.1000) (29,4 g disueltos en 200 ml). El pH se ajustó a 10.5 con 4 N de NaOH y el volumen se elevó a 1000 ml. Las concentraciones finales de glicina, CaCl₂ y TWEEN®-80 fueron: 50 mM, 10 mM and 0,005 % respectivamente. Las incubadoras se ajustaron a 68 °C (para la incubación) y a 25 °C (para el ensayo de AAPF). Se añadieron 90 µl y 190 µl de tampón de glicina a las placas de dilución e incubación vacías, respectivamente. Entonces, se añadieron 10 µl de sobrenadante a la placa de dilución, seguido por la adición de 10 µl de la placa de dilución a la placa de incubación. Posteriormente, se añadieron 10 µl de mezcla de la placa de incubación a una placa calentada previamente que contenía sustrato suc-AAPF-pNA. Se leyó la placa de suc-AAPF-pNA con el lector de MTP a 410 nm (medición a t = 0). Se cubrió la placa de incubación con cinta y se incubó durante 1 hora a 68 °C y 400 rpm. Al final de la incubación, se quitó la placa de la incubadora y se enfrió en hielo durante al menos 5 minutos. Se transfirieron 10 µl de mezcla de la placa de incubación a la placa que contenía el sustrato suc-AAPF-pNA y se leyó la placa a 410 nm (medición a t=60). El porcentaje de actividad residual se calculó como:

$$25 \quad \% \text{ de actividad residual: } (mDO.\text{mín-1 a t=60}) / (mDO.\text{mín-1 a t=0}) \times 100$$

Ensayos de estabilidad de quelantes y surfactantes

[0307] La estabilidad del LAS y el LAS/EDTA se midió tras la incubación de la proteasa de prueba en presencia de LAS y LAS/EDTA, respectivamente, como una función de actividad residual determinada con el ensayo de AAPF.

30 Método de estabilidad de LAS**Reactivos:****[0308]**

Dodecylbencenosulfonato, sal de sodio (=LAS): Sigma D-2525

TWEEN®-80: Sigma P-8074

- 35 Tampón TRIS (ácido libre): Sigma T-1378); se disuelven 6,35 g en aproximadamente 960 ml de agua; el pH se ajusta a 8.2 con 4 N de HCl. La concentración final de TRIS es de 52,5 mM.

Solución madre de LAS: Preparar una solución de LAS al 10,5 % en agua MQ (=10,5 g por 100 ml de MQ)

Tampón TRIS-100 mM / pH 8.6 (100 mM de Tris/Tween®-80 al 0,005 %)

Tampón TRIS-Ca, pH 8.6 (100 mM de Tris/10 mM de CaCl₂/Tween®-80 al 0,005 %)

40 Hardware:**[0309]**

MTP de base plana (Costar, número 9017)

Biomek FX

ASYS multipipeta

- 45 Lector de MTP Spectramax

Incubadora/agitador iEMS

Incubadora/agitador Innova 4330

Pipeta multicanal Biohit

Agitador ThermoStar de BMG

[0310] Se preparó una solución de LAS al 0,063 % en 52,5 mM de tampón TRIS a pH 8.2. La solución de trabajo de suc-AAPF-pNA se preparó añadiendo 1 ml de 100 mg/ml de solución madre de suc-AAPF-pNA (en DMSO) a 100 ml (100 mM) de tampón TRIS, a pH 8.6. Para diluir los sobrenadantes, se llenaron las placas con bases planas con tampón de dilución, y se añadió y se mezcló bien una alícuota del sobrenadante. La ratio de dilución dependió de la concentración de los controles de proteasa en las placas de cultivo (actividad de AAPF). La concentración de proteínas deseada era de 80 ppm.

[0311] Se añadieron 10 µl del sobrenadante a 190 µl de tampón/pocillo de LAS al 0,063 %. La MTP se cubrió con cinta, se agitó durante unos segundos y se colocó en una incubadora (Innova 4230) a 25 °C o 35 °C para ASP, o 45 °C para BPN' o GG36, durante 60 minutos a una agitación de 200 rpm. La actividad inicial ($t=10$ minutos) se determinó tras 10 minutos de incubación transfiriendo 10 µl de la mezcla en cada pocillo a una MTP fresca que contenía 190 µl de solución de trabajo de suc-AAPF-pNA. Estas soluciones se mezclaron bien y la actividad de AAPF se midió utilizando un lector de MTP (20 lecturas en 5 minutos y a 25 °C).

[0312] La actividad final ($t=60$ minutos) se determinó quitando otros 10 µl de solución de la placa incubadora tras 60 minutos de incubación. Entonces, se determinó la actividad de AAPF como se ha descrito anteriormente. La estabilidad de las muestras se determinó calculando la ratio de la actividad de AAPF residual e inicial de la siguiente forma:

$$\text{Actividad residual (\%)} = (\text{valor } t=60) * x 100 / (\text{valor } t=10).$$

Método de estabilidad de LAS/EDTA

[0313] La estabilidad de una variante de proteasa en presencia de un surfactante aniónico representativo (LAS=sulfonato alquilobenceno lineal, dodecilbencenosulfonato de sodio-DOBS) y EDTA disódico se midió tras la incubación en condiciones definidas y la actividad residual se determinó mediante el ensayo de AAPF. Los reactivos utilizados fueron dodecilbenceno sulfonato, sal de sodio (DOBS, Sigma, número D-2525), TWEEN®-80 (Sigma, número P-8074), EDTA disódico (Siegfried Handel, número 164599-02), HEPES (Sigma, número H-7523), tampón no sometido a tensiones: 50 mM de HEPES (11,9 g/l) + TWEEN®-80 al 0,005 %, a pH 8.0, tampón sometido a tensiones: 50 mM de HEPES (11,9 g/l), 0,1 % (p/v) DOBS (1 g/l), 10 mM de EDTA (3,36 g/l), a pH 8.0, sobrenadantes de cultivo de proteasa de referencia y variante de proteasa, con 200 - 400 µg/ml de proteína. El equipamiento empleado fue MTP con base en forma de V o de U como placas de dilución (Greiner 651101 y 650161, respectivamente), MTP con base plana (Corning 9017) para tampón no sometido a tensiones o de LAS/EDTA así como para placas de suc-AAPF-pNA, Biomek FX (Beckman Coulter), lector de MTP Spectramax Plus 384 (Molecular Devices), incubadora/agitador iEMS (1 mm de amplitud) de Thermo Electron Corporation, cinta de sellado: Nunc (236366).

[0314] La incubadora/agitador iEMS (Thermo/Labsystems) se ajustó a 29 °C. Los sobrenadantes del cultivo se diluyeron en placas que contenían tampón no sometido a tensiones en una concentración de ~ 25 ppm (placa de dilución maestra). Se añadieron 20 µl de muestra de la placa de dilución maestra a placas que contenían 180 µl de tampón no sometido a tensiones para proporcionar una concentración de incubación final de 2,5 ppm. Los contenidos se mezclaron y se mantuvieron a temperatura ambiente, y se realizó un ensayo de AAPF en esta placa. También se añadieron 20 µl de muestra de la placa de dilución maestra a placas que contenían 180 µl de tampón sometido a tensiones (50 mM de HEPES (11,9 g/l), 0,1 % (p/v) DOBS (1 g/l), 10 mM de EDTA (3,36 g/l), a pH 8.0). Las soluciones se mezclaron y se pusieron inmediatamente en el agitador iEMS a 29 °C durante 30 minutos a 400 rpm. Tras 30 minutos de incubación, se realizó un ensayo de AAPF en la placa sometida a tensiones. (DO = absorbencia de densidad óptica). La estabilidad de las muestras se determinó calculando la ratio de la actividad de AAPF residual e inicial de la siguiente forma: Actividad residual (%) = (mDO.min-1 sometida a tensiones)*100 / (mDO. min-1 no sometida a tensiones).

EJEMPLO 6

Prueba de eficacia de lavado para la variante PX3

[0315] En este ejemplo, se describen métodos adecuados para la evaluación de la eficacia de limpieza de tejidos y de la vajilla de la variante de proteasa PX3 (p. ej., variante de subtilisina) y la subtilisina de referencia GCI-P038 en detergentes para la colada y el lavado de la vajilla comercializados.

Eficacia de lavado de la vajilla

[0316] En el presente documento se describen los métodos utilizados para medir la eficacia de lavado de la vajilla de las variantes de proteasas de la invención (p. ej., variantes de subtilisinas) y la subtilisina de referencia GCI-P038 en detergentes para el lavado de la vajilla comercializados.

[0317] La eficacia de las variantes de proteasas se probó en varias condiciones de lavado de la vajilla de forma automática. Las composiciones de los detergentes para el lavado de la vajilla se muestran en las tablas 6-1 y 6-2. Estos detergentes están comercializados por wfk Testmaterials (www.testgewebe.de/en/products/detergents/) y se hace referencia a ellos por sus denominaciones de wfk Testmaterials. Estos detergentes se obtuvieron de la fuente sin la presencia de enzimas, con el fin de permitir el análisis de las variantes de proteasas.

