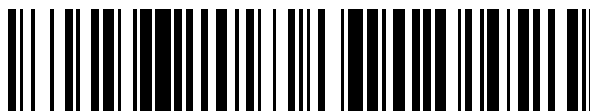


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 631**

51 Int. Cl.:

C11D 3/386 (2006.01)

C12N 9/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2013 PCT/EP2013/052971**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013 WO13120952**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2013 E 13704602 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2814933**

54 Título: **Composiciones detergentes que comprenden variantes de subtilasa**

30 Prioridad:

17.02.2012 EP 12155909

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

04.10.2017

73 Titular/es:

HENKEL AG & CO. KGAA (100.0%)

Henkelstrasse 67

40589 Düsseldorf, DE

72 Inventor/es:

BESENMATTER, WERNER;

BENIE, ASTRID y

MALTEN, MARCO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 635 631 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 detergentes que comprenden variantes de subtilasa

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención se relaciona con composiciones detergentes que contienen proteasa, especialmente composiciones detergentes que comprenden variantes de subtilisina que presentan alteraciones relativas a la subtilisina original en una o más propiedades incluyendo: rendimiento de lavado, estabilidad térmica, estabilidad de almacenamiento o actividad catalítica. Además, la presente invención se relaciona con métodos para producir dichas composiciones detergentes y al uso de dichas composiciones detergentes en aplicaciones de limpieza.

15 Descripción de la técnica relacionada

En la industria de detergentes, las enzimas se han aplicado durante más de 30 años en formulaciones de lavado. Las enzimas utilizadas en tales formulaciones comprenden proteasas, lipasas, amilasas, celulasas, manosidasas así como otras enzimas o mezclas de las mismas. Comercialmente las enzimas más importantes son proteasas.

20 Un creciente número de proteasas usadas comercialmente son variantes de proteasas de origen natural de tipo salvaje obtenidas por ingeniería genética de proteínas, por ejemplo, Everlase®, Relase®, Coronase®, Ovozyme®, Polarzyme®, Liquanase®, Liquanase Ultra® y Kannase® (Novozimas a/s), Maxacal®, Properase®, Purafast®, Purafect OXP®, FN3®, FN4® y Excellase® (Du Pont/Genencor International, Inc.) y BLAP (Figura 29, US5352604) (Henkel AG & Co. KGaA).

25 Además, se describen una serie de variantes en la técnica, tal como en el documento WO 04/041979 (NOVOZYMES A/S) y el documento WO 2009/149200 (Danisco Inc) que describe variantes de subtilisina que presentan alteraciones con respecto a la subtilisina original en, por ejemplo, rendimiento de lavado, estabilidad térmica, estabilidad en almacenamiento o actividad catalítica. Las variantes son adecuadas para su uso en por ejemplo, composiciones de limpieza o detergentes.

35 Se han descrito varias variantes útiles de subtilisina, muchas de las cuales han proporcionado una actividad, estabilidad y solubilidad mejoradas en diferentes detergentes. El documento WO9402618 describe variantes de subtilisina con estabilidad de almacenamiento mejorada. Las sustituciones L211X y N212Z en las que X es cualquier aminoácido excepto L y Z es cualquier aminoácido excepto N se mencionan junto con otras varias mutaciones. Sin embargo, no se muestra rendimiento de lavado para estas variantes y no se menciona nada en relación con manchas específicas tales como manchas de huevo. Es bien conocido en la técnica que las manchas de huevo son particularmente difíciles de eliminar completamente y aunque se han descrito varias variantes de proteasa con un rendimiento mejorado en manchas de huevo, por ejemplo, en el documento WO0144452, todavía existe la necesidad de composiciones detergentes con proteasas que tengan un alto rendimiento de lavado en diversas manchas incluyendo manchas de huevo.

40 Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar composiciones detergentes con variantes de una proteasa con propiedades mejoradas en comparación con su proteasa original.

Resumen de la invención

45 La presente invención se relaciona con una composición detergente que comprende una variante de subtilisina que tiene actividad de proteasa, variante que comprende las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z del polipéptido maduro codificado por la SEQ ID NO: 2, en la cual X y Z se seleccionan del grupo que consiste en R o K. De este modo, un aspecto de la invención se relaciona con una composición detergente que comprende una variante de subtilisina que tiene actividad de proteasa, que comprende las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z del polipéptido maduro codificado por la SEQ ID NO: 2, en la que X y Z se seleccionan del grupo que consiste en R o K en el que cuando X es K o R, entonces Z se selecciona también entre K o R. La presente invención se relaciona también con una composición detergente que comprende una variante de subtilisina que tiene actividad proteasa que comprende las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z del polipéptido maduro codificado por la SEQ ID NO: 2, en la que X y Z se seleccionan del grupo que consiste en R o K, y, en la que cuando X es K o R, entonces Z se selecciona también entre K o R y en la que la variante tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 y/o 4.

50 La presente invención también se relaciona con un método para producir una composición detergente que comprende la etapa de agregar una variante de subtilisina que tiene actividad de proteasa que se obtuvo por un método que comprende introducir en una subtilisina original las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2, en la que X y Z se seleccionan del grupo que consiste en R o K, en la que cuando X es K o R, entonces Z se selecciona también entre K o R. Preferiblemente, las variantes tienen al menos un

90% de identidad de secuencia con respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 y/o 4. La invención también se relaciona con composiciones detergentes obtenidas mediante dicho método.

5 La invención se relaciona además con el uso de composiciones detergentes de acuerdo con la invención en procesos de limpieza tales como lavado de ropa y/o lavado de platos.

Definiciones

10 Proteasa: El término "proteasa" se define aquí como una enzima que hidroliza enlaces peptídicos. Incluye cualquier enzima perteneciente al grupo de la enzima EC 3.4 (incluyendo cada una de las trece subclases de la misma). El número EC se refiere a Enzyme Nomenclature 1992 de NC-IUBMB, Academic Press, San Diego, California, incluyendo los suplementos 1-5 publicados en Eur. J. Biochem. 1994, 223, 1-5; Eur. J. Biochem. 1995, 232, 1-6; Eur. J. Biochem. 1996, 237, 1-5; Eur. J. Biochem. 1997, 250, 1-6; y Eur. J. Biochem. 1999, 264, 610-650; respectivamente.

15 Actividad de la proteasa: El término "actividad de la proteasa" significa una actividad proteolítica (EC 3.4). Las proteasas de la invención son endopeptidasas (EC 3.4.21). Existen varios tipos de actividad de la proteasa: Los tres tipos principales de actividad son: tipo tripsina, donde hay escisión de sustratos de amida después de Arg o Lys en P1, tipo quimotripsina donde la escisión se produce después de uno de los aminoácidos hidrófobos en P1, y tipo elastasa con escisión después de un Ala en P1. Para los propósitos de la presente invención, la actividad de la proteasa se determina de acuerdo con el procedimiento descrito en "Materiales y Métodos" a continuación. Las variantes de subtilisina de la presente invención tienen al menos un 20%, por ejemplo, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95% y al menos el 100% de la actividad de la proteasa del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 o 4.

20 Variante alélica: El término "variante alélica" significa cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de la mutación, y puede resultar en polimorfismo dentro de las poblaciones. Las mutaciones genéticas pueden ser silenciosas (no hay cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

25 ADNc: El término "ADNc" significa una molécula de ADN que puede prepararse mediante transcripción inversa a partir de una molécula madura, empalmada, de ARNm obtenida de una célula procariota o eucariota. El ADNc carece de secuencias intrónicas que pueden estar presentes en el ADN genómico correspondiente. El transcripto de ARN primario, inicial, es un precursor del ARNm que se procesa a través de una serie de etapas, incluyendo el empalme, antes de aparecer como ARNm empalmado maduro.

30 Secuencia de codificación: El término "secuencia de codificación" significa un polinucleótido, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto polipeptídico. Los límites de la secuencia de codificación se determinan generalmente mediante un marco de lectura abierto, que usualmente comienza con el codón de inicio ATG o codones de inicio alternativos tales como GTG y TTG y termina con un codón de parada tal como TAA, TAG y TGA. La secuencia de codificación puede ser un ADN, ADNc, polinucleótido sintético o recombinante.

35 Secuencias de control: El término "secuencias de control" significa todos los componentes necesarios para la expresión de un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o extraña al polinucleótido que codifica la variante o nativa o extraña entre sí. Dichas secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, un líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia propeptídica, un promotor, una secuencia de señal peptídica y un terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de parada transcripcional y de traducción. Las secuencias de control pueden proporcionarse con enlazadores con el propósito de introducir sitios de restricción específicos que facilitan la ligación de las secuencias de control con la región codificante del polinucleótido que codifica una variante.

40 Expresión: El término "expresión" incluye cualquier etapa implicada en la producción de la variante incluyendo, pero no limitada a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

45 Vector de expresión: El término "vector de expresión" significa una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica una variante y está operativamente ligada a nucleótidos adicionales que proporcionan para su expresión.

50 Condiciones de alta rigurosidad: El término "condiciones de alta rigurosidad" significa para sondas de por lo menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cizallado y desnaturalizado y formamida al 50%, siguiendo procedimientos estándar del método Southern blot por 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces cada una por 15 minutos usando 2X SSC, SDS al 0,2% a 65°C.

65

Célula huésped: El término "célula huésped" significa cualquier tipo de célula que es susceptible a la transformación, transfección, transducción y similares con una construcción de ácido nucleico o vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención. El término "célula huésped" abarca cualquier progenie de una célula original que no es idéntica a la célula original debido a mutaciones que se producen durante la replicación.

5 Propiedad mejorada: El término "propiedad mejorada" significa una característica asociada con una variante que se mejora comparada con la original o comparada con una proteasa con la SEQ ID NO: 2, o comparada con una proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero que no tiene las alteraciones en una o más de dichas posiciones especificadas. Tales propiedades mejoradas incluyen, pero no se limitan a, rendimiento de lavado, actividad de proteasa, perfil de actividad térmica, termoestabilidad, perfil de actividad de pH, estabilidad de pH, especificidad de sustrato/cofactor, propiedades de superficie mejoradas, especificidad del sustrato, especificidad del producto, estabilidad aumentada, por ejemplo, estabilidad o solubilidad del quelante en presencia de biomasa pretratada, estabilidad mejorada en condiciones de almacenamiento y estabilidad química.

15 Estabilidad química mejorada: El término "estabilidad química mejorada" se define aquí como una enzima variante que muestra retención de actividad enzimática después de un período de incubación en presencia de un químico o químicos, ya sea de origen natural o sintético, lo que reduce la actividad enzimática de la enzima original. La estabilidad química mejorada también puede dar como resultado variantes capaces de catalizar de mejor forma, una reacción en presencia de tales químicos. En un aspecto particular de la invención, la estabilidad química mejorada es una estabilidad mejorada en un detergente, en particular en un detergente líquido. La estabilidad de detergente mejorada es en particular una estabilidad mejorada de la actividad de alfa amilasa cuando una variante de alfa amilasa de la presente invención se mezcla en una formulación detergente líquida que comprende un agente quelante, el líquido también incluye geles o una pasta. La formulación detergente líquida puede referirse a detergente concentrado que se añade durante un proceso de lavado de ropa o lavado automático de platos o un detergente diluido tal como una solución de lavado, es decir, una solución acuosa a la que se añade el detergente concentrado. En la presente invención, detergentes líquidos son particularmente útiles como detergentes líquidos para ropa.

30 Estabilidad: El término "estabilidad" incluye estabilidad al almacenamiento y estabilidad durante el uso, por ejemplo, durante un proceso de lavado y refleja la estabilidad de la proteasa como una función del tiempo, por ejemplo, la cantidad de actividad retenida cuando la proteasa se mantiene en solución en particular en una solución detergente. La estabilidad está influenciada por muchos factores, por ejemplo, pH, temperatura, composición detergente, por ejemplo, cantidad de aditivo, tensioactivos, etc.

35 Rendimiento de lavado mejorado: El término "rendimiento de lavado mejorado" se define aquí como una variante de proteasa o una composición detergente que comprende dicha variante de proteasa que muestra una alteración del rendimiento de lavado con relación al rendimiento de lavado de la subtilisina original o la correspondiente composición detergente, con relación a la proteasa con la SEQ ID NO: 2 o la composición detergente correspondiente, o con relación a una proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero que no tiene las alteraciones en una o más de dichas posiciones especificadas o la composición detergente correspondiente, por ejemplo, por aumento de la eliminación de manchas que es particularmente preferido. El término "rendimiento de lavado" incluye el rendimiento de lavado en lavado de ropa, pero también por ejemplo, en lavado de platos. El rendimiento de lavado se puede cuantificar como se describe aquí bajo la definición de "rendimiento de lavado".

45 Actividad de proteasa mejorada: El término "actividad de proteasa mejorada" se define aquí como una actividad de proteasa alterada (como se ha definido anteriormente) de una variante de proteasa que muestra una alteración de la actividad relativa (o comparada) con la actividad de la subtilisina original o comparada con una proteasa con la SEQ ID NO: 2, o con relación a una proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero que no tiene las alteraciones en una o más de dichas posiciones especificadas, por aumento de la conversión de proteínas.

50 Condiciones de baja rigurosidad: El término "condiciones de baja rigurosidad" significa para sondas de por lo menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cizallado y desnaturalizado y formamida al 25 %, siguiendo procedimientos estándar del método Southern blot por 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces cada una por 15 minutos usando 2X SSC, SDS al 0,2% a 50°C.

60 Polipéptido maduro: El término "polipéptido maduro" significa un polipéptido en su forma final después de la traducción y cualquier modificación postraduccional, tal como procesamiento N-terminal, truncamiento C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro corresponde a la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4.

65 Secuencia de codificación de polipéptido maduro: El término "secuencia de codificación de polipéptido maduro" significa un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro que tiene actividad de proteasa. En un aspecto, la secuencia de codificación del polipéptido maduro son los nucleótidos 322 a 1146 de la SEQ ID NO: 1 con base en la

SeñalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: (1-6)) que predice que los nucleótidos 1 a 91 de la SEQ ID NO: 1 codifican un péptido señal.

5 En un aspecto, la secuencia de codificación del polipéptido maduro son los nucleótidos 577 a 1140 de la SEQ ID NO: 3 con base en la SeñalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: (1-6)) que predice que los nucleótidos 1 a 81 de la SEQ ID NO: 3 codifican un péptido señal.