Tabla 6-1 Detergente sin fosfato IEC-60436 WFK Tipo B (pH=10.4 en 3g/l)	
Componente	% en peso
Citrato de sodio dihidratado	30,0
Sal de sodio de copolímero de ácido acrílico/ácido maleico	12,0
Perborato de sodio monohidratado	5,0
TAED	2,0
Disilicato de sodio Protol A (Cognis)	25,0
Alcohol graso lineal etoxilado	2,0
Carbonato de sodio anhidro	añadir hasta 100

Tabla 6-2 Detergente con fosfato: IEC-60436 WFK Tipo C (pH=10.5 en 3 g/l)	
Componente	% en peso
Tripolifosfato de sodio	23,0
Citrato de sodio dihidratado	22,3
Sal de sodio de copolímero de ácido acrílico/ácido maleico	4,0
Perborato de sodio monohidratado	6,0
TAED	2,0
Disilicato de sodio: Protol A (Cognis)	5,0
Alcohol graso lineal etoxilado	2,0
Carbonato de sodio anhidro	añadir hasta 100

- 5 **[0318]** Más abajo, se proporcionan los protocolos para la preparación de cada uno de los tipos de manchas (yema de huevo, carne picada y huevo, así como huevo con leche). Antes de aplicar los tipos de suciedad individuales a las piezas de vajilla de prueba, estas se lavaron en profundidad. Esto era especialmente necesario, dado que todavía puede haber presentes residuos de determinadas manchas persistentes en las piezas de la vajilla desde pruebas anteriores. También se sometieron nuevas piezas de vajilla a tres lavados en profundidad antes de utilizarse por primera vez en la prueba.

Preparación de manchas de yema de huevo sobre acero inoxidable

- 10 **[0319]** Las láminas de acero inoxidable (10 x 15 cm; cepilladas en uno de sus lados) utilizadas en estos experimentos se lavaron en profundidad a 95 °C en un lavavajillas de laboratorio con un detergente comercial de elevada alcalinidad (p. ej., detergente ECOLAB®; Henkel) para proporcionar láminas que estuvieran limpias y no tuvieran grasa. Antes de su primer uso, se eliminaron las rebabas de estas láminas. Las láminas se secaron durante 30 minutos a 80 °C en una caja térmica antes de ser ensuciadas con yema de huevo. Las superficies
- 15 cepilladas no se tocaron antes de ser ensuciadas. Asimismo, no se permitieron manchas de agua o pelusas sobre las superficies. Las láminas enfriadas se pesaron antes de ser ensuciadas.

- [0320]** Las yemas de huevo se prepararon separando las yemas de aproximadamente 10-11 huevos (200 g de yema de huevo) de las claras. Las yemas se batieron con un tenedor en un vaso de laboratorio para homogeneizar la suspensión de huevo. Entonces, se filtraron las yemas (malla de tamiz de aproximadamente 0,5 mm) para eliminar las partículas gruesas y cualquier fragmento de cáscara de huevo.
- 20

[0321] Se utilizó un cepillo plano (2,5") para aplicar $2,0 \pm 0,1$ g de suspensión de yema de huevo de la forma más uniforme posible en un área de 140 cm² sobre los lados cepillados de cada lámina de acero inoxidable, dejando una orilla de aproximadamente 1 cm de ancho sin ensuciar (se empleó cinta adhesiva en caso de ser necesaria).

Las láminas sucias se secaron en sentido horizontal (para evitar la formación de gotas sobre los bordes de las láminas) a temperatura ambiente durante 4 horas (máx. 24 horas).

- [0322]** Para desnaturalizar las proteínas de yema de huevo, se sumergieron las láminas durante 30 segundos en agua hirviendo desmineralizada (utilizando un dispositivo de sujeción, en caso de ser necesario). Entonces, las láminas se secaron de nuevo durante 30 minutos a 80 °C. Después de secarse y enfriarse, las láminas se pesaron. Después de pesarlas, se dejaron las placas durante al menos 24 horas (20 °C, 40-60 % de humedad relativa) antes de someterlas a la prueba de lavado. Con el fin de cumplir con los requisitos de las pruebas, en estas solamente se utilizaron las láminas con $1000 \pm 100 \text{ mg}/140 \text{ cm}^2$ (yema de huevo tras la desnaturalización). Después de llevar a cabo las pruebas de lavado, las láminas se secaron durante 30 minutos a 80 °C en la caja térmica y se pesaron de nuevo después de enfriarse. El porcentaje de eficacia de limpieza se determinó dividiendo los mg de yema de huevo liberados tras el lavado entre los mg de yema de huevo aplicados y multiplicando por 100.

Preparación de manchas de carne picada y huevo sobre platos de porcelana

- [0323]** Para estos experimentos, se utilizaron platos de postre (Arzberg, 19 cm de diámetro, blancos, porcelana vitrificada) conforme a EN 50242, formulario 1495, número 0219. Se cortaron de forma fina 225 g de magra de cerdo y ternera (ratio 50:50) y se mantuvieron fríos. La mezcla se procesó dos veces mediante una picadora. Se evitaron temperaturas superiores a 35 °C. Los 225 g de carne picada se mezclaron entonces con 75 g de huevo (clara y yema mezcladas). Después, se congeló la preparación durante hasta tres meses a -18 °C antes de su uso. Si no se disponía de cerdo, se utilizó 100 % de ternera, dado que son intercambiables.

- [0324]** Se devolvió la mezcla de carne picada y huevo (300 g) a temperatura ambiente y se mezcló con 80 ml de agua desmineralizada. Entonces, se homogeneizó la mezcla durante dos minutos utilizando una batidora manual de cocina. Se utilizó un tenedor para expandir 3 g de la mezcla de carne picada/huevo/agua sobre cada plato de porcelana blanco, dejando un margen de aproximadamente 2 cm alrededor de la orilla. La cantidad aplicada fue de $11,8 \pm 0,5 \text{ mg}/\text{cm}^2$. Los platos se secaron durante 2 horas a 120 °C en una caja térmica calentada previamente. Tan pronto como los platos se enfriaron, estaban listos para su uso.

- [0325]** Tras realizar las pruebas del lavado de la vajilla, se pulverizaron los platos con solución de ninhidrina (preparada al 1 % de etanol) para una mejor identificación de los residuos de proteínas de la carne picada. Para facilitar la reacción de color, se calentaron los platos durante 10 minutos a 80 °C en la caja térmica. La evaluación de la eficacia de lavado se realizó inspeccionando visualmente las reacciones de color del residuo de carne picada con referencia al catálogo fotográfico de IKW (IKW - The German Cosmetic, Toiletry, Perfumery and Detergent Association).

Preparación de manchas de huevo/leche sobre acero inoxidable

- [0326]** Las láminas de acero inoxidable (10 x 15 cm; cepilladas en uno de sus lados) utilizadas en estos experimentos se lavaron en profundidad a 95 °C en un lavavajillas de laboratorio con un detergente comercial de elevada alcalinidad para quitar la grasa y limpiar las láminas. Las láminas se secaron con un paño de celulosa. Las superficies cepilladas no se tocaron antes de ser ensuciadas. Asimismo, no se permitieron manchas de agua o pelusas sobre las superficies. Antes de ser ensuciadas, las láminas se pusieron en una caja térmica a 80 °C durante 30 minutos. Las láminas enfriadas se pesaron antes de ensuciarse.

- [0327]** Las yemas y las blancas de huevos crudos enteros (3-4 huevos; aproximadamente 160 g/huevo) se pusieron en un bol y se batieron con un batidor de huevo. Entonces, se añadieron a la mezcla 50 ml de leche semidesnatada (1,5 % de grasa, temperatura ultraelevada, homogeneizada). La leche y el huevo se mezclaron sin generar espuma. Se utilizó un cepillo plano para distribuir de manera uniforme $1,0 \pm 0,1 \text{ g}$ de la mezcla de huevo y leche sobre el lado cepillado de las láminas de acero inoxidable, utilizando una balanza para comprobar la distribución. Se dejó un margen de aproximadamente 1,0 cm alrededor de los lados cortos de las láminas. Las láminas sucias se secaron en sentido horizontal (para evitar la formación de gotas sobre los bordes de las láminas) a temperatura ambiente durante 4 horas (máx. 24 horas).

- [0328]** Entonces, se sumergieron las láminas durante 30 segundos en agua hirviendo desmineralizada (utilizando un dispositivo de sujeción, en caso de ser necesario). Entonces, las láminas se secaron de nuevo durante 30 minutos a 80 °C. Después de secarse y enfriarse, las láminas se pesaron. Después de pesarlas, se dejó reposar las placas durante al menos 24 horas (20 °C, 40-60 % de humedad relativa) antes de someterlas a la prueba de lavado. Con el fin de cumplir con los requisitos de las pruebas, solamente se utilizaron láminas con $190 \pm 10 \text{ mg}$ de yema de huevo/leche.

- [0329]** Después de llevar a cabo las pruebas de lavado, las láminas se secaron durante 30 minutos a 80 °C en la caja térmica y se pesaron de nuevo después de enfriarse. El porcentaje de eficacia de limpieza se determinó dividiendo los mg de huevo/leche liberados tras el lavado entre los mg de huevo/leche aplicados y multiplicando por 100.

Equipamiento y condiciones de lavado

[0330] Las pruebas de lavado se realizaron en un lavavajillas automático (Miele, modelo G690SC), equipado con piezas de vajilla sucias y láminas de acero inoxidable, preparadas como se ha descrito anteriormente. Se utilizó una cantidad de detergente definida. La temperatura en la prueba fue de 50 °C. La dureza del agua era de 21° GH (dureza alemana).

5 [0331] Tal como se ha descrito anteriormente, tras el lavado, los platos ensuciados con carne picada fueron evaluados visualmente utilizando una escala de calificación fotográfica del 0 al 10, donde «0» designaba un plato totalmente sucio y «10» designaba un plato limpio. Estos valores corresponden a la capacidad de eliminar la suciedad o las manchas (SR, por sus siglas en inglés) del detergente que contiene las enzimas.

10 [0332] Los platos de acero inoxidable lavados que habían sido ensuciados con yema de huevo o yema de huevo/leche se analizaron gravimétricamente para determinar la cantidad de manchas residuales tras el lavado. La variante de subtilisina PX3 y la subtilisina de referencia GCI-P038 se probaron a un nivel de entre 0 y 30 mg/proteína activa por lavado.

15 [0333] Los resultados de varias pruebas de lavado de la vajilla se proporcionan más abajo, en las tablas 6-3 a 6-6. En cada experimento, se utilizaron distintas concentraciones de proteasa activa por lavado. A la eficacia de lavado de la subtilisina de referencia GCI-P038 se le asignó un valor de «100», mientras que la eficacia de lavado de las variantes se comparó con este valor. Por ejemplo, si la subtilisina de referencia GCI-P038 tuviera un resultado del 45 % de eliminación de manchas y una variante tuviera un resultado del 52 % de eliminación de manchas, el resultado de la variante de subtilisina mostrado como índice de eficacia (IE) sería $52/45 \times 100 = 116$. En consecuencia, en los dos detergentes probados, la variante de subtilisina PX3 era más efectiva o igual de efectiva que la subtilisina de referencia GCI-P038 para la eliminación de manchas proteínicas en aplicaciones de lavado de la vajilla.

Tabla 6-3 Detergente con fosfato, 50 °C, 21 °GH, dosificado a 0,05 % de proteína activa			
Enzima	IE	IE	IE
	Yema de huevo	Carne picada	Yema de huevo/leche
GCI-P038 de referencia	100	100	100
Variante PX3	111	157	147

Tabla 6-4 Detergente con fosfato 50 °C, 21 °GH, dosificado a 0,15 % de proteína activa			
Enzima	IE	IE	IE
	Yema de huevo	Carne picada	Yema de huevo/leche
GCI-P038 de referencia	100	100	100
Variante PX3	135	100*	113
* En estas condiciones especificadas la eliminación de suciedad mediante GCI-P038 fue del 100 %.			

Tabla 6-5 Detergente sin fosfato 50 °C, 21 °GH, dosificado a 0,05 % de proteína activa			
Enzima	IE	IE	IE
	Yema de huevo	Carne picada	Yema de huevo/leche
GCI-P038 de referencia	100	100	100
Variante PX3	124	150	117

Tabla 6-6 Detergente sin fosfato 50 °C, 21 °GH, dosificado a 0,15 % de proteína activa			
Enzima	IE	IE	IE
	Yema de huevo	Carne picada	Yema de huevo/leche

Tabla 6-6 Detergente sin fosfato 50 °C, 21 °GH, dosificado a 0,15 % de proteína activa			
GCI-P038 de referencia	100	100	100
Variante PX3	115	118	103

EJEMPLO 7**Pruebas de eficacia de lavado**

- 5 **[0334]** En este ejemplo, se describen métodos adecuados para evaluar la eficacia de limpieza de tejidos de las variantes de proteasas de la invención en detergentes para la colada comercializados.

Tabla 7-1 Condiciones de lavado de la colada							
Región	Forma	Dosis	Detergente*	Tampón	Gpg	pH	T (°C)
Colada (granulado y líquido para uso intensivo)							
NA	HDL	0,78 g/l	P&G TIDE® 2X	5 mM de HEPES	6	8,0	20
EO	HDL	5,0 g/L	Henkel PERSIL™	5 mM de HEPES	12	8,2	40
EO	HDG	8,0 g/L	P&G ARIELI™	2 mM Na ₂ CO ₃	12	10,5	40
JPN	HDG	0,7 g/L	P&G TIDE®	2 mM Na ₂ CO ₃	6	10,0	20
NA	HDG	1,0 g/L	P&G TIDE®	2 mM Na ₂ CO ₃	6	10,0	20
* Abreviaturas: Procter & Gamble (P&G); Reckitt Benckiser (RB); detergente líquido para uso intensivo (HDL, por sus siglas en inglés); detergente granulado para uso intensivo (HDG, por sus siglas en inglés).							

Ensayo con micromuestras de sangre, leche y tinta (BMI, por sus siglas en inglés)

- 10 **[0335]** La eficacia de eliminación de manchas de las variantes de proteasas puede determinarse a escala de una placa microtituladora (MTP, por sus siglas en inglés) en detergentes comercializados. Las muestras de una enzima de proteasa de referencia (p. ej., subtilisina de referencia) y las variantes de proteasas se obtienen de caldo de cultivo filtrado de cultivos llevados a cabo en placas microtituladoras durante 3 días a 37 °C/ 300 rpm/ 90 % de humedad relativa. El equipamiento empleado incluye: placas de poliestireno de 96 pocillos (Costar, número 9017, base plana sin tratar), Biomek FX y/o Biomek FXp (Beckman Coulter), Spectramax Plus 384 (Molecular Devices), incubadora/agitador iEMS con 1 mm de amplitud (Thermo Electron Corporation) y cinta de sellado (Nunc, número 236366). Los reactivos utilizados incluyen: tampón de 5 mM de HEPES, pH 8.0 o 5 mM de MOPS, pH 7, 3:1 Ca: Mg para dureza media del agua (CaCl₂: MgCl₂·6H₂O); 15 000 granos por galón (gpg) de solución madre diluidos a 6 gpg, dos muestras de BMI (sangre/leche/tinta) por placa: muestras de algodón con
- 15 BMI EMPA-116 procesadas por CFT: dos muestras perforadas y enjuagadas previamente por pocillo, y detergente disponible en el mercado TIDE® 2X inactivado por calor en el que puede confirmarse la falta de actividad de proteasa. En este ensayo, las proteasas hidrolizan el sustrato y liberan pigmento y partículas insolubles del sustrato.
- 20

Tabla 7-2 Soluciones detergentes de trabajo					
Detergente	Temp (°C)	Detergente g/L	pH	Tampón	Granos por galón (gpg)
TIDE® 2X	16	0,98	8	5 mM de HEPES	6
TIDE® 2X	32	0,98	8	5 mM de HEPES	6
TIDE® 2X	16	0,98	7	5 mM de MOPS	6

- 25 **[0336]** La incubadora se configura a la temperatura deseada (16 °C o 32 °C). En primer lugar, se añaden muestras de 10 µL de las placas de dilución maestra de ~10 ppm de enzima a las placas con dos muestras de BMI con 190 µL de soluciones detergentes de trabajo mencionadas anteriormente. El volumen se ajusta para proporcionar una concentración final de 0,5 ppm de variantes de proteasas en las placas del ensayo. Entonces, las placas se transfieren inmediatamente a incubadoras iEMS y se incuban durante 30 minutos con agitación a

1400 rpm a una temperatura determinada. Tras la incubación, se transfieren 100 µL de sobrenadante a una nueva placa de 96 pocillos y se mide la absorbencia en un lector de MTP a 405 nm y/o 600 nm. También se incluyen en la prueba pocillos de control que contienen una o dos micromuestras y detergente sin la adición de muestras de proteasa. La medición de absorbencia a 405 nm proporciona un valor más elevado y monitoriza la eliminación de pigmentos, mientras que la medición de la absorbencia a 600 nm monitoriza la turbiedad y la limpieza.

Cálculo de la actividad de eliminación de manchas:

[0337] El valor de absorbencia obtenido se corrige para el valor en blanco (sustrato sin enzima), proporcionando una medición de la actividad hidrolítica. Para cada muestra (p. ej., enzima de variante de proteasa o enzima de proteasa de referencia), se calcula el índice de eficacia (IE). El índice de eficacia compara la eficacia de la variante de proteasa (valor real) y la enzima de proteasa de referencia estándar (valor teórico) en la misma concentración de proteínas. Además, los valores teóricos de la enzima estándar pueden calcularse utilizando los parámetros de la ecuación de Langmuir. Un índice de eficacia (IE) que es mayor que 1 (IE>1) identifica una variante de proteasa mejor en comparación con la enzima de proteasa de referencia (p. ej., subtilisina natural); esto es, un índice de eficacia mayor que 1 identifica una variante de proteasa que tiene una capacidad potenciada o mejorada de reducir, eliminar o quitar una mancha de interés en comparación con la capacidad de la enzima de proteasa de referencia de reducir o eliminar la misma mancha o una similar. Un IE de 1 (IE=1) identifica una variante de proteasa que tiene la misma eficacia o aproximadamente la misma eficacia que la enzima de proteasa de referencia (esto es, la variante de proteasa tiene la misma o aproximadamente la misma capacidad de reducir, eliminar o quitar una mancha de interés en comparación con la capacidad de la enzima de proteasa de referencia de reducir o eliminar la misma mancha o una similar). Un IE menor que 1 (IE<1) identifica una variante de proteasa que tiene una eficacia menor que la enzima de proteasa de referencia (esto es, la variante de proteasa tiene una capacidad reducida o más baja de reducir, eliminar o quitar una mancha de interés en comparación con la capacidad de la enzima de proteasa de referencia de reducir o eliminar la misma mancha o una similar). En consecuencia, el valor del IE identifica variantes de proteasas que tienen una capacidad potenciada o mejorada de reducir, eliminar o quitar una mancha de interés en comparación con la capacidad de la enzima de proteasa de referencia de reducir o eliminar la misma mancha o una similar en determinadas circunstancias o condiciones, así como variantes de proteasas cuyo uso es menos deseable en determinadas circunstancias como, p. ej., aquellas variantes de proteasas que tienen una capacidad disminuida de reducir, eliminar o quitar una mancha de interés en comparación con la capacidad de una proteasa de referencia de eliminar la misma mancha o una similar.