10 Condiciones de rigurosidad media: El término "condiciones de rigurosidad media" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cizallado y desnaturalizado y formamida al 35 %, siguiendo procedimientos estándar del método Southern blot por 12 a 24 horas. El material portador finalmente se lava tres veces cada una por 15 minutos usando 2X SSC, SDS al 0,2% a 55°C.

15 Condiciones de rigurosidad medio-alta: El término "condiciones de rigurosidad medio-alta" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cizallado y desnaturalizado y formamida al 35%, siguiendo procedimientos estándar del método Southern blot por 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces cada una por 15 minutos usando 2X SSC, SDS al 0,2% a 60°C.

20 Mutante: El término "mutante" significa un polinucleótido que codifica una variante.

25 Estructura de ácido nucleico: El término "estructura de ácido nucleico" significa una molécula de ácido nucleico, de cadena sencilla o doble, aislada de un gen de origen natural o modificada para contener segmentos de ácidos nucleicos de una manera que de otro modo no existiría en la naturaleza o que es sintética. El término estructura de ácido nucleico es sinónimo del término "casete de expresión" cuando la estructura de ácido nucleico contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia de codificación de la presente invención.

30 Ligado de manera operativa: El término "ligado de manera operativa" significa una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada con respecto a la secuencia de codificación de un polinucleótido de tal manera que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia de codificación.

35 Original: El término "original" significa una proteasa a la que se le hace una alteración para producir las variantes enzimáticas de la presente invención. Por tanto, la original es una proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero que no tiene las alteraciones en uno o más, por ejemplo, dos o más de dichas posiciones especificadas. Se entenderá que en el presente contexto la expresión "que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica" se relaciona con 100% de identidad de secuencia. El original puede ser un polipéptido de origen natural (tipo salvaje) o una variante del mismo. En una realización particular, la original es una proteasa con al menos un 60% de identidad, tal como al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 81%, al menos 82%, al menos 83%, al menos 84%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% de identidad con un polipéptido con la SEQ ID NO: 2 o 4.

45 Identidad de Secuencia: La conexidad entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe por el parámetro "identidad de secuencia". Para los propósitos de la presente invención, se determina el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos usando el algoritmo Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente versión 3.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales utilizados son penalización por apertura de brecha de 10, penalización por extensión de intervalo de 0,5 y matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62). La salida de Needle etiquetada como "identidad más larga" (obtenida usando la opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula de la siguiente manera:

$$\frac{\text{(Residuos idénticos} \times 100)}{\text{(Longitud de alineación - Número total de intervalos en alineación)}}$$

55 La longitud de la alineación es preferiblemente al menos 150 residuos de aminoácidos, al menos 175 residuos de aminoácidos, al menos 200 residuos de aminoácidos, al menos 220 residuos de aminoácidos, al menos 240 residuos de aminoácidos o al menos 260 residuos de aminoácidos.

60 Para los propósitos de la presente invención, se determina el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de desoxirribonucleótidos utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, supra) tal como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, supra), preferiblemente versión 3.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales utilizados son penalización por apertura de brecha de 10, penalización por extensión de intervalo de 0,5 y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión EMBOSS de NCBI NUC4.4). La salida de Needle etiquetada como "identidad más larga" (obtenida usando la opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula de la siguiente manera:

(desoxirribonucleótidos idénticos x 100)/(longitud de alineación – número total de intervalos en alineación)

La longitud de la alineación es preferiblemente al menos 450 nucleótidos, al menos 525 nucleótidos, al menos 600 nucleótidos, al menos 660 nucleótidos, al menos 720 nucleótidos o al menos 840 nucleótidos.

Variante sustancialmente pura: El término "variante sustancialmente pura" significa una preparación que contiene como máximo 10%, como máximo 8%, como máximo 6%, como máximo 5%, como máximo 4%, como máximo 3%, como máximo 2%, como máximo 1% y como máximo 0,5% en peso de otro material polipéptido con el que está asociado de manera nativa o recombinante. Preferiblemente, la variante tiene al menos un 92% de pureza, por ejemplo, al menos 94% de pureza, al menos 95% de pureza, al menos 96% de pureza, al menos 97% de pureza, al menos 98% de pureza, al menos 99%, al menos 99,5% de pureza y 100% de pureza en peso del material polipéptido total presente en la preparación. Las variantes de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura. Esto se puede lograr, por ejemplo, preparando la variante por métodos recombinantes bien conocidos o por métodos clásicos de purificación.

Variante: El término "variante" significa un polipéptido que tiene actividad de proteasa que comprende una alteración, es decir, una sustitución, inserción y/o deleción, en una o más (o una o varias) posiciones comparada con el original que es una proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica a la de dicha variante pero que no tiene las alteraciones en una o más de dichas posiciones especificadas. Una sustitución significa un reemplazo de un aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente; una deleción significa la eliminación de un aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa añadir aminoácidos, por ejemplo, 1 a 10 aminoácidos, tales como 9 aminoácidos, tales como 8 aminoácidos, tales como 7 aminoácidos, tales como 6 aminoácidos, tales como 5 aminoácidos, tales como 4 aminoácidos, preferiblemente 1-3 aminoácidos, más preferiblemente 1-2 aminoácidos y lo más preferiblemente dos aminoácidos adyacentes a un aminoácido que ocupa una posición.

Condiciones de rigurosidad muy altas: El término "condiciones de rigurosidad muy altas" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cizallado y desnaturalizado, y formamida al 50%, siguiendo procedimientos estándar del método Southern blot por 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces cada una por 15 minutos usando 2X SSC, SDS al 0,2% a 70°C.

Condiciones de rigurosidad muy bajas: El término "condiciones de rigurosidad muy bajas" significa para sondas de por lo menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cizallado y desnaturalizado, y formamida al 25%, siguiendo procedimientos estándar del método Southern blot por 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces cada una por 15 minutos usando 2X SSC, SDS al 0,2% a 45°C.

Rendimiento de lavado: El término "rendimiento de lavado" se usa como la capacidad de una enzima o detergente para eliminar las manchas presentes en el objeto a limpiar durante, por ejemplo, lavado, tales como lavado de ropa o limpieza de superficies duras. La mejora en el rendimiento de lavado puede cuantificarse calculando el denominado valor de intensidad (Int) definido en el ensayo de AMSA como se describe en materiales y métodos aquí. Véase también la prueba de rendimiento de lavado en el Ejemplo 2 aquí. Además, el rendimiento de lavado se puede determinar mediante la prueba de lavado de referencia descrita a continuación.

Proteasa de tipo salvaje: El término "proteasa de tipo salvaje" significa una proteasa expresada por un organismo de origen natural, tal como una bacteria, una arcaica, una levadura, un hongo, una planta o un animal que se encuentra en la naturaleza. Un ejemplo de una proteasa de tipo salvaje es BPN', es decir, la SEQ ID NO: 2 o Savinase (SEQ ID NO: 4).

Promotor de transcripción: El término "promotor de transcripción" se usa para un promotor que es una región de ADN que facilita la transcripción de un gen particular. Los promotores de transcripción se encuentran típicamente cerca de los genes que regulan, en la misma cadena y corriente arriba (hacia la región 5' de la cadena sentido).

Terminador de la transcripción: El término "terminador de la transcripción" se usa para una sección de la secuencia genética que marca el fin del gen o del operón en el ADN genómico para la transcripción.

Convenciones para la designación de variantes

Para los fines de la presente invención, el polipéptido maduro descrito en la SEQ ID NO: 2 se utiliza para determinar el residuo de aminoácido correspondiente en otra subtilisina. La secuencia de aminoácidos de otras subtilisinas está alineada con el polipéptido maduro descrito en la SEQ ID NO: 2, y con base en la alineación, el número de posición de aminoácido correspondiente a cualquier residuo de aminoácido en el polipéptido maduro descrito en la SEQ ID NO: 2 es determinado usando el algoritmo Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) tal como se implementó en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16:276-277), preferiblemente versión 5.0.0 o

posterior. Los parámetros utilizados son penalización por apertura de brecha de 10, penalización por extensión de intervalo de 0,5 y matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62).

5 La identificación del residuo de aminoácido correspondiente en otra subfamilia puede determinarse mediante una alineación de múltiples secuencias de polipéptidos usando varios programas informáticos incluyendo, pero sin limitarse a, MUSCLE (multiple sequence comparison by log-expectation, versión 3.5 o posterior, Edgar, 2004, Nucleic Acids Research 32: 1792-1797), MAFFT (versión 6.857 o posterior, Katoh and Kuma, 2002, Nucleic Acids Research 30: 3059-3066; Katoh et al., 2005, Nucleic Acids Research 33: 511-518; Katoh and Toh, 2007, Bioinformatics 23: 372-374; Katoh et al., 2009, Methods in Molecular Biology 537: 39-64; Katoh and Toh, 2010, Bioinformatics 26: 1899-1900) y EMBOSS EMMA empleando ClustalW (1,83 o posterior; Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Research 22: 4673-4680), utilizando sus respectivos parámetros predeterminados.

15 Cuando la otra enzima se ha separado del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de tal manera que la comparación tradicional con base en la secuencia no detecta su relación (Lindahl and Elofsson, 2000, J. Mol. Biol. 295: 613-615), se pueden utilizar otros algoritmos de comparación por pares de secuencias. Una mayor sensibilidad en la búsqueda con base en secuencias se puede lograr utilizando programas de búsqueda que utilizan representaciones probabilísticas de familias de polipéptidos (perfiles) para buscar bases de datos. Por ejemplo, el programa PSI-BLAST genera perfiles a través de un proceso iterativo de búsqueda de bases de datos y es capaz de detectar homólogos remotos (Atschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402). Se puede conseguir aún una mayor sensibilidad si la familia o superfamilia para el polipéptido tiene uno o más representantes en las bases de datos de estructura de proteínas. Programas tales como GenTHREADER (Jones, 1999, J. Mol. Biol. 287: 797-815, McGuffin and Jones, 2003, Bioinformatics 19: 874-881) utilizan información de una variedad de fuentes (PSI-BLAST, predicción de estructura secundaria, perfiles de alineación estructural y potenciales de solvatación) como entrada a una red neuronal que predice el pliegue estructural para una secuencia de consulta. De forma similar, el método de Gough et al., 2000, J. Mol. Biol. 313: 903-919, puede utilizarse para alinear una secuencia de estructura desconocida con los modelos de superfamilia presentes en la base de datos SCOP. Estas alineaciones pueden a su vez ser utilizadas para generar modelos de homología para el polipéptido, y se puede evaluar la precisión de los modelos usando una variedad de herramientas desarrolladas para ese propósito.

30 Para proteínas de estructura conocida, varias herramientas y recursos están disponibles para recuperar y generar alineaciones estructurales. Por ejemplo, las superfamilias SCOP de proteínas se han alineado estructuralmente, y esas alineaciones son accesibles y descargables. Se pueden alinear dos o más estructuras de proteína usando una variedad de algoritmos tales como la matriz de alineación de distancia (Holm and Sander, 1998, Proteins 33: 88-96) o extensión combinatoria (Shindyalov and Bourne, 1998, Protein Engineering 11: 739-747), y la implementación de estos algoritmos puede utilizarse adicionalmente para consultar bases de datos de estructuras con una estructura de interés con el fin de descubrir posibles homólogos estructurales (por ejemplo, Holm and Park, 2000, Bioinformatics 16: 566-567).

40 Al describir las variantes de la presente invención, la nomenclatura descrita a continuación se adapta para facilitar la referencia. Se emplea la abreviatura aceptada IUPAC de una sola letra o tres letras de aminoácidos.

45 Sustituciones. Para una sustitución de aminoácidos, se utiliza la siguiente nomenclatura: aminoácido original, posición, aminoácido sustituido. Por consiguiente, la sustitución de treonina en la posición 226 por alanina se designa como "Thr226Ala" o "T226A". Las mutaciones múltiples se separan por marcas de adición ("+"), por ejemplo, "Gly205Arg + Ser411Phe" o "G205R + S411F", que representan sustituciones en las posiciones 205 y 411 de glicina (G) con arginina (R) y serina (S) con fenilalanina (F), respectivamente.

50 Deleciones. Para una deleción de aminoácidos, se utiliza la siguiente nomenclatura: Aminoácido original, posición, *. Por consiguiente, la deleción de glicina en la posición 195 se designa como "Gly195*" o "G195*". Las deleciones múltiples se separan por marcas de adición ("+"), por ejemplo, "Gly195* + Ser411*" o "G195* + S411*".

55 Inserciones. Para una inserción de aminoácidos, se utiliza la siguiente nomenclatura: aminoácido original, posición, aminoácido original, aminoácido insertado. Por consiguiente, la inserción de lisina después de glicina en la posición 195 se denomina "Gly195GlyLys" o "G195GK". Una inserción de aminoácidos múltiples se designa [aminoácido original, posición, aminoácido original, aminoácido insertado # 1, aminoácido insertado # 2; etc.]. Por ejemplo, la inserción de lisina y alanina después de glicina en la posición 195 se indica como "Gly195GlyLysAla" o "G195GKA".

60 En estos casos, el residuo o los residuos de aminoácidos insertados se numeran mediante la adición de letras minúsculas al número de posición del residuo de aminoácido que precede al residuo o residuos de aminoácido insertado. En el ejemplo anterior, la secuencia sería por lo tanto:

Original:	Variante:
195	195 195a 195b
G	G - K - A

Alteraciones múltiples. Las variantes que comprenden múltiples alteraciones se separan por marcas de adición ("+"), por ejemplo, "Arg170Tyr+Gly195Glu" o "R170Y+G195E" que representa una sustitución de arginina y glicina en las posiciones 170 y 195 con tirosina y ácido glutámico, respectivamente.

5 Diferentes alteraciones. Cuando se pueden introducir diferentes alteraciones en una posición, las diferentes alteraciones se separan por una coma, por ejemplo, "Arg170Tyr,Glu" representa una sustitución de arginina en la posición 170 por tirosina o ácido glutámico. Por lo tanto, "Tyr167Gly,Ala + Arg170Gly,Ala" designa las siguientes variantes

10 "Tyr167Gly+Arg170Gly", "Tyr167Gly+Arg170Ala", "Tyr167Ala+Arg170Gly", y "Tyr167Ala+Arg170Ala".

Numeración de posiciones/residuos de aminoácidos

15 Si no se menciona nada más, la numeración de aminoácidos utilizada aquí corresponde a aquella de la secuencia de la subfamilia BPN' (BASBPN). Para una descripción adicional de la secuencia de BPN', véase la SEQ ID NO: 2 o Siezen et al., Protein Engng. 4 (1991) 719-737.

En lo que sigue, el término "que corresponde a" debe entenderse como que corresponde a una posición de SEQ ID NO: 2, es decir, la numeración a lo largo del documento es de acuerdo con BPN'.

20 Descripción detallada de la invención

Los inventores han encontrado que el cambio de la carga global de las posiciones correspondientes a la posición 25 217 o 218 de la SEQ ID NO: 2 dio como resultado variantes con un rendimiento de lavado incrementado en particular en manchas de huevo, haciendo por tanto tales variantes particularmente aplicables para composiciones detergentes. El aumento de la carga positiva en ambas posiciones correspondientes a la posición 217 y 218, es decir, mediante sustitución del aminoácido que ocupa la posición 217 y el aminoácido que ocupa la posición 218 con un aminoácido que es cargado más positivamente dio lugar a variantes de proteasa con propiedades mejoradas en comparación con su original, es decir, en comparación con la SEQ ID NO: 2, que son ventajosamente aplicables en composiciones detergentes. En particular, las variantes han aumentado el rendimiento de lavado comparado con un original con la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 2 con la mutación Y217L o comparado con un original con un único cambio de carga en la posición 217 o 218. Aunque una única sustitución en la posición 217 o 218 con un aminoácido más cargado que el aminoácido sustituido puede proporcionar un efecto beneficioso sobre el rendimiento de lavado, este efecto fue más pronunciado cuando ambas posiciones 217 y 218 se cargaron más positivamente o más negativamente en comparación con la SEQ ID NO: 2, es decir, sustituyendo los aminoácidos correspondientes a 217 y 218 de la SEQ ID NO: 2 en la proteasa original con los aminoácidos R, K, cargados positivamente. Los inventores encontraron que se obtiene un rendimiento de lavado incrementado cuando las sustituciones conducen a un cambio general en la carga en las dos posiciones correspondientes a la posición 217 y 218 de la SEQ ID NO: 2. Por lo tanto, variantes con la misma carga en las posiciones 217 y 218, por ejemplo, una carga positiva en ambas posiciones tales como Y217K+N218R mostró un mejor rendimiento comparado con el original, con una proteasa con la SEQ ID NO: 2 o relativo a una proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero que no tiene las alteraciones en uno o más de dichas posiciones especificadas. Hacer la proteasa cargada más positivamente en las posiciones correspondientes a la posición 217 o 218 de la SEQ ID NO: 2 da lugar a variantes de proteasa que son más hidrófilas. Por lo tanto, de acuerdo con otra realización, las variantes de proteasa en composiciones detergentes de acuerdo con la invención son más hidrófilas en las posiciones correspondientes a las posiciones 217 y 218 de la SEQ ID NO: 2 comparadas al original, a una proteasa con la SEQ ID NO: 2 o con respecto a una proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero que no tiene las alteraciones en una o más de dichas posiciones especificadas.

50 Un aspecto de la invención se refiere a composiciones detergentes que comprenden variantes de subtilisina que comprenden las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2, en la que X y Z se seleccionan del grupo que consiste en R, K, en el que cuando X es K o R, entonces Z se selecciona también entre K o R. En un aspecto particular X y Z en la variante son el mismo aminoácido, en un aspecto X y Z en la variante son iguales y se seleccionan del grupo que consiste en R, K. En un aspecto adicional X y Z en la variante son K o R. En un aspecto preferido, la invención se relaciona a composiciones detergentes que comprenden variantes de subtilisina que comprenden las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2, en la que X y Z se seleccionan del grupo que consiste en R, K, en el que cuando X es K o R, entonces Z también se selecciona de K o R y en donde la variante tiene al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94% al menos 95% de identidad, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, pero menos que 100%, identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 o 4. Se describe adicionalmente la variante en una composición detergente que es un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene al menos 90% de identidad con la secuencia codificadora del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1 o 3 o una secuencia que codifica el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 o 4. También se describe la variante de una composición detergente que es un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94% al menos 95% de identidad, al menos 96%, al

menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, pero menos del 100%, de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1 o 3.

Otra realización se refiere a un método para producir una composición detergente que comprende la etapa de añadir una variante de subtilisina que se obtuvo por un método que comprende la introducción en una subtilisina original las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2, en la que X y Z se seleccionan del grupo que consiste en R, K, en el que cuando X es K o R, entonces Z también se selecciona de K o R y en la que la variante es una variante de una subtilisina original que tiene al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94% al menos 95% de identidad, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, o 100% de identidad de secuencia al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 o 4.

En una realización, la variante de proteasa en la composición detergente de la invención es una variante BPN' (SEQ ID NO: 2) que comprende las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z de la SEQ ID NO: 2, en la que X y Z se seleccionan del grupo que consiste en R, K. En otra realización más, la variante de proteasa en la composición detergente de la invención es una variante de BPN' que comprende cualquiera de las sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en [Y217K+N218K], [Y217R+N218R], [Y217K+N218R], [Y217R+N218K], en la que la variante tiene al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94% al menos 95% de identidad, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, pero menos del 100%, de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.

En otra realización particular, la variante de proteasa en la composición detergente de la invención es una variante de Savinasa (SEQ ID NO: 4) que comprende las sustituciones correspondientes a L217X y N218Z de la SEQ ID NO: 2, en la que X y Z se seleccionan del grupo que consiste en R, K, en otra realización más, la variante de proteasa en la composición detergente de la invención es una variante de la Savinasa que comprende cualquiera de las sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en [L217K+N218K], [L217R+N218R], [L217K+N218R], [L217R+N218K], en la que la variante tiene al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94% al menos 95% de identidad, al menos 96%, al menos 97 %, al menos 98%, o al menos 99%, pero menos del 100%, de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 4.

En una realización, la variante comprende una sustitución en una posición correspondiente a la posición 217 de la SEQ ID NO: 2 con K y comprende además una sustitución en una posición correspondiente a la posición 218 de la SEQ ID NO: 2 con K.

En una realización, la variante comprende una sustitución en una posición correspondiente a la posición 217 de la SEQ ID NO: 2 con K y comprende además una sustitución en una posición correspondiente a la posición 218 de la SEQ ID NO: 2 con R.

En una realización, la variante comprende una sustitución en una posición correspondiente a la posición 217 de la SEQ ID NO: 2 con R y comprende además una sustitución en una posición correspondiente a la posición 218 de la SEQ ID NO: 2 con K.

En una realización, la variante comprende una sustitución en una posición correspondiente a la posición 217 de la SEQ ID NO: 2 con R y comprende además una sustitución en una posición correspondiente a la posición 218 de la SEQ ID NO: 2 con R.

En un aspecto, el número total de alteraciones en las variantes de la presente invención es 1-20, por ejemplo, 1-10 y 1-5, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 alteraciones.

En un aspecto, la variante comprende o consiste de una alteración en una posición correspondiente a la posición 217 y una alteración en una posición correspondiente a la posición 218 en la que dichas posiciones 217 y 218 están sustituidas con Arg, Lys. En otro aspecto, la variante comprende o consiste de una alteración en una posición correspondiente a la posición 217 y una alteración en una posición correspondiente a la posición 218 en la que dichas posiciones 217 y 218 están sustituidas con Arg, Lys y en la que la sustitución en las posiciones 217 y 218 es con el mismo aminoácido. Por lo tanto, en un aspecto la variante comprende o consiste en las sustituciones Y217R+N218R, o Y217K+R217K. En otro aspecto, la variante comprende o consiste en una alteración en una posición correspondiente a la posición 217 y una alteración en una posición correspondiente a la posición 218 de la SEQ ID NO: 2 con Arg, Lys, en la que la sustitución en las posiciones 217 y 218 no es con el mismo aminoácido y en el que la sustitución en las posiciones 217 y 218 da lugar a un cambio global de carga en estas dos posiciones. Por lo tanto, en un aspecto, la variante comprende o consiste en las sustituciones Y217R+N218K, + Y217K+N218R. Todas las variantes descritas anteriormente son particularmente aplicables en composiciones detergentes de acuerdo con la invención.

Por lo tanto, un aspecto de la invención se refiere a una composición detergente que comprende una variante de subtilisina, que comprende las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2, donde X y Z se seleccionan del grupo que consiste en R, K y en la que X y Z son el mismo aminoácido.

Un aspecto de la invención se refiere a una composición detergente que comprende una variante de subtilisina, que comprende las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2, en la que X y Z se seleccionan del grupo que consiste en R, K, en la que X y Z son el mismo aminoácido y en la que X y Z son R.

5 Un aspecto de la invención se refiere a una composición detergente que comprende una variante de subtilisina, que comprende las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2, en la cual X y Z se seleccionan del grupo que consiste en R, K, donde X y Z son el mismo aminoácido y donde X y Z son K.

10 Un aspecto de la invención se refiere a una composición detergente que comprende una variante de subtilisina, que comprende las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2, donde X y Z se seleccionan del grupo que consiste en R, K, en la que X y Z no son el mismo aminoácido y en donde X es K y Z es R.

15 Un aspecto de la invención se refiere a una composición detergente que comprende una variante de subtilisina, que comprende las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2, en la que X y Z se seleccionan del grupo que consiste en R, K, en donde X y Z no son el mismo aminoácido y en donde X es R y Z es K.

20 Un aspecto de la invención se refiere a una composición detergente que comprende una variante de subtilisina, que comprende las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2, en la que X y Z se seleccionan del grupo que consiste en R, K y donde X y Z es R o K.

25 En otro aspecto, la variante comprende o consiste en las sustituciones L217K y N218K del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 4.

En otro aspecto, la variante comprende o consiste en las sustituciones L217R y N218R del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 4.

30 En otro aspecto, la variante comprende o consiste en las sustituciones L217K y N218R del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 4.

35 En otro aspecto, la variante comprende o consiste en las sustituciones L217R y N218K del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 4.

Las variantes en composiciones detergentes de acuerdo con la invención pueden comprender además una o más alteraciones adicionales en una o más (por ejemplo, varias) posiciones.

40 Los cambios de aminoácidos pueden ser de naturaleza menor, esto es, sustituciones o inserciones conservadoras de aminoácidos que no afectan significativamente al plegamiento y/o actividad de la proteína; pequeñas deleciones, típicamente de 1-30 aminoácidos; pequeñas extensiones amino o carboxilo terminales, tales como un residuo de metionina aminoterminal; un pequeño péptido enlazante de hasta 20-25 residuos; o una pequeña extensión que facilita la purificación cambiando la carga neta u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de enlace.

45 Ejemplos de sustituciones conservadoras están dentro de los grupos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) y pequeños aminoácidos (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Las sustituciones de aminoácidos que no alteran generalmente la actividad específica son conocidas en la técnica y están descritas, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, en, *The Proteins*, Academic Press, New York. Las sustituciones habituales son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Asn/Gln, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Glu/Gln, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, y Asp/Gly.

50 Alternativamente, los cambios de aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades fisicoquímicas de los polipéptidos están alteradas. Por ejemplo, los cambios de aminoácidos pueden mejorar la estabilidad térmica del polipéptido, alterar la especificidad del sustrato, cambiar el pH óptimo, y similares.

60 Por ejemplo, las variantes en las composiciones detergentes de acuerdo con la invención comprenden una alteración en las posiciones correspondientes a las posiciones 217 y 218 y comprenden además una alteración en otra posición o posiciones, siempre y cuando la alteración no afecte al rendimiento de la variante.

65 Los aminoácidos esenciales en un polipéptido pueden identificarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de escaneo de alanina (Cunningham and Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). En esta última técnica, se introducen mutaciones de alanina únicas en cada residuo

en la molécula y se prueban las moléculas mutantes resultantes para determinar la actividad de la proteasa para identificar los residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton et al., 1996, J. Biol. Chem. 271: 4699-4708. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica puede determinarse también por ensayo físico de la estructura, tal como se determina mediante técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o etiquetado de fotoafinidad, junto con mutación de aminoácidos del sitio putativo de contacto. Véase, por ejemplo, de Vos et al., 1992, Science 255: 306-312; Smith et al., 1992, J. Mol. Biol. 224: 899-904; Wlodaver et al., 1992, FEBS Lett. 309: 59-64. La identidad de aminoácidos esenciales también se puede deducir de una alineación con un polipéptido relacionado. Para BPN' (SEQ ID NO: 2) la tríada catalítica que comprende los aminoácidos S221, H64 y D32 es esencial para la actividad proteasa de la enzima.

Las variantes pueden consistir de 200 a 900 aminoácidos, por ejemplo, 210 a 800, 220 a 700, 230 a 600, 240 a 500, 250 a 400, 255 a 300, 260 a 290, 265 a 285, 270 a 280 o 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279 o 280 aminoácidos.

En una realización, la variante tiene una actividad catalítica mejorada en comparación con la enzima original.

En una realización, la variante tiene un rendimiento de lavado mejorado en comparación con la subtilisina original o comparada con una proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero que no tiene las alteraciones en una o más de dichas posiciones especificadas o comparada con una proteasa con la SEQ ID NO: 2, en el que el rendimiento de lavado se mide como se describe en el ejemplo 2 en "Material y Métodos" aquí.

En otra realización, la composición detergente que comprende la variante tiene un rendimiento de lavado mejorado en comparación con una composición detergente por lo demás idéntica con una proteasa que es la subtilisina original o con una proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero que no tiene las alteraciones en una o más de dichas posiciones especificadas, o con una proteasa con la SEQ ID NO: 2.

Proteasas originales

Las enzimas que escinden los enlaces amida en sustratos de proteínas se clasifican como proteasas o (indistintamente) peptidasas (véase Walsh, 1979, Enzymatic Reaction Mechanisms, W.H. Freeman and Company, San Francisco, Capítulo 3).

Serinas proteasas

Una serina proteasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces peptídicos, y en la que hay un residuo esencial de serina en el sitio activo (White, Handler and Smith, 1973, "Principles of Biochemistry", Fifth Edition, McGraw-Hill Book Company, NY, páginas 271-272).

Las serina proteasas bacterianas tienen pesos moleculares en el intervalo de 20.000 a 45.000 Dalton. Se inhiben por diisopropilfluorofosfato. Hidrolizan ésteres terminales simples y son similares en actividad a la quimotripsina eucariótica, también una serina proteasa. Un término más estrecho, proteasa alcalina, que cubre un subgrupo, refleja el alto pH óptimo de algunas de las serina proteasas, de pH 9,0 a 11,0 (para revisión, véase Priest (1977) Bacteriological Rev. 41 711-753).