EJEMPLO 8

Eficacia de limpieza de las variantes de proteasas PX3, PX4 y PX5

Ensayo de micromuestras de BMI en aplicaciones de colada

[0338] En la tabla 8-1 se muestran los resultados de los experimentos realizados para determinar la eficacia de limpieza de las variantes PX4 y PX5 en aplicaciones de colada. Los detergentes de prueba utilizados fueron los detergentes inactivados por calor comercializados TIDE® 2X Free (P&G; "NA HDL") y TIDE Free (P&G; "NA HDD"). La eficacia de limpieza de las micromuestras manchadas de BMI se probó utilizando 0,2 ppm de las variantes a 25 °C durante 30 minutos con una agitación de 1400 rpm en un volumen de 200 µL. La funcionalidad de las variantes de GCI-P036 se cuantificó como un índice de eficacia (IE), que es la ratio de la eficacia de una variante y una proteína GCI-P036 original. También se sometieron a prueba la subtilisina FNA (BPN'-Y217L) y las proteínas GCI-P036-S87N-G118V-S128L-P129Q-S130A.

Tabla 8-1. Valores del I _e de variantes de GCI-P036 sometidas a prueba para la eficacia de eliminación de manchas en micromuestras de BMI en detergentes NA HDL y NA HDD			
UV #	Variantes basadas en GCI-P036	NA HDL pH 8	NA HDD pH 10
GCI-P036	-	1,00	1,00
PX4	N76D/S87R/G118R/S128L/ P129Q/S130A	0,97	1,07
PX5	S87R/ N76D/G118R/ S128L/ P129Q/ S130A/ S188D/V244R	0,87	0,98
Variante de GCI-P036	S87N-G118V-S128L-P129Q-S130A	1,22	1,14
FNA	BPN' Y217L	1,29	0,66

EJEMPLO 9**Eficacia de limpieza de las variantes de proteasas PX3, PX4 y PX5****Ensayo de micromuestras con yema de huevo batida en aplicaciones de lavado de la vajilla**

[0339] La eficacia de eliminación de manchas de las variantes de proteasas (p. ej., variantes de subtilisinas) se determinó a escala de una placa microtituladora (MTP) en detergentes comercializados (CALGONIT® (Reckitt-Benckiser) y CASCADE® (P&G)). Las muestras para someter a prueba las variantes de subtilisinas se obtuvieron de caldo de cultivo filtrado de cultivos llevados a cabo en placas microtituladoras durante 3 días a 37 °C/ 300 rpm/ 90 % de humedad relativa. El equipamiento utilizado incluía: un robot Biomek FX (Beckman Coulter), una placa microtituladora SpectraMAX (MTP) (tipo 340; Molecular Devices), una incubadora/agitador iEMS (Thermo/Labsystems); MTP de base plana (Costar, tipo 9017) para la lectura de placas de reacción tras la incubación MTP con base en forma de V (Greiner 651101) para la dilución previa del sobrenadante. Como sustrato, se utilizaron micromuestras CS-38 (yema de huevo con pigmento, envejecidas por calentamiento), obtenidas de CFT Vlaardingen. Se utilizaron dos muestras por pocillo. Para preparar la solución detergente, se utilizaron pastillas para el lavado de la vajilla de forma automática (ADW, por sus siglas en inglés) de Calgonit 5 en 1. Para inactivar la actividad de proteasa presente en las pastillas, se disolvió una pastilla de 21 g en agua Milli-Q calentada en un baño de agua a una temperatura de 60 °C. Se enfrió la solución a temperatura ambiente y el volumen del agua se ajustó a 700 mL. La solución también se diluyó con agua para obtener una concentración final de 3 g/L. La dureza del agua se ajustó a to 21 °GH añadiendo 1,46 ml de la mezcla Ca/Mg (mezcla Ca/Mg ((3:1), 1,92 M de CaCl₂ = 282,3 g/L de CaCl₂·2H₂O; 0,64 M de MgCl₂ = 130,1 g/L de MgCl₂·6H₂O), 15 000 gpg). Las muestras de enzimas se diluyeron previamente en 10 mM de NaCl, 0,1 mM de CaCl₂, solución TWEEN®-80 al 0,005 % y se sometieron a prueba en concentraciones apropiadas.

[0340] Se ajustó la incubadora a la temperatura deseada de 40 °C o 50 °C, y se añadieron 72 µl de tampón de dilución a la placa con base en forma de V vacía (= placa de dilución) seguido de 8 µl de sobrenadante. Entonces, se añadieron 9 µl de la placa de dilución a placas que contenían las micromuestras incubadas en 171 µl de solución detergente. La placa de micromuestras (con detergente y enzima) se cubrió con cinta y se puso en la incubadora/agitador durante 30 minutos a 1400 rpm. Tras la incubación, se transfirieron 75 µl de la mezcla de reacción a una placa con base plana vacía y se leyó la absorbencia en un lector de MTP a 405 nm después de eliminar las burbujas con un secador de pelo. En la prueba, también se incluyeron ensayos en blanco que contenían una o dos micromuestras y detergente sin la adición de las muestras que contenían la subtilisina de referencia.

Tabla 9-1. Condiciones de lavado de la vajilla de forma automática

Región	Forma	Dosis	Detergente*	Tampón	Gpg	pH	T (°C)
EO	ADW	3,0 g/L	RB CALGONIT™	2 mM Na ₂ CO ₃	21	10,0	40
NA	ADW	3,0 g/L	P&G CASCADE™	2 mM Na ₂ CO ₃	9	10,0	40

* Abreviaturas: Procter & Gamble (P&G); y Reckitt Benckiser (RB).

Cálculo de la actividad de eliminación de manchas:

[0341] El valor de absorbencia obtenido se corrigió para el valor en blanco (sustrato sin enzima), proporcionando una medición de la actividad hidrolítica. Para cada muestra (p. ej., enzima de variante de proteasa o enzima de proteasa de referencia), se calculó el índice de eficacia (IE). El índice de eficacia compara la eficacia de la variante de proteasa (valor real) y la enzima de proteasa de referencia (valor teórico) en la misma concentración de proteínas. Además, los valores teóricos de la enzima estándar pueden calcularse utilizando los parámetros de la ecuación de Langmuir. Un índice de eficacia (IE) que es mayor que 1 (IE>1) identifica una variante de proteasa mejor en comparación con la enzima de proteasa de referencia (p. ej., subtilisina natural); esto es, un índice de eficacia mayor que 1 identifica una variante de proteasa que tiene una capacidad potenciada o mejorada de reducir, eliminar o quitar una mancha de interés (p. ej., yema de huevo con pigmento, envejecidas por calentamiento) en comparación con la capacidad de la enzima de proteasa de referencia de reducir o eliminar la misma mancha o una similar. Un IE de 1 (IE=1) identifica una variante de proteasa que tiene la misma eficacia o aproximadamente la misma eficacia que la enzima de proteasa de referencia (esto es, la variante de proteasa tiene la misma o aproximadamente la misma capacidad de reducir, eliminar o quitar una mancha de interés en comparación con la capacidad de la enzima de proteasa de referencia de reducir o eliminar la misma mancha o una similar). Un IE menor que 1 (IE<1) identifica una variante de proteasa que tiene una eficacia menor que la enzima de proteasa de referencia (esto es, la variante de proteasa tiene una capacidad reducida o más baja de reducir, eliminar o quitar una mancha de interés en comparación con la capacidad de la enzima de proteasa de referencia de reducir o eliminar la misma mancha o una similar). En consecuencia, el valor del IE identifica variantes de proteasas que tienen una capacidad potenciada o mejorada de reducir, eliminar o quitar una

mancha de interés en comparación con la capacidad de la enzima de proteasa de referencia de reducir o eliminar la misma mancha o una similar en determinadas circunstancias o condiciones, así como variantes de proteasas cuyo uso es menos deseable en determinadas circunstancias como, p. ej., aquellas variantes de proteasas que tienen una capacidad disminuida de reducir, eliminar o quitar una mancha de interés en comparación con la capacidad de una proteasa de referencia de eliminar la misma mancha o una similar.