Subtilasas

Un subgrupo de las serina proteasas designadas tentativamente subtilasas ha sido propuesto por Siezen et al., Protein Engng. 4 (1991) 719-737 y Siezen et al. Protein Science 6 (1997) 501-523. Se definen por ensayo de homología de más de 170 secuencias de aminoácidos de serina proteasas anteriormente denominadas proteasas de tipo subtilisina. Anteriormente se definía a menudo una subtilisina como una serina proteasa producida por bacterias Gram-positivas u hongos, y según Siezen et al. ahora es un subgrupo de las subtilasas. Se ha identificado una amplia variedad de subtilasas y se ha determinado la secuencia de aminoácidos de una serie de subtilasas. Para una descripción más detallada de tales subtilasas y sus secuencias de aminoácidos se hace referencia a Siezen et al. (1997).

Un subgrupo de las subtilasas, I-S1 o subtilisinas "verdaderas", comprende las subtilisinas "clásicas", tales como subtilisina 168 (BSS168), subtilisina BPN', subtilisina Carlsberg (ALCALASE®, NOVOZYMES A/S) y subtilisina DY(BSSDY).

Otro subgrupo de las subtilasas, I-S2 o subtilisinas de alta alcalinidad, es reconocido por Siezen et al. (supra). Las proteasas del subgrupo I-S2 se describen como subtilisinas altamente alcalinas y comprenden enzimas tales como subtilisina PB92 (BAALKP) (MAXACAL®, Genencor International Inc.), subtilisina 309 (SAVINASE®, NOVOZYMES A/S), subtilisina 147 (BLS147) (ESPERASE®, NOVOZYMES A/S), y elastasa alcalina YaB (BSEYAB). BPN' es subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* BPN' tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2.

Subtilisinas

5 Las subtilisinas son serina proteasas de la familia S8, en particular de la subfamilia S8A, tal como se define en la base de datos MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/famsum?family=S8>). BPN' y Savinasa tienen los números MEROPS S08.034 y S08.003, respectivamente.

Subtilisina original

10 El término "subtilisina original" describe una subtilasa definida de acuerdo con Siezen et al. (1991 y 1997). Para más detalles ver descripción de "Subtilasas" arriba. Una subtilisina original puede ser también una subtilasa aislada de una fuente natural, en la que se han hecho modificaciones subsiguientes conservando la característica de una subtilasa. Apertura de mezclado de ADN, tal como se describe por J.E. Ness et al., Nature Biotechnology, 17, 893-896 (1999).

15 Alternativamente, el término "subtilisina original" puede denominarse "subtilasa de tipo salvaje".

Para referencia, se proporciona una tabla de las siglas de las diversas subtilasas mencionadas aquí, para otras siglas, véase Siezen et al., Protein Engng. 4 (1991) 719-737 y Siezen et al. Protein Science 6 (1997) 501-523.

20

Organismo	Tabla III enzima	sigla
Bacteria: Gram-positiva		
Bacillus subtilis 168	subtilisina I168, apr	BSS168
Bacillus amyloliquefaciens	subtilisina BPN' (NOVO)	BASBPN
Bacillus subtilis DY	subtilisina DY	BSSDY
Bacillus licheniformis	subtilisina Carlsberg	BLSCAR
Bacillus lentus	subtilisina 309	BLSAVI
Bacillus lentus	subtilisina 147	BLS147
Bacillus alcalophilus PB92	subtilisina PB92	BAPB92
Bacillus YaB	elastasa alcalina YaB	BYSYAB
Bacillus sp. NKS-21	subtilisina ALP I	BSAPRQ
Bacillus sp. G-825-6	subtilisina Sendai	BSAPRS
Thermoactinomyces vulgaris	termitasa	TVTHER

25 Modificación o modificaciones de una subtilasa

30 El término "modificación o modificaciones" utilizado aquí se define para incluir la modificación química de una subtilasa así como la manipulación genética del ADN que codifica una subtilasa. La modificación o modificaciones pueden ser sustituciones de la o de las cadenas laterales de aminoácido, sustitución o sustituciones, delección o delecciones y/o inserción o inserciones dentro de o en el aminoácido o aminoácidos de interés.

Variante de subtilisina

35 El término "variante" y el término "variante de subtilisina" se definen anteriormente.

Secuencias de subtilasa homólogas

40 La homología entre dos secuencias de aminoácidos se describe en este contexto por el parámetro "identidad" para los fines de la presente invención, se determina el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos usando el algoritmo Needleman-Wunsch como se ha descrito anteriormente. La salida de la rutina es además de la alineación de aminoácidos el cálculo del "Porcentaje de Identidad" entre las dos secuencias.

45 Con base en esta descripción, es rutinario para una persona experimentada en la técnica identificar subtilasas homólogas adecuadas, que pueden ser modificadas de acuerdo con la invención.

50 Las variantes de subtilisina original sustancialmente homólogas pueden tener una o más (varias) sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos, en el presente contexto el término "uno o más" se utiliza indistintamente con el término "varios". Estos cambios son preferiblemente de naturaleza menor, es decir, sustituciones conservativas de aminoácidos como se ha descrito anteriormente y otras sustituciones que no afectan significativamente al plegamiento o actividad tridimensional de la proteína o polipéptido; pequeñas delecciones, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; y pequeñas extensiones amino o carboxilo terminales, tales como un residuo amino terminal de metionina, un péptido enlazador pequeño de hasta aproximadamente 20-25

residuos, o una pequeña extensión que facilita la purificación (un marcador de afinidad), tal como un tracto de polihistidina, o proteína A (Nilsson et al., 1985, EMBO J. 4: 1075, Nilsson et al., 1991, Methods Enzymol, 198: 3. Véase también, en general, Ford et al., 1991, Protein Expression and Purificación 2: 95-107.

5 Aunque los cambios descritos anteriormente son preferiblemente de naturaleza menor, tales cambios también pueden ser de naturaleza sustancial tales como la fusión de polipéptidos mayores de hasta 300 aminoácidos o más, ambos como extensiones terminales amino o carboxilo.

10 La subtilisina original puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 o una variante alélica de la misma; o un fragmento del mismo que tiene actividad de proteasa. En un aspecto, la subtilisina original comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.

15 La subtilisina original puede ser (a) un polipéptido que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 o 4; (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida en condiciones de alta rigurosidad con (i) la secuencia codificadora de polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1 o 3, (ii) una secuencia que codifica el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 o 4, o (iii) el complemento de longitud completa de (i) o (ii); o (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia codificante de polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1 o 3.

20 En un aspecto, el original tiene una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 o 4 de al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95 % de identidad, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, o 100%, que tienen actividad proteasa. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos del original difiere en no más de 10 aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9, del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 o 4. En un aspecto preferido, la secuencia de aminoácidos del original difiere en no más de 10 aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9, del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 o 4, en el que las variantes han conservado sus propiedades mejoradas.

30 En otro aspecto, el original comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o 4. En otro aspecto, el original comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 o 4. En otro aspecto, el original comprende o consiste de los aminoácidos 1 a 275 de la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto más, el original comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 269 de la SEQ ID NO: 4.

35 En otro aspecto, el original está codificado por un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones de alta rigurosidad o condiciones de rigurosidad muy alta con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1 o 3, (ii) una secuencia que codifica el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 o 4, o (iii) el complemento de longitud completa de (i) o (ii), (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor, New York).

40 El polinucleótido de la SEQ ID NO: 1 o 3 o una subsecuencia del mismo, así como el polipéptido de la SEQ ID NO: 2 o 4 o un fragmento del mismo pueden usarse para diseñar sondas de ácido nucleico para identificar y clonar ADN que codifica un original de cepas de diferentes géneros o especies según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, tales sondas pueden utilizarse para la hibridación con el ADN genómico o el ADNc de una célula de interés, siguiendo procedimientos estándar del método Southern blot, con el fin de identificar y aislar el gen correspondiente en el mismo. Dichas sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia completa, pero deben ser al menos 15, por ejemplo, al menos 25, al menos 35 o al menos 70 nucleótidos de longitud. Preferiblemente, la sonda de ácido nucleico tiene una longitud de al menos 100 nucleótidos, por ejemplo, al menos 200 nucleótidos, al menos 300 nucleótidos, al menos 400 nucleótidos, al menos 500 nucleótidos, al menos 600 nucleótidos, al menos 700 nucleótidos, al menos 800 nucleótidos, o al menos 900 nucleótidos de longitud. Pueden usarse tanto sondas de ADN como de ARN. Las sondas se marcan típicamente para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con ³²P, ³H, ³⁵S, biotina o avidina).

55 Una genoteca de ADN o ADNc genómica preparada a partir de tales otras cepas puede ser rastreada para detectar ADN que se hibrida con las sondas descritas anteriormente y codifica para un original. El ADN genómico u otro ADN de estas otras cepas puede separarse por electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, u otras técnicas de separación. El ADN de las genotecas o el ADN separado pueden transferirse a e inmovilizarse sobre nitrocelulosa u otro material portador adecuado. Con el fin de identificar un clon o ADN que se hibrida con la SEQ ID NO: 1 o 3 o una subsecuencia de los mismos, el material portador se usa en un método de Southern blot.

60 Para los fines de la presente invención, la hibridación indica que el polinucleótido se hibrida a una sonda de ácido nucleico marcada que corresponde a (i) la SEQ ID NO: 1 o 3; (ii) la secuencia codificadora del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1 o 3; (iii) una secuencia que codifica el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 o 4; (iv) el complemento de longitud completa de la misma; o (v) una subsecuencia de la misma; bajo condiciones de rigurosidad muy baja a muy alta. Las moléculas a las que se hibrida la sonda de ácido nucleico bajo estas condiciones pueden ser detectadas usando, por ejemplo, una película de rayos X o cualquier otro medio de detección conocido en la técnica.

- En un aspecto, la sonda de ácido nucleico es la secuencia codificadora del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1 o 3. En otro aspecto, la sonda de ácido nucleotídico es un fragmento de longitud de 80 a 1140 nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 o 3, por ejemplo, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 o 1100 nucleótidos de longitud. En otro aspecto, la sonda de ácido nucleico es un polinucleótido que codifica el polipéptido de la SEQ ID NO: 2 o 4; el polipéptido maduro del mismo; o un fragmento del mismo. En otro aspecto, la sonda de ácido nucleico es la SEQ ID NO: 1 o 3 o una secuencia que codifica el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 o 4, respectivamente.
- En otra realización, el original está codificado por un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia con la secuencia codificante de polinucleótido maduro de la SEQ ID NO: 1 o 3 de al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94% al menos 95% de identidad, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% o 100%.
- El polipéptido puede ser un polipéptido híbrido en el que una región de un polipéptido se fusiona en el extremo N o en el extremo C de una región de otro polipéptido.
- El original puede ser un polipéptido de fusión o un polipéptido de fusión escindible en el que otro polipéptido está fusionado en el extremo N o en el extremo C del polipéptido de la presente invención. Se produce un polipéptido de fusión fusionando un polinucleótido que codifica otro polipéptido a un polinucleótido descrito en la presente descripción. Las técnicas para producir polipéptidos de fusión son conocidas en la técnica e incluyen ligar las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de modo que estén en el marco y que la expresión del polipéptido de fusión esté bajo control del mismo promotor o promotores y terminador. Los polipéptidos de fusión pueden construirse también usando tecnología de inteína en la que se crean polipéptidos de fusión después de la traducción (Cooper et al., 1993, EMBO J. 12: 2575-2583; Dawson et al., 1994, Science 266: 776-779).
- Un polipéptido de fusión puede comprender además un sitio de escisión entre los dos polipéptidos. Tras la secreción de la proteína de fusión, el sitio se escinde liberando los dos polipéptidos. Ejemplos de sitios de escisión incluyen, pero no se limitan a, los sitios descritos en Martin et al., 2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3: 568-576; Svetina et al., 2000, J. Biotechnol. 76: 245-251; Rasmussen-Wilson et al., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3488-3493; Ward et al., 1995, Biotechnology 13: 498-503; y Contreras et al., 1991, Biotechnology 9: 378-381; Eaton et al., 1986, Biochemistry 25: 505-512; Collins- Racie et al., 1995, Biotechnology 13: 982-987; Carter et al., 1989, Proteins: Structure, Function, and Genetics 6: 240-248; y Stevens, 2003, Drug Discovery World 4: 35-48.
- El original puede obtenerse de organismos de cualquier género. Para los propósitos de la presente invención, el término "obtenido de", tal como se utiliza aquí en conexión con una fuente dada, significará que el original codificado por un polinucleótido es producido por la fuente o por una cepa en la que se ha insertado el polinucleótido de la fuente. En un aspecto, el original es secretado extracelularmente.
- El original puede ser una proteasa bacteriana. Por ejemplo, el original puede ser un polipéptido bacteriano Gram-positivo tal como una proteasa de Bacillus, Clostridium, Enterococcus, Geobacillus, Lactobacillus, Lactococcus, Oceanobacillus, Staphylococcus, Streptococcus o Streptomyces, o un polipéptido bacteriano Gram-negativo tal como proteasa de Campylobacter, E. coli, Flavobacterium, Fusobacterium, Helicobacter, Ilyobacter, Neisseria, Pseudomonas, Salmonella o Ureaplasma.
- En un aspecto, el original es una proteasa de Bacillus alkalophilus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus brevis, Bacillus circulans, Bacillus clausii, Bacillus coagulans, Bacillus firmus, Bacillus lautus, Bacillus lentus, Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium, Bacillus pumilus, Bacillus stearothermophilus, Bacillus subtilis, o Bacillus thuringiensis.
- En un aspecto, el original es una proteasa de Bacillus amyloliquefaciens, por ejemplo, la proteasa de la SEQ ID NO: 2 o su polipéptido maduro.
- En otro aspecto, el progenitor es una proteasa de Bacillus lentus, por ejemplo, la proteasa de la SEQ ID NO: 4 o su polipéptido maduro.
- Las cepas de estas especies son fácilmente accesibles al público en una serie de colecciones de cultivo, tales como la Colección de Cultivo Tipo Americano (ATCC), la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) y la Colección de Patentes de Cultivo del Servicio de Investigación Agrícola, Centro de Investigación Regional del Norte (NRRL).
- El original puede ser identificado y obtenido de otras fuentes, incluyendo microorganismos aislados de la naturaleza (por ejemplo, tierra, abonos, agua, etc.) o muestras de ADN obtenidas directamente de materiales naturales (por ejemplo, suelo, abonos, agua, etc.) usando las sondas mencionadas anteriormente. Las técnicas para aislar microorganismos y ADN directamente de hábitats naturales son bien conocidas en la técnica. Un polinucleótido que codifica un original puede obtenerse entonces seleccionando de forma similar una genoteca de ADN genómico o de ADNc de otro microorganismo o muestra de ADN mixta. Una vez que se ha detectado con la sonda o sondas, un

polinucleótido que codifica un original, el polinucleótido puede aislarse o clonarse utilizando técnicas conocidas por los experimentados en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, supra).

Preparación de variantes

5 Las variantes se pueden preparar usando cualquier procedimiento de mutagénesis conocido en la técnica, tal como mutagénesis sitio dirigida, construcción génica sintética, construcción de genes semisintéticos, mutagénesis aleatoria, mezclado, etc.

10 La mutagénesis sitio dirigida es una técnica en la que una o más (por ejemplo, varias) mutaciones se introducen en uno o más sitios definidos en un polinucleótido que codifica al original.

15 La mutagénesis sitio dirigida puede realizarse in vitro mediante PCR que implica el uso de cebadores de oligonucleótidos que contienen la mutación deseada. La mutagénesis sitio dirigida también puede realizarse in vitro por mutagénesis de casete que implica la escisión por una enzima de restricción en un sitio en el plásmido que comprende un polinucleótido que codifica el original y la ligadura subsiguiente de un oligonucleótido que contiene la mutación en el polinucleótido. Normalmente, la enzima de restricción que digiere el plásmido y el oligonucleótido es la misma, permitiendo que los extremos pegajosos del plásmido y el inserto se ligen entre sí. Véase, por ejemplo, Scherer and Davis, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4949-4955; y Barton et al., 1990, Nucleic Acids Res. 18: 20 7349-4966.

25 La mutagénesis sitio dirigida también puede lograrse in vivo por métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. 2004/0171154; Storici et al., 2001, Nature Biotechnol. 19: 773-776; Kren et al., 1998, Nat. Med. 4: 285-290; y Calissano and Macino, 1996, Fungal Genet. Newslett. 43: 15-16.

Cualquier procedimiento de mutagénesis sitio dirigida puede usarse en la presente invención. Hay muchos kits comerciales disponibles que se pueden utilizar para preparar variantes.

30 La construcción de genes sintéticos implica la síntesis in vitro de una molécula de polinucleótido diseñada para codificar un polipéptido de interés. La síntesis génica puede realizarse utilizando una serie de técnicas, tales como la tecnología multiplex con base en microchip descrita por Tian et al. (2004, Nature 432: 1050-1054) y tecnologías similares en las que los oligonucleótidos son sintetizados y ensamblados sobre chips microfluídicos fotoprogramables.

35 Se pueden preparar y probar sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos individuales o múltiples, utilizando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o mezclado, seguidos por un procedimiento de revisión relevante, tales como los descritos por Reidhaar-Olson and Sauer, 1988, Science 241: 53-57; Bowie and Sauer, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2152-2156; los documentos WO 95/17413; o WO 95/22625. Otros métodos que pueden usarse incluyen PCR propenso a errores, presentación sobre fagos (por ejemplo, Lowman et al., 1991, Biochemistry 30: 10832-10837, Patente de los Estados Unidos No. 5,223,409, documento WO 92/06204) y mutagénesis dirigida a regiones (Derbyshire et al., 1986, Gene 46: 145, Ner et al., 1988, DNA 7: 127).

45 Los métodos de mutagénesis/mezclado pueden combinarse con métodos de revisión automatizados de alto rendimiento para detectar la actividad de polipéptidos clonados y mutagenizados expresados por células huésped (Ness et al., 1999, Nature Biotechnology 17: 893-896). Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos pueden recuperarse de las células huésped y secuenciarse rápidamente usando métodos estándar en la técnica. Estos métodos permiten la rápida determinación de la importancia de los residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido.

50 La construcción del gen semisintético se consigue combinando aspectos de construcción de genes sintéticos y/o mutagénesis sitio dirigida, y/o mutagénesis aleatoria, y/o mezclado. La construcción semisintética se caracteriza por un proceso que utiliza fragmentos polinucleotídicos que se sintetizan, en combinación con técnicas de PCR. Las regiones definidas de genes pueden, por lo tanto, sintetizarse de novo, mientras que otras regiones pueden amplificarse usando cebadores mutagénicos sitio específicos, mientras que otras regiones pueden ser sometidas a amplificación por PCR propenso a errores o por PCR no propenso a errores. Las subsecuencias polinucleotídicas pueden entonces barajarse.

Caracterización adicional de composiciones detergentes de acuerdo con la invención

60 De acuerdo con la invención, se ha encontrado sorprendentemente que composiciones detergentes como las descritas anteriormente, es decir composiciones detergentes que comprenden una variante de proteasa como se ha descrito, presentan un rendimiento de lavado ventajoso, preferiblemente un rendimiento de lavado mejorado, especialmente con respecto a manchas sensibles a proteasas, particularmente manchas de huevo.

65

La composición detergente de la presente invención se puede formular, por ejemplo, como una composición detergente para lavado de ropa a mano o en máquina que incluye una composición aditiva para lavado de ropa adecuada para el pretratamiento de tejidos teñidos y una composición añadida al enjuague de suavizante de tejidos o ser formulada como una composición detergente para uso en operaciones generales de limpieza doméstica de superficies duras, o pueden ser formuladas para operaciones generales domésticas de limpieza de superficies duras, o ser formulada para operaciones de lavado de platos manual o a máquina. Preferiblemente, la composición detergente de acuerdo con la invención es una composición detergente para ropa o una composición para el lavado de platos, preferiblemente una composición para máquina lavaplatos.

En un aspecto específico, la presente invención proporciona un aditivo detergente que comprende un polipéptido de la presente invención como se describe aquí.

En una realización preferida adicional, la composición detergente de acuerdo con la invención comprende la variante de proteasa en una cantidad desde 1×10^{-8} -10 por ciento en peso (en peso), desde 0,00001-2% en peso, desde 0,001-1% en peso, desde 0,007-0,8% en peso, desde 0,025-0,5% en peso y particularmente preferido desde 0,04-0,38% en peso, con base en el contenido de proteína total de la variante de proteasa. La concentración de proteína puede determinarse usando métodos conocidos, por ejemplo el Proceso BCA (ácido bicinconínico, ácido 2,2'-biquinolil-4,4'-dicarboxílico) o el procedimiento biuret (A.G. Gornall, C.S. Bardawill and M.M. David, J. Biol. Chem., 177 (1948), páginas 751-766).

En otra realización preferida, la composición detergente de acuerdo con la invención es una composición detergente líquida.

En una realización preferida adicional, la composición detergente se caracteriza porque presenta un rendimiento de lavado mejorado. Preferiblemente, dicho rendimiento de lavado mejorado se determina como se indica en las definiciones aquí, especialmente calculando el denominado valor de intensidad (Int) definido en el ensayo AMSA como se describe en materiales y métodos aquí (véase también la prueba de rendimiento de lavado en el Ejemplo 2 aquí) o mediante la prueba de lavado de referencia descrita más adelante.

Prueba de lavado de referencia:

En la prueba de lavado de referencia, el rendimiento de lavado se determina en un sistema de lavado que contiene una composición detergente a una proporción de dosificación de entre 4,5 y 7,0 gramos por litro de licor de lavado así como la proteasa. Las composiciones detergentes a comparar contienen la misma cantidad de la proteasa respectiva con base en el contenido de proteína total, proporcionando preferiblemente una cantidad de 5 mg de proteasa por litro de licor de lavado. El rendimiento de lavado se determina con respecto a las manchas de huevo, en particular con respecto a una o más de las siguientes manchas:

- huevo completo con pigmento sobre algodón: producto número C-S-37 se obtiene de CFT (Centro para Materiales de Prueba) B.V., Vlaardingen, Países Bajos,

- huevo completo con pigmento sobre algodón/poliéster: producto número PC-S-37 se obtiene de CFT (Centro para Materiales de Prueba) B.V., Vlaardingen, Países Bajos,

- huevo completo con pigmento, envejecido por calentamiento, sobre algodón/poliéster: número PC-S-39 obtenible de CFT (Centro para Materiales de Prueba) B.V., Vlaardingen, Países Bajos,

midiendo la blancura de los textiles lavados, realizándose el procedimiento de lavado durante al menos 30 minutos, opcionalmente 60 minutos, a una temperatura de 40°C, y el agua que tiene una dureza del agua entre 15,5 y 16,5° (grados de dureza alemanes) .

La composición detergente líquida preferida para dicho sistema de lavado tiene la siguiente composición (todas las indicaciones en porcentaje en peso): goma de xantano al 0,3 a 0,5%, agente antiespumante al 0,2 a 0,4%, glicerol al 6 a 7%, etanol al 0,3 a 0,5%, FAEOS (sulfato de éter de alcohol graso) al 4 a 7%, tensioactivos no iónicos al 24 a 28%, ácido bórico al 1%, citrato de sodio (dihidrato) al 1 a 2%, bicarbonato sódico al 2 a 4%, ácido graso de coco al 14 a 16%, HEDP (1-hidroxietano-(1,1-ácido difosfónico)) al 0,5%, PVP (polivinilpirrolidona) al 0 a 0,4%, abrillantadores ópticos al 0 a 0,05%, colorante al 0 a 0,001%, lo restante de agua desionizada. La proporción de dosificación del agente de lavado líquido está preferiblemente entre 4,5 y 6,0 gramos por litro de licor de lavado, por ejemplo 4,7, 4,9 o 5,9 gramos por litro de licor de lavado. El lavado se produce preferiblemente en un intervalo de pH entre pH 8 y pH 10,5, preferiblemente entre pH 8 y pH 9.

La composición detergente en polvo preferida para dicho sistema de lavado tiene la siguiente composición (todas las indicaciones en porcentaje en peso): alquilbencenosulfonato lineal (sal de sodio) al 10%, sulfato de alcohol graso C12 a C18 (sal de sodio) al 1,5%, alcohol graso C12 a C18 con 7 EO al 2,0%, carbonato de sodio al 20%, hidrógeno carbonato de sodio al 6,5%, disilicato de sodio amorfo al 4,0%, peroxohidrato de carbonato de sodio al 17%, TAED al 4,0%, poliacrilato al 3,0%, carboximetilcelulosa al 1,0%, fosfonato al 1,0% y sulfato sódico al 25%; el

restante: opcionalmente inhibidores de espuma, abrillantadores ópticos, aromas y, en su caso, agua para hacer 100%. La proporción de dosificación del agente de lavado en polvo es preferiblemente entre 5,5 y 7,0 gramos por litro de licor de lavado, por ejemplo 5,6, 5,9 o 6,7 gramos por litro de licor de lavado. El lavado se produce preferiblemente en un intervalo de pH entre pH 9 y pH 11.

5 Se prefiere de acuerdo con la presente invención si se utiliza el agente de lavado líquido mencionado anteriormente, como se indica, para determinar el rendimiento de lavado mediante la prueba de lavado de referencia.

10 La blancura, es decir el abrillantado de las manchas, se determina como una indicación del rendimiento de lavado, preferiblemente usando métodos ópticos de medición, preferiblemente fotométricamente. Un dispositivo adecuado para esto es, por ejemplo, el espectrómetro Minolta CM508d. Los dispositivos utilizados para la medición se calibran usualmente utilizando un patrón blanco, preferiblemente un patrón blanco provisto con la unidad.

15 La enzima o enzimas de las composiciones detergentes de la invención, especialmente las variantes de proteasa descritas aquí, pueden estabilizarse usando agentes estabilizantes convencionales, por ejemplo, un poliol tal como propilenglicol o glicerol, una azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico, o un derivado de ácido bórico, por ejemplo, un éster de borato aromático, o un derivado de ácido fenilborónico tal como ácido 4-formilfenilborónico, y la composición puede formularse como se describe, por ejemplo, en los documentos WO92/19709 y WO92/19708
20 o las variantes de acuerdo con la invención pueden estabilizarse usando aldehídos o cetonas peptídicas tales como las descritas en los documentos WO2005/105826 y WO2009/118375.

Una composición detergente de acuerdo con la invención podría comprender además uno o más compuestos peroxi.

25 Tales compuestos peroxi presentes opcionalmente en las composiciones que pueden considerarse en particular son perácidos orgánicos o sales peracídicas de ácidos orgánicos, tales como ácido ftalimidopercaproico, ácido perbenzóico o sales de ácido diperdodecanodióico, peróxido de hidrógeno y sales inorgánicas que liberan peróxido de hidrógeno bajo las condiciones de lavado, tal como perborato, percarbonato y/o persilicato. El peróxido de hidrógeno también se puede producir aquí con la ayuda de un sistema enzimático, es decir, una oxidasa y su sustrato. Donde se vayan a utilizar compuestos peroxi sólidos, se pueden utilizar en forma de polvos o gránulos, que también pueden encapsularse en principio de manera conocida. Se prefieren particularmente percarbonato de metal alcalino, perborato de metal alcalino monohidrato, perborato de metal alcalino tetrahidrato o peróxido de hidrógeno en forma de soluciones acuosas que contienen de 3% en peso a 10% en peso de peróxido de hidrógeno. Los compuestos peroxi están preferiblemente presentes en agentes de lavado o de limpieza de acuerdo con la invención en cantidades de hasta 50% en peso, en particular de 5% en peso a 30% en peso.

35 Además de la variante de proteasa que se va a usar de acuerdo con la invención, las composiciones detergentes de acuerdo con la invención, que pueden tomar en particular la forma de sólidos pulverulentos, partículas postcomprimidas, soluciones o suspensiones homogéneas, pueden contener en principio cualquier ingrediente conocido y convencionales en tales composiciones. Las composiciones de acuerdo con la invención pueden
40 contener en particular sustancias aditivas, tensioactivos de superficie activa, disolventes orgánicos inmiscibles en agua, enzimas, agentes secuestrantes, electrolitos, reguladores de pH, polímeros con efectos específicos tales como polímeros de liberación de suciedad, inhibidores de transferencia de colorantes, inhibidores de agrisamiento, ingredientes activos poliméricos reductores de arrugas e ingredientes activos poliméricos que retienen la forma, y otras sustancias auxiliares, tales como abrillantadores ópticos, reguladores de espuma, activadores peroxi
45 adicionales, colorantes y aromas.

Además de los ingredientes anteriormente indicados, una composición de acuerdo con la invención puede contener principios activos antimicrobianos convencionales con el fin de potenciar la acción de desinfección, por ejemplo hacia microorganismos específicos. Tales aditivos antimicrobianos están preferiblemente presentes en los
50 desinfectantes de acuerdo con la invención en cantidades de hasta 10% en peso, en particular de 0,1% en peso a 5% en peso.