[0342] La eficacia de limpieza de las variantes de proteasas (p. ej., variantes de subtilisinas) se determinó utilizando un ensayo con micromuestras (muestras CS-38, p. ej., manchadas con yema de huevo con pigmento, envejecidas por calentamiento). La estabilidad, la termoestabilidad y la determinación de proteínas del LAS/EDTA mediante precipitación con TCA para la(s) variante(s) también se determinó utilizando los métodos descritos anteriormente. Los resultados se muestran en la tabla 9-2.

Tabla 9-2 Valores del I _g de variantes de GCI-P036 en comparación con GCI-P038 sometidas a prueba para la eficacia de eliminación de manchas en micromuestras CS38, estabilidad, termoestabilidad y determinación de proteínas del LAS/EDTA («ND» indica «no determinado»)							
Variante	Variantes basadas en GCI-P036	CALGONIT ® 5 en 1 40 °C	CALGONIT ® 5 en 1 50 °C	CASCADE ® Complete 50 °C	Estabilidad de LAS/EDTA	TCA	Termoestabilidad
PX3	S87R/G118R/S128L/P129Q / S130A/N76D/S188D/N248 R	0,93	1,20	1,24	1,54	1,39	0,7
PX4	N76D/S87R/G118R/S128L/ P129Q/S130A	1,20	1,44	1,35	ND	ND	ND
PX5	N76D/S87R/G118R/S128L/ P129Q/S130A/S188D/V244 R	0,97	1,16	1,17	ND	ND	ND

- [0343]** Como se muestra en la tabla 9-2, las variantes de proteasas exhibieron una eficacia de limpieza potenciada o mejorada en comparación con la proteasa de referencia GG36 a 50 °C en varias composiciones detergentes. Concretamente, la variante PX3 exhibió una eficacia de limpieza (valores de IE) mayor que la proteasa GG36 en CALGONIT® 5 en 1 y CASCADE® Complete a 50 °C y casi la misma eficacia de limpieza que CALGONIT® 5 en 1 a 40 °C. La variante PX4 exhibió una eficacia de limpieza (valores de IE) considerablemente mayor que la proteasa GG36 en CALGONIT® 5 en 1 y CASCADE® Complete a 50 °C y en CALGONIT® 5 en 1 a 40 °C. Por tanto, se espera que se necesitaría una menor cantidad de proteasa PX4 para conseguir la misma eficacia de limpieza que la proteasa GG36. Además, cabe destacar que la variante PX4 demostró una eficacia de limpieza sustancialmente mejor que la proteasa GG36 incluso a una temperatura más baja. La variante de proteasa PX5 exhibió una eficacia de limpieza (valores de IE) mayor que la proteasa GG36 en CALGONIT® 5 en 1 y CASCADE® Complete a 50 °C y casi la misma eficacia de limpieza que CALGONIT® 5 en 1 a 40 °C.

EJEMPLO 10

Composiciones detergentes para la colada líquidas

- [0344]** Este ejemplo proporciona varias formulaciones para composiciones detergentes para la colada líquidas de la invención. En las tablas 10-1 y 10-2 que se encuentran a continuación, se proporcionan ejemplos de formulaciones detergentes para la colada líquidas a las que se puede añadir al menos una variante de proteasa de la invención. En dichas formulaciones, puede incluirse al menos una variante de proteasa de la invención en una concentración desde aproximadamente un 0,0001 hasta aproximadamente un 10 por ciento en peso de la formulación (composición) resultante. La formulación puede comprender una concentración alternativa de la(s) variante(s) de proteasa(s), según lo determine el formulador sobre la base de sus necesidades.

Tabla 10-1

Compuesto	Formulaciones				
	I	II	III	IV	V
LAS	24,0	32,0	6,0	3,0	6,0
NaC ₁₆ -C ₁₇ HSAS	-	-	-	5,0	-
C ₁₂ -C ₁₅ AE _{1,8} S	-	-	8,0	7,0	5,0
Propil dimetil amina C ₈ -C ₁₀	2,0	2,0	2,0	2,0	1,0
Óxido de alquil dimetil amina C ₁₂ -C ₁₄	-	-	-	-	2,0
C ₁₂ -C ₁₅ AS	-	-	17,0	-	8,0
CFAA	-	5,0	4,0	4,0	3,0
Alcohol graso etoxilado C ₁₂ -C ₁₄	12,0	6,0	1,0	1,0	1,0
Ácido graso C ₁₂ -C ₁₈	3,0	-	4,0	2,0	3,0
Ácido cítrico (anhidro)	4,5	5,0	3,0	2,0	1,0
DETPMP	-	-	1,0	1,0	0,5
Monoetanolamina	5,0	5,0	5,0	5,0	2,0
Hidróxido sódico	-	-	2,5	1,0	1,5
1 N de solución acuosa de HCl	#1	#1	-	-	-
Propanodiol	12,7	14,5	13,1	10.	8,0
Etanol	1,8	2,4	4,7	5,4	1,0
DTPA	0,5	0,4	0,3	0,4	0,5
Pectina liasa	-	-	-	0,005	-
Amilasa	0,001	0,002	-	-	-
Celulasa	-	-	0,0002	-	0,0001

Compuesto	Formulaciones				
Lipasa	0,1	-	0,1	-	0,1
NprE (opcional)	0,05	0,3	-	0,5	0,2
PMN	-	-	0,08	-	-
Proteasa A (opcional)	-	-	-	-	0,1
Aldosa oxidasa	-	-	0,3	-	0,003
ZnCl ₂	0,1	0,05	0,05	0,05	0,02
Formiato de Ca	0,05	0,07	0,05	0,06	0,07
DETBCHD	-	-	0,02	0,01	-
SRP1	0,5	0,5	-	0,3	0,3
Ácido bórico	-	-	-	-	2,4
Xilen sulfonato de sodio	-	-	3,0	-	-
Cumeno sulfato de sodio	-	-	-	0,3	0,5
DC 3225C	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
2-butil-octanol	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03
Abrillantador 1	0,12	0,10	0,18	0,08	0,10
Resto hasta 100 % perfume/tinte y/o agua					
#1: Añadir 1 N de solución acuosa de HCl para ajustar el pH puro de la fórmula en el rango desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 5.					

[0345] El pH de las formulaciones (I)-(II) es desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 7, y el pH de las formulaciones (III)-(V) es desde aproximadamente 7.5 hasta aproximadamente 8.5.

Tabla 10-2.

Compuesto	Formulaciones					
	I	II	III	IV	V	VI
LAS	11,5	11,5	9,0	-	4,0	-
C ₁₂ -C ₁₅ AE _{2,85} S	-	-	3,0	18,0	-	16,0
C ₁₄ -C ₁₅ E _{2,5} S	11,5	11,5	3,0	-	16,0	-
C ₁₂ -C ₁₃ E ₉	-	-	3,0	2,0	2,0	1,0
C ₁₂ -C ₁₃ E ₇	3,2	3,2	-	-	-	-
CFAA	-	-	-	5,0	-	3,0
TPKFA	2,0	2,0	-	2,0	0,5	2,0
Ácido cítrico (anhidro)	3,2	3,2	0,5	1,2	2,0	1,2
Formiato de Ca	0,1	0,1	0,06	0,1	-	-
Formiato de Na	0,5	0,5	0,06	0,1	0,05	0,05
ZnCl ₂	0,1	0,05	0,06	0,03	0,05	0,05
Cumeno sulfonato de sodio	4,0	4,0	1,0	3,0	1,2	-
Borato	0,6	0,6	1,5	-	-	-

Compuesto	Formulaciones					
Hidróxido de Na	6,0	6,0	2,0	3,5	4,0	3,0
Etanol	2,0	2,0	1,0	4,0	4,0	3,0
1,2 Propanediol	3,0	3,0	2,0	8,0	8,0	5,0
Monoetanolamina	3,0	3,0	1,5	1,0	2,5	1,0
TEPAE	2,0	2,0	-	1,0	1,0	1,0
nprE (opcional)	0,03	0,05	-	0,03	-	0,02
PMN	-	-	0,01	-	0,08	-
Proteasa A (opcional)	-	-	0,01	-	-	-
Lipasa	-	-	-	0,002	-	-
Amilasa	-	-	-	-	0,002	-
Celulasa	-	-	-	-	-	0,0001
Pectina liasa	0,005	0,005	-	-	-	-
Aldosa oxidasa	0,05	-	-	0,05	-	0,02
Galactosa oxidasa	-	0,04	-	-	-	-
PAAC	0,03	0,03	0,02	-	-	-
DETCHD	-	-	-	0,02	0,01	-
SRP 1	0,2	0,2	-	0,1	-	-
DTPA	-	-	-	0,3	-	-
PVNO	-	-	-	0,3	-	0,2
Abrillantador 1	0,2	0,2	0,07	0,1	-	-
Antiespumante de silicona	0,04	0,04	0,02	0,1	0,1	0,1
Resto hasta 100 % perfume/tinte y/o agua						

EJEMPLO 11**Composiciones detergentes para el lavado de la vajilla a mano líquidas**

- 5 **[0346]** Este ejemplo proporciona varias formulaciones para composiciones detergentes para el lavado de la vajilla a mano líquidas de la invención. A continuación, se proporcionan ejemplos de formulaciones detergentes para el lavado de la vajilla a mano líquidas a las que se puede añadir al menos una variante de proteasa de la invención. En dichas formulaciones, puede incluirse al menos una variante de proteasa de la invención en una concentración desde aproximadamente un 0,0001 hasta aproximadamente un 10 por ciento en peso de la formulación (composición) resultante. La formulación puede comprender una
- 10 concentración alternativa de la(s) variante(s) de proteasa(s), según lo determine el formulador sobre la base de sus necesidades.