En una composición detergente de acuerdo con la invención, pueden usarse también activadores de blanqueo convencionales que forman ácidos peroxicarboxílicos o ácidos peroxiimídicos en condiciones de perhidrólisis y/o
55 complejos convencionales de metal de transición que activan el blanqueo. El componente activador de blanqueo opcionalmente presente en particular en cantidades de 0,5% en peso a 6% en peso comprende compuestos de Nor O-acilo utilizados convencionalmente, por ejemplo alquilendiaminas poliactiladas, en particular tetraacetiletildiamina, glicolurilos acilados, en particular tetraacetilglicolurilo, hidantoínas N-aciladas, hidrazidas, triazoles, urazoles, dicetopiperazinas, sulfurilamidas y cianuratos, además de anhídridos carboxílicos, en particular anhídrido ftálico, ésteres de ácidos carboxílicos, en particular isononanoilfenolsulfonato de sodio, y derivados de
60 azúcares acilados, en particular pentaacetilglucosa, junto con derivados de nitrilo catiónicos tales como sales de acetónitrilo de trimetilamonio. Con el fin de evitar la interacción con compuestos per durante el almacenamiento, los activadores de blanqueo pueden, de manera conocida, haberse recubierto con sustancias de envoltura o granulado, siendo particularmente preferidas la tetraacetiletildiamina granulada con la ayuda de carboximetilcelulosa y con un
65 tamaño de grano medio de 0,01 mm a 0,8 mm, 1,5-diacetil-2,4-dioxohexahidro-1,3,5-triazina granulada, y/o trialquilamonio acetónitrilo formulado en forma particulada. Tales activadores de blanqueo están preferiblemente

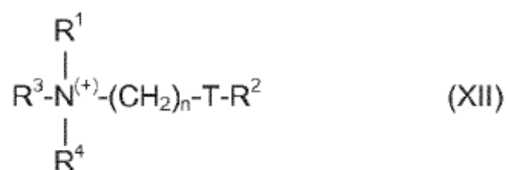
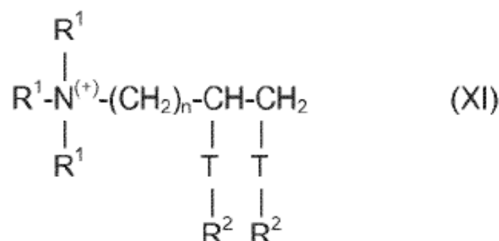
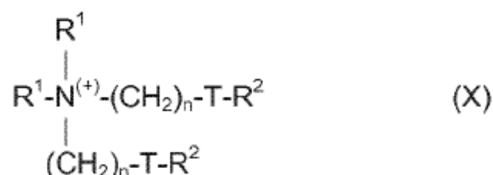
presentes en composiciones de lavado o limpieza en cantidades de hasta 8% en peso, en particular de 2% en peso a 6% en peso, en cada caso relativo a la composición completa.

5 Las composiciones de acuerdo con la invención pueden contener uno o más tensioactivos, siendo considerados, en particular, tensioactivos aniónicos, tensioactivos no iónicos y mezclas de los mismos, pero también posiblemente presentes tensioactivos catiónicos y/o anfóteros. Tensioactivos no iónicos adecuados son en particular glicósidos de alquilo y productos de etoxilación y/o propoxilación de alquil glicósidos o alcoholes lineales o ramificados que tienen en cada caso 12 a 18 átomos de carbono en la fracción alquilo y 3 a 20, preferiblemente 4 a 10 grupos alquil éter. Pueden además ser usados, productos de etoxilación y/o propoxilación correspondientes de N-alquilaminas, dioles vicinales, ésteres de ácidos grasos y amidas de ácidos grasos, que corresponden con respecto a la fracción alquilo a los derivados de alcohol de cadena larga indicados y de alquilfenoles que tienen de 5 a 12 átomos de carbono en el residuo de alquilo.

15 Tensioactivos aniónicos adecuados son en particular jabones y aquellos que contienen grupos sulfato o sulfonato con preferiblemente iones de metal alcalino como cationes. Los jabones utilizables son preferiblemente las sales de metales alcalinos de ácidos grasos saturados o insaturados con 12 a 18 átomos de carbono. Tales ácidos grasos también se pueden usar en forma neutralizada de forma incompleta. Los tensioactivos utilizables del tipo sulfato incluyen las sales de semiésteres de ácido sulfúrico de alcoholes grasos con 12 a 18 átomos de carbono y los productos de sulfatación de los tensioactivos no iónicos mencionados con un bajo grado de etoxilación. Los tensioactivos utilizables del tipo sulfonato incluyen alquilbencenosulfonatos lineales con 9 a 14 átomos de carbono en la fracción alquilo, alcanosulfonatos con 12 a 18 átomos de carbono y olefinasulfonatos con 12 a 18 átomos de carbono, que surgen de la reacción de monoolefinas correspondientes con trióxido de azufre y ésteres de ácido alfa-sulfograso que surgen de la sulfonación de ésteres metílicos o etílicos de ácidos grasos.

25 Tales tensioactivos están presentes en las composiciones de lavado de acuerdo con la invención en proporciones preferiblemente de 5% en peso a 50% en peso, en particular de 8% en peso a 30% en peso, mientras que los desinfectantes de acuerdo con la invención y las composiciones limpiadoras de acuerdo con la invención contienen preferiblemente 0,1% en peso a 20% en peso, en particular 0,2% en peso a 5% en peso de tensioactivos.

30 Las composiciones de acuerdo con la invención, en particular si son composiciones destinadas al tratamiento de textiles, pueden contener en particular una o más de las sustancias catiónicas, sustancias suavizantes de textiles de las fórmulas generales X, XI o XII como sustancias activas catiónicas con una acción suavizante de textiles:



35 en el que cada grupo R^1 se selecciona mutuamente, de manera independiente de entre grupos C_{1-6} alquilo, alqueno o hidroxialquilo; cada grupo R^2 se selecciona mutuamente de manera independiente de entre los grupos alquilo o alqueno C_{8-28} ; $R^3 = R^1$ o $(CH_2)_n-T-R^2$; $R^4 = R^1$ o R^2 o $(CH_2)_n-T-R^2$; $T = -CH_2-$, $-O-CO-$ o $-CO-O-$ y n es un número entero desde 0 a 5. Los tensioactivos catiónicos comprenden aniones convencionales de naturaleza y número requeridos para el equilibrado de carga, siendo posible seleccionar dichos aniones no sólo de, por ejemplo, haluros

40

sino también de tensioactivos aniónicos. En realizaciones preferidas de la presente invención, los tensioactivos catiónicos que se pueden usar son compuestos de hidroxialquiltrialquilamonio, en particular compuestos de alquil (hidroxietil) dimetilamonio C₁₂₋₁₈, y preferiblemente sus haluros, en particular cloruros. Una composición de acuerdo con la invención contiene preferiblemente 0,5% en peso a 25% en peso, en particular 1% en peso a 15% en peso de tensioactivo catiónico.

Una composición de acuerdo con la invención contiene preferiblemente al menos un aditivo orgánico y/o inorgánico soluble en agua y/o insoluble en agua. Las sustancias aditivas orgánicas solubles en agua incluyen ácidos policarboxílicos, en particular ácido cítrico y ácidos sacáricos, ácidos aminopolicarboxílicos monoméricos y poliméricos, en particular ácido metilglicínico, ácido nitrilotriacético y ácido etilendiaminotetraacético junto con ácido poliaspártico, ácidos polifosfónicos, en particular aminotris (ácido metileno fosfónico), ácido etilendiaminotetrakis (ácido metileno fosfónico) y ácido 1-hidroxietano-1, ácido 1-difosfónico, compuestos hidroxílicos poliméricos tales como dextrina y ácidos (poli)carboxílicos poliméricos, en particular policarboxilatos obtenibles oxidando polisacáridos o dextrinas y/o ácidos acrílicos poliméricos, ácidos metacrílicos, ácidos maleicos y copolímeros de los mismos, que también pueden contener pequeñas proporciones de sustancias polimerizables sin funcionalidad de ácido carboxílico. La masa molecular relativa de los homopolímeros de ácidos carboxílicos insaturados está en general entre 5.000 y 200.000, la de los copolímeros entre 2.000 y 200.000, preferentemente 50.000 a 120.000, en cada caso en relación con ácido libre. Un copolímero de ácido acrílico/ácido maleico particularmente preferido tiene una masa molecular relativa de 50.000 a 100.000. Compuestos adecuados, aunque menos preferidos, de esta clase son copolímeros de ácido acrílico o ácido metacrílico con éteres vinílicos, tales como vinilmetiléteres, ésteres vinílicos, etileno, propileno y estireno, cuya fracción ácida es al menos 50% en peso. Terpolímeros que contienen como monómeros dos ácidos insaturados y/o sus sales y, como tercer monómero, alcohol vinílico y/o un alcohol vinílico esterificado o un carbohidrato, también pueden usarse como sustancias aditivas orgánicas solubles en agua. El primer monómero ácido o la sal del mismo se deriva de un ácido carboxílico C₃-C₈ monoetilénicamente insaturado y preferiblemente de un ácido monocarboxílico C₃-C₄, en particular de ácido (met) acrílico. El segundo monómero ácido o la sal del mismo puede ser un derivado de un ácido dicarboxílico C₄-C₈, siendo el ácido maleico particularmente preferido, y/o un derivado de un ácido alilsulfónico que está sustituido en la posición 2 por un resto alquilo o arilo. Tales polímeros tienen generalmente una masa molecular relativa de entre 1.000 y 200.000. Otros copolímeros preferidos son aquellos que comprenden acroleína y ácido acrílico/sales de ácido acrílico o acetato de vinilo como monómeros. Las sustancias aditivas orgánicas pueden ser utilizadas, en particular para producir composiciones líquidas, en forma de soluciones acuosas, preferiblemente en forma de soluciones acuosas al 30 a 50% en peso. Todos los ácidos indicados se usan generalmente en forma de sales solubles en agua, en particular las sales de metales alcalinos de los mismos.

Tales sustancias orgánicas pueden estar presentes, si se desea, en cantidades de hasta 40% en peso, en particular de hasta 25% en peso y preferiblemente de 1% en peso a 8% en peso. Las cantidades cercanas al límite superior indicado se utilizan preferiblemente en composiciones pastosas o líquidas, en particular acuosas, de acuerdo con la invención.

Se pueden considerar, en particular, materiales aditivos inorgánicos solubles en agua que son fosfatos de metales alcalinos poliméricos, que pueden estar presentes en forma de sales de sodio o potasio alcalinas, neutras o ácidas de los mismos. Ejemplos son difosfato tetrasódico, dihidrógeno difosfato disódico, trifosfato pentasódico, "hexametafosfato de sodio" y las correspondientes sales de potasio o mezclas de sales de sodio y potasio. Los materiales aditivos inorgánicos insolubles en agua, dispersables en agua, que se utilizan son, en particular, aluminosilicatos de metales alcalinos cristalinos o amorfos, en cantidades de hasta 50% en peso, preferiblemente de no más de 40% en peso y, en composiciones líquidas, en particular desde 1% en peso a 5% en peso. Entre estos, se prefieren los aluminosilicatos de sodio cristalinos de calidad de la composición de lavado, en particular la zeolita A, P y opcionalmente X. Las cantidades cercanas al límite superior indicado se utilizan preferiblemente en composiciones sólidas de macropartículas. Los aluminosilicatos adecuados, en particular, no comprenden partículas con un tamaño de grano superior a 30 µm y consisten preferiblemente hasta cierto punto, de al menos 80% en peso de partículas con un tamaño inferior a 10 µm. Su capacidad de fijación de calcio, que puede determinarse como se indica en la patente alemana DE 24 12 837, está generalmente en el intervalo de 100 a 200 mg de CaO por gramo.

Sustitutos adecuados o sustitutos parciales del aluminosilicato indicado son silicatos de metales alcalinos cristalinos, que pueden estar presentes solos o mezclados con silicatos amorfos. Los silicatos de metales alcalinos utilizables como aditivos en las composiciones de acuerdo con la invención tienen preferiblemente una relación molar de óxido de metal alcalino a SiO₂ por debajo de 0,95, en particular de 1:1,1 a 1:12 y pueden estar en forma amorfa o cristalina. Los silicatos alcalinos preferidos son silicatos de sodio, en particular silicatos de sodio amorfos, con una proporción molar Na₂O:SiO₂ de 1:2 a 1:2,8. Los silicatos cristalinos preferentemente usados, que pueden estar presentes solos o mezclados con silicatos amorfos, son filosilicatos cristalinos de la fórmula general Na₂Si_xO_{2x+i} y H₂O, en la que x, el "módulo" es un número desde 1,9 a 4 e y es un número desde 0 a 20 y los valores preferidos para x son 2, 3 o 4. Los filosilicatos cristalinos preferidos son aquellos en los que x en la fórmula general indicada asume los valores 2 o 3. En particular, son preferidos tanto los disilicatos de β y δ-sodio (Na₂Si₂O₅ y H₂O). Los silicatos de metales alcalinos cristalinos virtualmente anhidros, producidos a partir de silicatos de metal alcalino amorfo, de la fórmula general anteriormente mencionada en la que x significa un número desde 1,9 a 2,1 también se pueden usar en composiciones de acuerdo con la invención. En una realización preferida adicional de las

composiciones de acuerdo con la invención se utiliza un filossilicato de sodio cristalino con un módulo de 2 a 3, tal como se puede producir a partir de arena y bicarbonato sódico. Los silicatos de sodio cristalinos con un módulo en el intervalo desde 1,9 a 3,5 se usan en una realización preferida adicional de composiciones de acuerdo con la invención. En un desarrollo preferido de las composiciones de acuerdo con la invención, se utiliza un compuesto granular de silicato de metal alcalino y carbonato de metal alcalino, por ejemplo como el disponible comercialmente bajo el nombre de Nabion® 15. Si el aluminosilicato de metal alcalino, en particular la zeolita, está presente como una sustancia aditiva adicional, la proporción en peso de aluminosilicato a silicato, en cada caso en relación con sustancias activas anhidras, asciende preferiblemente a 1:10 a 10:1. En composiciones que contienen tanto silicatos de metal alcalino amorfos como cristalinos, la proporción en peso de silicato de metal alcalino amorfo a silicato de metal alcalino cristalino asciende preferiblemente a 1:2 a 2:1 y en particular a 1:1 a 2:1.

Las sustancias aditivas están presentes en las composiciones de lavado o de limpieza de acuerdo con la invención, preferiblemente en cantidades de hasta 60% en peso, en particular de 5% en peso a 40% en peso.

En un desarrollo preferido de la invención, una composición de acuerdo con la invención comprende un "bloque constructor" soluble en agua. El uso del término "bloque constructor" pretende indicar que la composición no contiene otras sustancias aditivas como tales que sean solubles en agua, es decir, todas las sustancias aditivas presentes en la composición se combinan en el "bloque" caracterizado de esta manera, haciendo una excepción, sin embargo, para las cantidades de sustancias que pueden estar presentes, como es convencional en el comercio, en pequeñas cantidades como contaminantes o aditivos estabilizantes en los otros ingredientes de las composiciones. El término "soluble en agua" debe entenderse aquí como significando que, a la concentración que se obtiene bajo condiciones convencionales por la cantidad de entrada de la composición que la contiene, el bloque constructor se disuelve sin dejar residuos. Las composiciones de acuerdo con la invención contienen preferiblemente al menos 15% en peso y hasta 55% en peso, en particular 25% en peso a 50% en peso de bloque constructor soluble en agua. Este último se compone preferiblemente de los componentes

a) 5% en peso a 35% en peso de ácido cítrico, citrato de metal alcalino y/o carbonato de metal alcalino, que también puede sustituirse, al menos en parte, por carbonato de hidrógeno de metal alcalino,

b) hasta 10% en peso de silicato de metal alcalino con un módulo en el intervalo de 1,8 a 2,5,

c) hasta 2% en peso de ácido fosfónico y/o fosfonato de metal alcalino,

d) hasta 50% en peso de fosfato de metal alcalino, y

e) hasta el 10% en peso de policarboxilato polimérico,

las cantidades indicadas relativas a toda la composición de lavado o limpieza. A menos que se indique explícitamente otra cosa, esto también se aplica a todas las cantidades indicadas a continuación.

En una realización preferida de las composiciones de acuerdo con la invención, el bloque constructor soluble en agua contiene al menos 2 de los componentes b), c), d) y e) en cantidades superiores a 0% en peso.

Con respecto al componente a), en una realización preferida de las composiciones de acuerdo con la invención, 15% en peso a 25% en peso de carbonato de metal alcalino, que puede sustituirse al menos en parte por carbonato de hidrógeno de metal alcalino y hasta 5% en peso, en particular de 0,5% en peso a 2,5% en peso de ácido cítrico y/o citrato de metal alcalino. En una realización alternativa de las composiciones de acuerdo con la invención, de 5% en peso a 25% en peso, en particular de 5% en peso a 15% en peso de ácido cítrico y/o citrato de metal alcalino y hasta 5% en peso, en particular 1% en peso a 5% en peso de carbonato de metal alcalino, que puede sustituirse al menos en parte por carbonato de hidrógeno de metal alcalino, están presentes como componente a). Si están presentes tanto carbonato de metal alcalino como carbonato de hidrógeno de metal alcalino, el componente a) comprende preferiblemente carbonato de metal alcalino y carbonato de hidrógeno de metal alcalino en una proporción en peso de 10:1 a 1:1.

Con respecto al componente b), en una realización preferida de las composiciones de acuerdo con la invención, están presentes 1% en peso a 5% en peso de silicato de metal alcalino con un módulo en el intervalo de 1,8 a 2,5.

Con respecto al componente c), en una realización preferida de las composiciones de acuerdo con la invención están presentes 0,05% en peso a 1% en peso de ácido fosfónico y/o fosfonato de metal alcalino. También se entiende por ácidos fosfónicos los ácidos alquifosfónicos opcionalmente sustituidos, que pueden comprender también dos o más grupos de ácido fosfónico ("ácidos polifosfónicos"). Preferiblemente se seleccionan entre los ácidos hidroxilo y/o aminoalquifosfónicos y/o las sales de metales alcalinos de los mismos, como por ejemplo el ácido dimetilaminometano difosfónico, el ácido 3-aminopropil-1-hidroxi-1,1-difosfónico, el ácido 1-amino-1-fenilmetano difosfónico, el ácido 1-hidroxietano-1,1-difosfónico, aminotris (ácido metileno fosfónico), N,N,N',N'-etilendiamino-tetrakis-(ácido metileno fosfónico) y derivados acilados de ácido fosforoso, que también pueden ser utilizado en cualesquiera mezclas deseadas.

Con respecto al componente d), en una realización preferida de las composiciones de acuerdo con la invención, están presentes 15% en peso a 35% en peso de fosfato de metal alcalino, en particular polifosfato trisódico. "Fosfato de metal alcalino" es el nombre resumido de las sales de metales alcalinos (en particular sodio y potasio) de los diversos ácidos fosfóricos, siendo posible distinguir entre los ácidos metafosfóricos $(\text{HPO}_3)_n$ y ácido ortofosfórico H_3PO_4 , así como representantes de mayor peso molecular. Los fosfatos aquí combinan una serie de ventajas: actúan como donantes de alcalinidad, evitan depósitos de cal en las piezas de máquinas o incrustaciones de cal de tejidos y, además, contribuyen al rendimiento de limpieza. El dihidrógenofosfato de sodio, NaH_2PO_4 , existe como dihidrato (densidad $1,91 \text{ g cm}^{-3}$, punto de fusión 60°C) y como monohidrato (densidad $2,04 \text{ g cm}^{-3}$). Ambas sales son polvos blancos, muy fácilmente solubles en agua, que pierden su agua de cristalización cuando se calientan y a 200°C se convierten en difosfato débilmente ácido (hidrogenodifosfato disódico, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$) y a una temperatura superior en trimetafosfato de sodio ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$) y sal de Maddrell. NaH_2PO_4 exhibe una reacción ácida; se obtiene cuando el ácido fosfórico se ajusta con solución de hidróxido de sodio a un valor de pH de 4,5 y la suspensión se atomiza. El dihidrogenofosfato de potasio (fosfato de potasio primario o monobásico, difosfato de potasio, KDP), KH_2PO_4 , es una sal blanca con una densidad de $2,33 \text{ g cm}^{-3}$, tiene un punto de fusión de 253°C (descomposición con formación de $(\text{KPO}_3)_x$ polifosfato de potasio) y es fácilmente soluble en agua. El hidrogenofosfato disódico (fosfato de sodio secundario), Na_2HPO_4 , es una sal cristalina incolora, muy fácilmente soluble en agua. Existe en forma anhidra y con 2 mol (densidad $2,066 \text{ g cm}^{-3}$, pérdida de agua a 95°C), 7 mol (densidad $1,68 \text{ g cm}^{-3}$, punto de fusión 48°C con pérdida de $5 \text{ H}_2\text{O}$) y 12 mol de agua (densidad $1,52 \text{ g cm}^{-3}$, punto de fusión 35°C con pérdida de $5 \text{ H}_2\text{O}$), es anhidro a 100°C y cuando se calienta se transforma adicionalmente en el difosfato $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$. El hidrogenofosfato disódico se produce neutralizando el ácido fosfórico con solución de bicarbonato sódico usando fenoltaleína como indicador. El hidrogenofosfato dipotásico (fosfato de potasio secundario o dibásico), K_2HPO_4 , es una sal blanca amorfa, que es fácilmente soluble en agua. El fosfato trisódico, fosfato sódico terciario, Na_3PO_4 , son cristales incoloros, que tienen como dodecahidrato una densidad de $1,62 \text{ g cm}^{-3}$ y un punto de fusión de $73\text{-}76^\circ\text{C}$ (descomposición), como decahidrato (correspondiente al 19-20% de P_2O_5) un punto de fusión de 100°C y en forma anhidra (correspondiente a 39-40% de P_2O_5) una densidad de $2,536 \text{ g cm}^{-3}$. El fosfato trisódico es fácilmente soluble en agua con una reacción alcalina y se produce por evaporación de una solución de exactamente 1 mol de fosfato disódico y 1 mol de NaOH . El fosfato tripotásico (fosfato de potasio terciario o tribásico), K_3PO_4 , es un polvo granular blanco, deliquescente, con una densidad de $2,56 \text{ g cm}^{-3}$, tiene un punto de fusión de 1340°C y es fácilmente soluble en agua con una reacción alcalina. Surge, por ejemplo, cuando la escoria de Thomas se calienta con carbono y sulfato de potasio. A pesar de su precio relativamente alto, los fosfatos de potasio más fácilmente solubles y, por lo tanto, altamente eficaces a menudo se prefieren en la industria de la composición de limpieza, sobre los correspondientes compuestos de sodio. El difosfato de tetrasodio (pirofosfato de sodio), $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, existe en forma anhidra (densidad $2,534 \text{ g cm}^{-3}$, punto de fusión 988°C , también indicado como 880°C) y como decahidrato (densidad $1,815\text{-}1,836 \text{ g cm}^{-3}$, punto de fusión 94°C con pérdida de agua). Las sustancias sólidas comprenden cristales incoloros que son solubles en agua con una reacción alcalina. $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ se origina al calentar el fosfato disódico a $>200^\circ\text{C}$ o haciendo reaccionar ácido fosfórico con bicarbonato sódico en una proporción estequiométrica y deshidratando la solución por atomización. El decahidrato combina sales de metales pesados y sustancias que forman dureza y por lo tanto reduce la dureza del agua. El difosfato de potasio (pirofosfato de potasio), $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$, existe en forma de trihidrato y es un polvo incoloro e higroscópico con una densidad de $2,33 \text{ g cm}^{-3}$, que es soluble en agua, el valor del pH de la solución al 1% llega a 10,4 a 25°C . La condensación de NaH_2PO_4 o KH_2PO_4 da lugar a fosfatos de sodio y potasio de mayor peso molecular, en los que es posible distinguir entre los representantes cíclicos, los metafosfatos de sodio o potasio y los tipos de cadena, los polifosfatos de sodio o potasio. Estos últimos en particular tienen una gran variedad de nombres: fosfatos fundidos o térmicos, sal de Graham, sal de Kurrol y sal de Maddrell. Todos los fosfatos de sodio y potasio más altos se denominan conjuntamente fosfatos condensados. El trifosfato pentasódico de importancia técnica, $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (tripolifosfato de sodio), es una sal blanca, soluble en agua, no higroscópica, anhidra o cristalizada con $6 \text{ H}_2\text{O}$, de la fórmula general $\text{NaO}[\text{P}(\text{O})(\text{ONa})\text{O}]_n\text{Na}$ con $n=3$. A temperatura ambiente aproximadamente 17 g, a 60°C aproximadamente 20 g, a 100°C aproximadamente 32 g de la sal que no contiene agua de cristalización se disuelven en 100 g de agua; después de calentar la solución durante dos horas a 100°C , aproximadamente de ortofosfato al 8% y difosfato al 15% se obtienen por hidrólisis. Cuando se produce trifosfato pentasódico, el ácido fosfórico se hace reaccionar con solución de bicarbonato sódico o solución de hidróxido sódico en una proporción estequiométrica y la solución se deshidrata por atomización.

Al igual que con la sal de Graham y el difosfato sódico, el trifosfato pentasódico disuelve muchos compuestos metálicos insolubles (incluso jabones de cal, etc.). El trifosfato pentapotásico, $\text{K}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (tripolifosfato de potasio), está comercialmente disponible, por ejemplo, en forma de una solución al 50% en peso ($>23\% \text{ P}_2\text{O}_5$, $25\% \text{ K}_2\text{O}$). Los polifosfatos de potasio son ampliamente utilizados en la industria de la composición de lavado y limpieza. Existen también tripolifosfatos de potasio sódico, que también se pueden utilizar para los propósitos de la presente invención. Estos surgen, por ejemplo, si el trimetafosfato de sodio se hidroliza con KOH :



Pueden usarse de acuerdo con la invención exactamente del mismo modo que el tripolifosfato de sodio, el tripolifosfato de potasio o mezclas de estos dos; pueden usarse también mezclas de tripolifosfato de sodio y tripolifosfato de sodio y potasio o mezclas de tripolifosfato de potasio y tripolifosfato de sodio y potasio o mezclas de tripolifosfato de sodio y tripolifosfato de potasio y tripolifosfato de sodio y potasio.

Con respecto al componente e), en una realización preferida de las composiciones de acuerdo con la invención, están presentes 1,5 a 5% en peso de policarboxilato polimérico, en particular seleccionados de los productos de polimerización o copolimerización de ácido acrílico, ácido metacrílico y/o ácido maleico. Entre éstos, se prefieren los homopolímeros de ácido acrílico y, entre éstos, se prefieren particularmente aquellos con una masa molar media en el intervalo desde 5.000 D a 15.000 D (estándar PA).

En otra realización preferida, la composición detergente de acuerdo con la invención comprende una o más enzimas adicionales tales como una proteasa, una lipasa, cutinasa, amilasa, carbohidrasa, celulasa, pectinasa, mananasa, arabinasa, galactanasa, xilanasa, oxidasa, por ejemplo, una lacasa, y/o peroxidasa.

En general, las propiedades de la enzima o enzimas seleccionadas deben ser compatibles con el detergente seleccionado (es decir, el pH óptimo, la compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, etc.) y la enzima o enzimas deben estar presentes en cantidades efectivas.

Celulasas: celulasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificados químicamente o modificados con proteínas. Las celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, por ejemplo, las celulasas fúngicas producidas a partir de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* descritas en los documentos US 4,435,307, US 5,648,263, US 5,691,178, US 5,776,757 y WO 89/09259.

Las celulasas especialmente adecuadas son las celulasas alcalinas o neutras que tienen beneficios de cuidado del color. Ejemplos de tales celulasas son celulasas descritas en los documentos EP 0 495 257, EP 0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940. Otros ejemplos son variantes de celulasa tales como las descritas en los documentos WO 94/07998, EP 0 531 315, US 5,457,046, US 5,686,593, US 5,763,254, WO 95/24471, WO 98/12307 y PCT/DK98/00299.

Las celulasas comercialmente disponibles incluyen Celluzyme™, Carezyme™ (Novozymes A/S), Clazinase™ y Puradax HA™ (Genencor International Inc.) y KAC-500(B)™ (Kao Corporation).