Tabla 11-1.

Compuesto	Formulaciones					
	I	II	III	IV	V	VI
C ₁₂ -C ₁₅ AE _{1,8} S	30,0	28,0	25,0	-	15,0	10,0
LAS	-	-	-	5,0	15,0	12,0
Sulfonato de parafina	-	-	-	20,0	-	-

Compuesto	Formulaciones					
Óxido de alquil dimetil amina C ₁₀ -C ₁₈	5,0	3,0	7,0	-	-	-
Betaína	3,0	-	1,0	3,0	1,0	-
poli-OH ácido graso amida C ₁₂	-	-	-	3,0	-	1,0
poli-OH ácido graso amida C ₁₄	-	1,5	-	-	-	-
C ₁₁ E ₉	2,0	-	4,0	-	-	20,0
DTPA	-	-	-	-	0,2	-
Citrato de trisodio dihidratado	0,25	-	-	0,7	-	-
Diamina	1,0	5,0	7,0	1,0	5,0	7,0
MgCl ₂	0,25	-	-	1,0	-	-
nprE (opcional)	0,02	0,01	-	0,01	-	0,05
PMN	-	-	0,03	-	0,02	-
Proteasa A (opcional)	-	0,01	-	-	-	-
Amilasa	0,001	-	-	0,002	-	0,001
Aldosa oxidasa	0,03	-	0,02	-	0,05	-
Cumenosulfato de sodio	-	-	-	2,0	1,5	3,0
PAAC	0,01	0,01	0,02	-	-	-
DETBCHD	-	-	-	0,01	0,02	0,01
Resto hasta 100 % perfume/tinte y/o agua						

El pH de las formulaciones (I)-(VI) es desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 11.

EJEMPLO 12

Composiciones detergentes para el lavado de la vajilla de forma automática líquidas

- 5 **[0347]** Este ejemplo proporciona varias formulaciones para composiciones detergentes para el lavado de la vajilla de forma automática líquidas de la invención. A continuación, se proporcionan ejemplos de formulaciones detergentes para el lavado de la vajilla de forma automática líquidas a las que se puede añadir al menos una variante de proteasa de la invención. En dichas formulaciones, puede incluirse al menos una variante de proteasa de la invención en una concentración desde aproximadamente un 0,0001 hasta aproximadamente un 10 por ciento en peso de la formulación (composición) resultante. La
- 10 formulación puede comprender una concentración alternativa de la(s) variante(s) de proteasa(s), según lo determine el formulador sobre la base de sus necesidades.

Tabla 12-1.

Compuesto	Formulaciones				
	I	II	III	IV	V
STPP	16	16	18	16	16
Sulfato de potasio	-	10	8	-	10
1,2 propanediol	6,0	0,5	2,0	6,0	0,5
Ácido bórico		-	-	4,0	3,0
CaCl ₂ dihidratado	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
No iónico	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Compuesto	Formulaciones				
nprE (opcional)	0,1	0,03	-	0,03	-
PMN	-	-	0,05	-	0,06
Proteasa B (opcional)	-	-	-	0,01	-
Amilasa	0,02	-	0,02	0,02	-
Aldosa oxidasa	-	0,15	0,02	-	0,01
Galactosa oxidasa	-	-	0,01	-	0,01
PAAC	0,01	-	-	0,01	-
DETBCHD	-	0,01	-	-	0,01
Resto hasta 100 % perfume/tinte y/o agua					

EJEMPLO 13**Composiciones para la colada en pastillas y/o granuladas**

- 5 **[0348]** Este ejemplo proporciona varias formulaciones para composiciones detergentes para la colada en pastillas y/o granuladas de la invención. A continuación, se proporcionan ejemplos de composiciones para la colada a las que se puede añadir al menos una variante de proteasa de la invención. En dichas formulaciones, puede incluirse al menos una variante de proteasa de la invención en una concentración desde aproximadamente un 0,0001 hasta aproximadamente un 10 por ciento en peso de la formulación (composición) resultante. La formulación puede comprender una concentración alternativa de la(s)
- 10 variante(s) de proteasa(s), según lo determine el formulador sobre la base de sus necesidades.

Tabla 13-1.

Compuesto	Formulaciones				
	I	II	III	IV	V
C ₁₄ -C ₁₅ AS o TAS	8,0	5,0	3,0	3,0	3,0
LAS	8,0	-	8,0	-	7,0
C ₁₂ -C ₁₅ AE ₃ S	0,5	2,0	1,0	-	-
C ₁₂ -C ₁₅ E ₅ o E ₃	2,0	-	5,0	2,0	2,0
QAS	-	-	-	1,0	1,0
Zeolita A	20,0	18,0	11,0	-	10,0
SKS-6 (adición en seco)	-	-	9,0	-	-
MA/AA	2,0	2,0	2,0	-	-
AA	-	-	-	-	4,0
3Na Citrato 2H ₂ O	-	2,0	-	-	-
Ácido cítrico (anhidro)	2,0	-	1,5	2,0	-
DTPA	0,2	0,2	-	-	-
EDDS	-	-	0,5	0,1	-
HEDP	-	-	0,2	0,1	-
PB1	3,0	4,8	-	-	4,0
Percarbonato	-	-	3,8	5,2	-
NOBS	1,9	-	-	-	-

Compuesto	Formulaciones				
NACA OBS	-	-	2,0	-	-
TAED	0,5	2,0	2,0	5,0	1,00
BB1	0,06	-	0,34	-	0,14
BB2	-	0,14	-	0,20	-
Carbonato de Na anhidro	15,0	18,0	-	15,0	15,0
Sulfato	5,0	12,0	5,0	17,0	3,0
Silicato	-	1,0	-	-	8,0
nprE (opcional)	0,03	-	0,1	0,06	-
PMN	-	0,05	-	-	0,1
Proteasa B (opcional)	-	0,01	-	-	-
Proteasa C (opcional)	-	-	-	0,01	-
Lipasa	-	0,008	-	-	-
Amilasa	0,001	-	-	-	0,001
Celulasa	-	0,0014	-	-	-
Pectina liasa	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Aldosa oxidasa	0,03	-	0,05	-	-
PAAC	-	0,01	-	-	0,05
Resto hasta 100 % humedad y/o trazas*					
* Perfume, tinte, abrillantador / SRP1 / carboximetilcelulosa de Na / fotoblanqueante / MgSO ₄ / PVPVI / supresor de jabonadura / polietilenglicol (PEG) de alto peso molecular / arcilla.					

EJEMPLO 14**Composiciones detergentes para el lavado de la vajilla de forma automática de alta densidad**

- 5 **[0349]** Este ejemplo proporciona varias formulaciones para composiciones detergentes para el lavado de la vajilla de forma automática de alta densidad de la invención. A continuación, se proporcionan ejemplos de composiciones detergentes para el lavado de la vajilla de forma automática de alta densidad a las que se puede añadir al menos una variante de proteasa de la invención. En dichas formulaciones, puede incluirse al menos una variante de proteasa de la invención en una concentración desde aproximadamente un 0,0001 hasta aproximadamente un 10 por ciento en peso de la formulación (composición) resultante. La
- 10 la formulación puede comprender una concentración alternativa de la(s) variante(s) de proteasa(s), según lo determine el formulador sobre la base de sus necesidades.

Tabla 14-1.

Compuesto	Formulaciones					
	I	II	III	IV	V	VI
STPP	-	45,0	45,0	-	-	40,0
3Na Citrato 2H ₂ O	17,0	-	-	50,0	40,2	-
Carbonato de Na	17,5	14,0	20,0	-	8,0	33,6
Bicarbonato	-	-	-	26,0	-	-
Silicato	15,0	15,0	8,0	-	25,0	3,6
Metasilicato	2,5	4,5	4,5	-	-	-

Compuesto	Formulaciones					
PB1	-	-	4,5	-	-	-
PB4	-	-	-	5,0	-	-
Percarbonato	-	-	-	-	-	4,8
BB1	-	0,1	0,1	-	0,5	-
BB2	0,2	0,05	-	0,1	-	0,6
No iónico	2,0	1,5	1,5	3,0	1,9	5,9
HEDP	1,0	-	-	-	-	-
DETPMP	0,6	-	-	-	-	-
PAAC	0,03	0,05	0,02	-	-	-
Parafina	0,5	0,4	0,4	0,6	-	-
nprE (opcional)	0,072	0,053	-	0,026	-	0,01
PMN	-	-	0,053	-	0,059	-
Proteasa B (opcional)	-	-	-	-	-	0,01
Amilasa	0,012	-	0,012	-	0,021	0,006
Lipasa	-	0,001	-	0,005	-	-
Pectina liasa	0,001	0,001	0,001	-	-	-
Aldosa oxidasa	0,05	0,05	0,03	0,01	0,02	0,01
BTA	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3
Policarboxilato	6,0	-	-	-	4,0	0,9
Perfume	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
Resto hasta 100 % humedad y/o trazas*						
* Abrillantador / tinte / SRP1 / carboximetilcelulosa de Na / fotoblanqueante / MgSO ₄ / PVPVI / supresor de jabonadura / PEG de alto peso molecular / arcilla.						

[0350] El pH de las formulaciones (I)-(VI) es desde aproximadamente 9,6 hasta aproximadamente 11,3.

EJEMPLO 15

Composiciones detergentes en pastillas

- 5 **[0351]** Este ejemplo proporciona diversas formulaciones detergentes en pastillas. Los siguientes ejemplos de composiciones detergentes en pastillas de la presente invención a las que se puede añadir al menos una variante de proteasa de la invención se preparan mediante compresión de una composición detergente para el lavado de la vajilla granulada a una presión de 13 KN/cm² utilizando una prensa rotativa de 12 cabezales estándar. En dichas formulaciones, puede incluirse al menos una variante de proteasa de la invención en una concentración desde aproximadamente un 0,0001 hasta aproximadamente un 10 por ciento en peso de la formulación (composición) resultante. La formulación puede comprender una concentración alternativa de la(s) variante(s) de proteasa(s), según lo determine el formulador sobre la base de sus necesidades.
- 10

Tabla 15-1.

Compuesto	Formulaciones							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
STPP	-	48,8	44,7	38,2	-	42,4	46,1	46,0
3Na Citrato 2H ₂ O	20,0	-	-	-	35,9	-	-	-

Compuesto	Formulaciones							
	20,0	5,0	14,0	15,4	8,0	23,0	20,0	-
Carbonato de Na	20,0	5,0	14,0	15,4	8,0	23,0	20,0	-
Silicato	15,0	14,8	15,0	12,6	23,4	2,9	4,3	4,2
Lipasa	0,001	-	0,01	-	0,02	-	-	-
Proteasa B (opcional)	0,01	-	-	-	-	-	-	-
Proteasa C (opcional)	-	-	-	-	-	0,01	-	-
nprE (opcional)	0,01	0,08	-	0,04	-	0,023	-	0,05
PMN	-	-	0,05	-	0,052	-	0,023	-
Amilasa	0,012	0,012	0,012	-	0,015	-	0,017	0,002
Pectina liasa	0,005	-	-	0,002	-	-	-	-
Aldosa oxidasa	-	0,03	-	0,02	0,02	-	0,03	-
PB1	-	-	3,8	-	7,8	-	-	4,5
Percarbonato	6,0	-	-	6,0	-	5,0	-	-
BB1	0,2	-	0,5	-	0,3	0,2	-	-
BB2	-	0,2	-	0,5	-	-	0,1	0,2
No iónico	1,5	2,0	2,0	2,2	1,0	4,2	4,0	6,5
PAAC	0,01	0,01	0,02	-	-	-	-	-
DETBCHD	-	-	-	0,02	0,02	-	-	-
TAED	-	-	-	-	-	2,1	-	1,6
HEDP	1,0	-	-	0,9	-	0,4	0,2	-
DETPMP	0,7	-	-	-	-	-	-	-
Parafina	0,4	0,5	0,5	0,5	-	-	0,5	-
BTA	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	-
Policarboxilato	4,0	-	-	-	4,9	0,6	0,8	-
PEG 400-30 000	-	-	-	-	-	2,0	-	2,0
Glicerol	-	-	-	-	-	0,4	-	0,5
Perfume	-	-	-	0,05	0,2	0,2	0,2	0,2
Resto hasta 100 % humedad y/o trazas*								
* Abrillantador / SRP1 / carboximetilcelulosa de Na / fotoblanqueante / MgSO ₄ / PVPVI / supresor de jabonadura / PEG de alto peso molecular / arcilla.								

[0352] El pH de las formulaciones (I)-(VII) es desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 11,5; el pH de la formulación (VIII) es desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 10. El peso por pastilla de las formulaciones (I)-(VIII) es desde aproximadamente 20 gramos hasta aproximadamente 30 gramos.

5 EJEMPLO 16

Detergentes líquidos para la limpieza de superficies duras

[0353] Este ejemplo proporciona varias formulaciones para composiciones detergentes líquidas para la limpieza de superficies duras de la invención. A continuación, se proporcionan ejemplos de composiciones detergentes líquidas para la limpieza de superficies duras a las que se puede añadir al menos una variante de proteasa de la invención. En dichas formulaciones, puede incluirse al menos una variante de proteasa de la invención en una concentración desde aproximadamente un 0,0001 hasta aproximadamente un 10 por

ciento en peso de la formulación (composición) resultante. La formulación puede comprender una concentración alternativa de la(s) variante(s) de proteasa(s), según lo determine el formulador sobre la base de sus necesidades.

Tabla 16-1

Compuesto	Formulaciones						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
C ₉ -C ₁₁ E ₅	2,4	1,9	2,5	2,5	2,5	2,4	2,5
C ₁₂ -C ₁₄ E ₅	3,6	2,9	2,5	2,5	2,5	3,6	2,5
C ₇ -C ₉ E ₆	-	-	-	-	8,0	-	-
C ₁₂ -C ₁₄ E ₂₁	1,0	0,8	4,0	2,0	2,0	1,0	2,0
LAS	-	-	-	0,8	0,8	-	0,8
Cumeno sulfonato de sodio	1,5	2,6	-	1,5	1,5	1,5	1,5
Isachem ® AS	0,6	0,6	-	-	-	0,6	-
Na ₂ CO ₃	0,6	0,13	0,6	0,1	0,2	0,6	0,2
3Na Citrato 2H ₂ O	0,5	0,56	0,5	0,6	0,75	0,5	0,75
NaOH	0,3	0,33	0,3	0,3	0,5	0,3	0,5
Ácido graso	0,6	0,13	0,6	0,1	0,4	0,6	0,4
2-butil octanol	0,3	0,3	-	0,3	0,3	0,3	0,3
PEG DME-2000®	0,4	-	0,3	0,35	0,5	-	-
PVP	0,3	0,4	0,6	0,3	0,5	-	-
MME PEG (2000) ®	-	-	-	-	-	0,5	0,5
Jeffamine ® ED-2001	-	0,4	-	-	0,5	-	-
PAAC	-	-	-	0,03	0,03	0,03	-
DETBCHD	0,03	0,05	0,05	-	-	-	-
nprE (opcional)	0,07	-	0,08	0,03	-	0,01	0,04
PMN	-	0,05	-	-	0,06	-	-
Proteasa B (opcional)	-	-	-	-	-	0,01	-
Amilasa	0,12	0,01	0,01	-	0,02	-	0,01
Lipasa	-	0,001	-	0,005	-	0,005	-
Pectina liasa	0,001	-	0,001		-	-	0,002
ZnCl ₂	0,02	0,01	0,03	0,05	0,1	0,05	0,02
Formiato cálcico	0,03	0,03	0,01	-	-	-	-
PB1	-	4,6	-	3,8	-	-	-
Aldosa oxidasa	0,05	-	0,03	-	0,02	0,02	0,05
Resto hasta 100 % perfume/tinte y/o agua							

5

[0354] El pH de las formulaciones (I)-(VII) es desde aproximadamente 7,4 hasta aproximadamente 9,5.

REIVINDICACIONES

1. Una variante de proteasa aislada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, comprendiendo dicha secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa una sustitución de cada uno de los residuos de aminoácido en las posiciones 76, 87, 118, 128, 129, 130, 188 y 244 de SEQ ID NO:1 por un residuo de aminoácido diferente para producir una variante de proteasa que tiene una carga global de -2, -1, 0, +1, +2, +3 o +4, donde:
 - (i) el residuo de aminoácido en cada una de las posiciones 76 y 188 se sustituye por un residuo de aminoácido de carga negativa seleccionado del grupo que consta de ácido aspártico y ácido glutámico;
 - (ii) el residuo de aminoácido en cada una de las posiciones 87, 118 y 244 se sustituye por un residuo de aminoácido de carga positiva seleccionado del grupo que consta de arginina, histidina y lisina; y
 - (iii) el residuo de aminoácido en cada una de las posiciones 128, 129 y 130 se sustituye por un residuo de aminoácido neutro seleccionado del grupo que consta de serina, treonina, asparagina, glutamina, alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, tirosina y valina, y donde cada posición de aminoácido se numera según la numeración de la posición de aminoácido correspondiente en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en SEQ ID NO:2, según lo determinado por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.
2. La variante de proteasa de la reivindicación 1, donde la secuencia de aminoácidos de dicha variante de proteasa comprende las sustituciones de aminoácidos N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+V244R, opcionalmente donde dicha variante de proteasa comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:8.
3. Una variante de proteasa aislada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, comprendiendo dicha secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa una sustitución del residuo de aminoácido en cada una de las posiciones de aminoácido 76, 87, 118, 128, 129 y 130 en relación con SEQ ID NO:1 por un residuo de aminoácido diferente para producir una variante de proteasa que tiene una carga global de -2, -1, 0, +1, +2, +3 o +4, donde:
 - (i) el residuo de aminoácido en la posición 76 se sustituye por un residuo de aminoácido de carga negativa seleccionado del grupo que consta de ácido aspártico y ácido glutámico,
 - (ii) el residuo de aminoácido en cada una de las posiciones 87 y 118 se sustituye por un residuo de aminoácido de carga positiva seleccionado del grupo que consta de arginina, histidina y lisina, y
 - (iii) el residuo de aminoácido en cada una de las posiciones 128, 129 y 130 se sustituye por un residuo de aminoácido sin carga seleccionado del grupo que consta de serina, treonina, asparagina, glutamina, alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, tirosina y valina, y donde dicha variante de proteasa comprende también
 - (iv) un residuo de serina en la posición de aminoácido 188 o una sustitución del residuo de serina en la posición 188 por un residuo de aminoácido diferente que es o no es un residuo de ácido aspártico, y/o
 - (v) un residuo de asparagina en la posición de aminoácido 248 o una sustitución del residuo de asparagina en la posición 248 por un residuo de aminoácido diferente que es o no es un residuo de arginina,
 y donde las posiciones de aminoácido se numeran según la numeración de las posiciones de aminoácido correspondientes en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en SEQ ID NO:2, según lo determinado por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.
4. La variante de proteasa de la reivindicación 3, donde dicha secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa comprende un residuo de serina en la posición de aminoácido 188 y/o un residuo de arginina en la posición de aminoácido 248.
5. La variante de proteasa de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, donde dicha variante de proteasa tiene una carga global de +1.
6. La variante de proteasa de la reivindicación 3, donde la secuencia de aminoácidos de dicha variante de proteasa comprende las sustituciones de aminoácidos N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A, opcionalmente donde dicha variante de proteasa comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:7.

7. Una variante de proteasa aislada según la reivindicación 1 o la reivindicación 3, comprendiendo dicha variante de proteasa uno de los siguientes conjuntos de sustituciones de aminoácidos en relación con SEQ ID NO:1:
- 5 (i) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A, con la condición de que dicha variante de proteasa no comprenda N248R+S188D, o
(ii) N76D+S87R+G118R+S128L+P129Q+S130A+S188D+V244R.
8. Una composición que comprende al menos una variante de proteasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, opcionalmente donde dicha composición es una composición de limpieza y/o detergente.
- 10 9. La composición de la reivindicación 8, donde:
- (i) la composición de limpieza es una composición de limpieza para la colada o una composición detergente para la colada, respectivamente;
- (ii) la composición de limpieza es una composición detergente para el lavado de la vajilla, opcionalmente una composición detergente para el lavado de la vajilla de forma automática o una
- 15 composición detergente para el lavado de la vajilla a mano;
- (iii) la composición de limpieza es una composición detergente líquida;
- (iv) la composición de limpieza es una composición detergente en forma de gel, pastilla, polvo, sólida o granulada;
- (v) la composición de limpieza no contiene fosfato;
- 20 (vi) la composición es una composición de limpieza para la colada líquida o una composición de limpieza para la colada en polvo;
- (vii) la composición es una composición de limpieza potenciadora para la colada, una composición de limpieza aditiva para la colada, o una composición de limpieza de pretratamiento para la colada;
- (viii) la composición es una composición de limpieza de lentes de contacto; o
- 25 (ix) la composición no es una composición para el lavado de la vajilla de forma automática.
10. La composición de la reivindicación 8 o la reivindicación 9, comprendiendo al menos una enzima adicional, opcionalmente donde la al menos una enzima opcional, opcionalmente dos o más enzimas adicionales, se selecciona(n) del grupo que consta de hemicelulasa, celulasa, amilasa, peroxidasa, proteasa, xilanasas, lipasa, fosfolipasa, esterasa, cutinasa, pectinasa, pectato liasa, mananasa,
- 30 queratinasa, reductasa, oxidasa, fenoloxidasa, lipoxigenasa, ligninasa, pululanasa, tanasa, pentosanasa, malanasa, β -glucanasa, arabinosidasa, hialuronidasa, condroitinasa y lacasa.
11. Un método para limpiar un artículo o una superficie que necesite limpiarse, comprendiendo el método poner en contacto el artículo o la superficie con una variante de proteasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o una composición de cualquiera de las reivindicaciones 8-10, opcionalmente donde
- 35 el método comprende también enjuagar el artículo o la superficie con agua.
12. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la variante de proteasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
13. Un vector de expresión que comprende al menos un ácido nucleico de la reivindicación 12, opcionalmente
- 40 donde el al menos un ácido nucleico se encuentra ligado de forma operativa a un promotor.
14. Una célula huésped recombinante que comprende el vector de expresión de la reivindicación 13 o el ácido nucleico de la reivindicación 12 o la variante de proteasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, opcionalmente donde:
- (i) la célula huésped es una célula bacteriana;
- 45 (ii) la célula huésped es una célula de *Bacillus*; o
- (iii) la célula huésped es una célula de *Bacillus subtilis*.
15. Un método para producir una variante de proteasa, comprendiendo el método el cultivo de la célula huésped recombinante de la reivindicación 14 en condiciones propicias para la producción de la variante de proteasa, comprendiendo el método opcionalmente también la recuperación de la variante de
- 50 proteasa del cultivo.

GG36	1	AQSPVPWGIS	VQAPAAHNRG	LTGSGVKVAV	LDTGIS-THP	DLNIRGGASF	VPGEPS-T-QD
BPN	1	AQSPVPYGVSQ	IKAPALHSQG	YTGSNVKVAV	IDSGIDSSH	DLKVAGGASM	VPSETNPFQD
PX3	1	AQSPVPWGIS	VQAPAAHNRG	LTGSGVKVAV	LDTGIS-THP	DLNIRGGASF	VPGEPS-T-QD
PX4	1	AQSPVPWGIS	VQAPAAHNRG	LTGSGVKVAV	LDTGIS-THP	DLNIRGGASF	VPGEPS-T-QD
PX5	1	AQSPVPWGIS	VQAPAAHNRG	LTGSGVKVAV	LDTGIS-THP	DLNIRGGASF	VPGEPS-T-QD
Conservación	1	*****	*****	*****	*****	*****	*****
GG36	59	GNHGHTHVAG	TIAALNNSIG	VLGVAPSAEL	YAVKVLGASG	SGSVSSIAQG	LEWAGNNGMH
BPN	61	NNSHGHTHVAG	TVAALNNSIG	VLGVAPSASL	YAVKVLGADG	SGQYSWIING	IEWAIAANMMD
PX3	59	GNHGHTHVAG	TIAALNNSIG	VLGVAPRAEL	YAVKVLGASG	SGSVSSIAQG	LEWAGNNGMH
PX4	59	GNHGHTHVAG	TIAALNNSIG	VLGVAPRAEL	YAVKVLGASG	SGSVSSIAQG	LEWAGNNGMH
PX5	59	GNHGHTHVAG	TIAALNNSIG	VLGVAPRAEL	YAVKVLGASG	SGSVSSIAQG	LEWAGNNGMH
Conservación	61	*****	*****	*****	*****	*****	*****
GG36	119	VANLSLGSPTS	PSATLEQAVN	SATSRGVLV	AASGNSGAGS	----ISYPAR	YANAMAVGAT
BPN	121	VINMSLGGPS	GSAALKAADV	KAVASGVVW	AAAGNEGTSG	SSSTVGYPGK	YPSVIAVGAV
PX3	119	VANLSLGLQA	PSATLEQAVN	SATSRGVLV	AASGNSGAGS	----ISYPAR	YANAMAVGAT
PX4	119	VANLSLGLQA	PSATLEQAVN	SATSRGVLV	AASGNSGAGS	----ISYPAR	YANAMAVGAT
PX5	119	VANLSLGLQA	PSATLEQAVN	SATSRGVLV	AASGNSGAGS	----ISYPAR	YANAMAVGAT
Conservación	121	*****	*****	*****	*****	*****	*****
GG36	175	DQNNRASFS	QYGAGLDIVA	PGVNVQSTYP	GSTYASLNGT	SMATPHVAGA	AALVKQKNPS
BPN	181	DSNNRASFS	SVGPELDUMA	PGVSIQSTLP	GKNKYGAYNGT	SMASPHVAGA	AALTLKSHPN
PX3	175	DQNNNRADFS	QYGAGLDIVA	PGVNVQSTYP	GSTYASLNGT	SMATPHVAGA	AALVKQKNPS
PX4	175	DQNNNRASFS	QYGAGLDIVA	PGVNVQSTYP	GSTYASLNGT	SMATPHVAGA	AALVKQKNPS
PX5	175	DQNNNRADFS	QYGAGLDIVA	PGVNVQSTYP	GSTYASLNGT	SMATPHVAGA	AALVKQKNPS
Conservación	181	*****	*****	*****	*****	*****	*****
GG36	235	WSNVQIRNHL	KNTATSLGST	NLYGSGGLVNA	EAATR		
BPN	241	WTNTQVRSSL	ENTTTKLGDS	FYYGKGLINV	QAAAQ		
PX3	235	WSNVQIRRH	KNTATSLGST	NLYGSGGLVNA	EAATR		
PX4	235	WSNVQIRNHL	KNTATSLGST	NLYGSGGLVNA	EAATR		
PX5	235	WSNRQIRNHL	KNTATSLGST	NLYGSGGLVNA	EAATR		
Conservación	241	*****	*****	*****	*****		

FIG. 2