Proteasas: La enzima adicional puede ser otra proteasa o variante de proteasa. La proteasa puede ser de origen animal, vegetal o microbiano, incluyendo mutantes modificados químicamente o genéticamente. Se prefiere el origen microbiano. Puede ser una proteasa alcalina, tal como una serina proteasa o una metaloproteasa. Una serina proteasa puede ser, por ejemplo, de la familia S1, tal como tripsina, o la familia S8, tal como subtilisina. Una proteasa metaloproteasas puede ser, por ejemplo, una termolisina a partir, por ejemplo, familia M4, M5, M7 o M8.

El término "subtilasas" se refiere a un subgrupo de serina proteasa de acuerdo con Siezen et al., *Protein Engng.* 4 (1991) 719-737 y Siezen et al. *Protein Science* 6 (1997) 501-523. Las serina proteasas son un subgrupo de proteasas caracterizado por tener una serina en el sitio activo, que forma un aducto covalente con el sustrato. Las subtilasas se pueden dividir en 6 subdivisiones, es decir, la familia de la Subtilisina, la familia Thermitasa, la familia de la proteinasa K, la familia peptidasa Lantibiotica, la familia Kexin y la familia Pirolisina. En un aspecto de la invención, la proteasa adicional puede ser una subtilasa, tal como una subtilisina o una variante de la misma.

Ejemplos de subtilisinas son las derivadas de *Bacillus* tales como subtilisina *lentus*, *Bacillus lentus*, subtilisina *Novo*, subtilisina *Carlsberg*, *Bacillus licheniformis*, subtilisina *BPN'*, subtilisina 309, subtilisina 147 y subtilisina 168 descritas en el documento WO 89/06279 y proteasa PD138 (documento WO 93/18140). Otros ejemplos de serina proteasa se describen en los documentos WO 98/020115, WO 01/44452, WO 01/58275, WO 01/58276, WO 03/006602 y WO 04/099401. Otros ejemplos de variantes de subtilasa pueden ser aquellos que tienen mutaciones en cualquiera de las posiciones: 3, 4, 9, 15, 27, 36, 68, 76, 87, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 106, 118, 120, 123, 128, 129, 130, 160, 167, 170, 194, 195, 199, 205, 217, 218, 222, 232, 235, 236, 245, 248, 252 y 274 utilizando la numeración *BPN'*. Más preferiblemente, las variantes de la subtilasa pueden comprender las mutaciones: S3T, V4I, S9R, A15T, K27R, *36D, V68A, N76D, N87S,R, *97E, A98S, S99G,D,A, S99AD, S101G,M,R S103A, V104I,Y,N, S106A, G118V,R, H120D,N, N123S, S128L, P129Q, S130A, G160D, Y167A, R170S, A194P, G195E, V199M, V205I, L217D, N218D, M222S, A232V, K235L, Q236H, Q245R, N252K, T274A (utilizando numeración *BPN'*). Otra proteasa preferida es la proteasa alcalina de *Bacillus lentus* DSM 5483, como se describe por ejemplo en WO 95/23221, y sus variantes que se describen en los documentos WO 92/21760, WO 95/23221, EP 1921147 y EP 1921148.

Ejemplos de proteasas de tipo tripsina son tripsina (por ejemplo de origen porcino o bovino) y la proteasa *Fusarium* descrita en los documentos WO 89/06279 y WO 94/25583. Ejemplos de proteasas útiles son las variantes descritas en los documentos WO 92/19729, WO 98/20115, WO 98/20116 y WO 98/34946, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 27, 36, 57, 76, 87, 97, 101, 104, 120, 123, 167, 170, 194, 206, 218, 222, 224, 235 y 274.

Ejemplos de metaloproteasas son la metaloproteasa neutra como se describe en el documento WO 07/044993.

Las enzimas de proteasa preferidas disponibles comercialmente Alcalase™, Coronase™, Duralase™, Durazym™, Esperase™, Everlase™, Kannase™, Liquanase™, Liquanase Ultra™, Ovozyme™, Polarzyme™, Primase™,

Relase™, Savinase™ y Savinase Ultra™, (Novozymes A/S), Axapem™ (Gist-Brocades N.V.), Excellase™, FN2™, FN3™, FN4™, Maxaca™, Maxapem™, Maxatase™, Properase™, Purafast™, Purafect™, Purafect OxP™, Purafect Prime™ y Puramax™ (DuPont/Genencor int.).

5 Lipasas y Cutinasas: Las lipasas y cutinasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificados químicamente o por ingeniería de proteínas. Ejemplos incluyen lipasa de Thermomyces, por ejemplo, de T. lanuginosus (anteriormente denominada Humicola lanuginosa) como se describe en los documentos EP 258 068 y EP 305 216, cutinasa de Humicola, por ejemplo, H. insolens como se describe en el documento WO 96/13580, una lipasa de Pseudomonas, por ejemplo de P. alcaligenes o P. pseudoalcaligenes (EP 218 272), P. cepacia (EP 331 376), P. stutzeri (GB 1,372,034), P. Fluorescens, Pseudomonas sp. cepa SD 705 (WO 95/06720 y WO 96/27002), P. wisconsinensis (WO 96/12012), una lipasa de Bacillus, por ejemplo, de B. subtilis (Dartois et al., 1993, Biochemica et Biophysica Acta, 1131: 253-360), B. stearothermophilus (JP 64/744992) o B. pumilus (WO 91/16422).

15 Otros ejemplos son variantes de lipasa tales como los descritos en los documentos WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407 225, EP 260 105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079, WO 97/07202, WO 00/060063, WO2007/087508 and WO 2009/109500.

20 Las enzimas lipasa preferidas disponibles comercialmente incluyen Lipolase™, Lipolase Ultra™, and Lipex™; Lecitase™, Lipolex™: Lipoclean™, Lipoprime™ (Novozymes A/S). Otras lipasas comercialmente disponibles incluyen Lumafast (Genencor Int Inc); Lipomax (Gist-Brocades/Genencor Int Inc) y lipasa de Bacillus sp de Solvay.

25 Amilasas: Las amilasas adecuadas (α y/o β) incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificados químicamente o por ingeniería de proteínas. Las amilasas incluyen, por ejemplo, α -amilasas obtenidas de Bacillus, por ejemplo, una cepa especial de Bacillus licheniformis, descrita con más detalle en GB 1,296,839.

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

30 Las amilasas comercialmente disponibles son Duramyl™, Termamy™, Fungamyl™ y BAN™ (Novozymes A/S), Rapidase™ y Purastar™ (de Genencor International Inc.).

35 Peroxidasas/Oxidasas: Las peroxidasas/oxidasas adecuadas incluyen aquellas de origen vegetal, bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificados químicamente o por ingeniería de proteínas. Ejemplos de peroxidasas útiles incluyen peroxidasas de Coprinus, por ejemplo, de C. cinereus, y variantes de las mismas como las descritas en los documentos WO 93/24618, WO 95/10602 y WO 98/15257.

40 Las peroxidasas comercialmente disponibles incluyen Guardzyme™ (Novozymes A/S).

45 La enzima o enzimas detergentes pueden incluirse en una composición detergente añadiendo aditivos separados que contienen una o más enzimas o añadiendo un aditivo combinado que comprende todas estas enzimas. Un aditivo detergente, es decir, un aditivo separado o un aditivo combinado, puede formularse, por ejemplo, como un granulado, líquido, suspensión, etc. Las formulaciones de aditivos detergentes preferidas son granulados, en particular granulados no espolvoreables, líquidos, en particular líquidos estabilizados o lechadas.

50 Pueden producirse granulados sin polvo, por ejemplo, como se describe en los documentos US 4,106,991 y 4,661,452 y opcionalmente pueden recubrirse por métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de materiales de recubrimiento cerosos son productos poli (óxido de etileno) (polietilenglicol, PEG) con pesos molares medios de 1000 a 20000; nonilfenoles etoxilados que tienen de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos etoxilados en los que el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y en los que hay de 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y mono y di y triglicéridos de ácidos grasos. Ejemplos de materiales de recubrimiento formadores de película adecuados para aplicación mediante técnicas de lecho fluido se dan en el documento GB 1483591. Las preparaciones enzimáticas líquidas pueden, por ejemplo, estabilizarse añadiendo un poliol tal como propilenglicol, azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico o ácido bórico de acuerdo con métodos establecidos. Las enzimas protegidas se pueden preparar de acuerdo con el método descrito en el documento EP 238,216.

60 En otra realización preferida de la invención, la composición contiene 5% en peso a 50% en peso, en particular 8-30% en peso de tensioactivo aniónico y/o no iónico, hasta 60% en peso, en particular 5-40% en peso de sustancia aditiva y 0,2% en peso a 2% en peso de enzima, seleccionada entre proteasas, lipasas, cutinasas, amilasas, pululanases, mananasas, celulasas, oxidasas y peroxidasas y mezclas de las mismas.

65 Los disolventes orgánicos que pueden utilizarse en las composiciones de acuerdo con la invención, en particular si están en forma líquida o pastosa, incluyen alcoholes con 1 a 4 átomos de carbono, en particular metanol, etanol, isopropanol y terbutanol, dioles con 2 a 4 átomos de carbono, en particular etilenglicol y propilenglicol, y mezclas de

los mismos y los éteres derivables de las clases de compuestos indicadas. Tales disolventes miscibles en agua están preferiblemente presentes en las composiciones de lavado de acuerdo con la invención en cantidades de no más de 30% en peso, en particular de 6% en peso a 20% en peso.

- 5 Con el fin de establecer un valor de pH deseado que no se obtiene automáticamente mezclando los componentes restantes, las composiciones de acuerdo con la invención pueden contener ácidos que sean compatibles con el sistema y sean compatibles con el medio ambiente, en particular ácido cítrico, ácido acético, ácido tartárico, ácido málico, ácido láctico, ácido glicólico, ácido succínico, ácido glutárico y/o ácido adípico, así como ácidos minerales, en particular ácido sulfúrico, o bases, en particular hidróxidos de amonio o de metal alcalino. Dichos reguladores del pH están presentes en las composiciones de acuerdo con la invención preferiblemente en una cantidad de no más de 20% en peso, en particular de 1,2% en peso a 17% en peso.

Los polímeros con una capacidad de desprendimiento de suciedad, que se conocen a menudo como ingredientes activos de "liberación de suciedad" o, debido a su capacidad para proporcionar un acabado repelente a la suciedad sobre la superficie tratada, por ejemplo la fibra, como "repelentes de suciedad", son por ejemplo derivados de celulosa no iónicos o catiónicos. Los polímeros con capacidad de desprendimiento de suciedad, en particular con respecto a los poliésteres, incluyen copoliésteres preparados a partir de ácidos dicarboxílicos, por ejemplo ácido adípico, ácido ftálico o ácido tereftálico, dioles, por ejemplo etilenglicol o propilenglicol y polidioles, por ejemplo polietilenglicol o polipropilenglicol. Los poliésteres con una capacidad de desprendimiento de suciedad que se utilizan preferiblemente incluyen aquellos compuestos que, en términos formales, pueden obtenerse esterificando dos fracciones monoméricas, siendo el primer monómero un ácido dicarboxílico HOOCPh-COOH y el segundo monómero un diol HO-(CHR¹¹)_aOH, que también puede estar presente como un diol polimérico H-(O-(CHR¹¹)_a)_bOH. Ph aquí significa un residuo o-, m- o p-fenileno que puede llevar de 1 a 4 sustituyentes seleccionados de residuos alquilo con 1 a 22 átomos de carbono, grupos ácido sulfónico, grupos carboxilo y mezclas de los mismos, R¹¹ significa hidrógeno, un residuo alquilo con 1 a 22 átomos de carbono y mezclas de los mismos, a significa un número de 2 a 6 y b un número de 1 a 300. Los poliésteres obtenibles a partir de los mismos contienen preferiblemente no sólo unidades monoméricas de diol -O-(CHR¹¹)_aO- sino también unidades poliméricas de diol -(O-(CHR¹¹)_a)_bO-. La proporción molar de unidades de monómero diol a unidades de polímero diol asciende preferiblemente a 100:1 a 1:100, en particular a 10:1 a 1:10. En las unidades de polímero diol, el grado de polimerización b está preferiblemente en el intervalo desde 4 a 200, en particular desde 12 a 140. El peso molecular o el peso molecular medio o el máximo de la distribución del peso molecular de los poliésteres preferidos con una capacidad de desprendimiento de suelo se encuentra en el intervalo desde 250 a 100.000, en particular de 500 a 50.000. El ácido sobre el que se basa el residuo Ph se selecciona preferiblemente entre ácido tereftálico, ácido isoftálico, ácido ftálico, ácido trimelítico, ácido melítico, los isómeros de ácido sulfóftálico, ácido sulfoisoftálico y ácido sulfotereftálico y mezclas de los mismos. Cuando los grupos ácidos de los mismos no forman parte del enlace éster en el polímero, están preferiblemente presentes en forma de sal, en particular como una sal de metal alcalino o de amonio. Entre éstas, son particularmente preferidas las sales de sodio y potasio. Si se desea, en lugar del monómero HOOC-Ph-COOH, el poliéster con una capacidad de desprendimiento de suciedad puede contener pequeñas proporciones, en particular no más del 10% en moles con respecto a la proporción de Ph con el significado anteriormente indicado, de otros ácidos que comprenden al menos dos grupos carboxilo. Estos incluyen, por ejemplo, ácidos dicarboxílicos alquilenos y alquilenos tales como ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido glutárico, ácido adípico, ácido pimélico, ácido subérico, ácido azelaico y ácido sebáico. Los dioles preferidos HO-(CHR¹¹)_aOH incluyen aquellos en los que R¹¹ es hidrógeno y a es un número de 2 a 6, y aquellos en los que a tiene el valor 2 y R¹¹ se selecciona de hidrógeno y residuos de alquilo con 1 a 10, en particular 1 a 3 átomos de carbono. Entre los dioles mencionados en último lugar, son particularmente preferidos los de la fórmula HO-CH₂-CHR¹¹-OH, en la que R¹¹ tiene el significado indicado anteriormente. Ejemplos de componentes de diol son etilenglicol, 1,2-propilenglicol, 1,3-propilenglicol, 1,4-butanodiol, 1,5-pentanodiol, 1,6-hexanodiol, 1,8-octanodiol, 1,2-decanodiol, 1,2-dodecanodiol y neopentilglicol. Entre los dioles poliméricos, se prefiere particularmente el polietilenglicol con una masa molar media en el intervalo desde 1000 a 6000. Si se desea, estos poliésteres pueden estar también terminados en grupos terminales, con grupos terminales que pueden considerarse grupos alquilo con 1 a 22 átomos de carbono y ésteres de ácidos monocarboxílicos. Los grupos terminales unidos mediante enlaces éster pueden tener como base ácidos monocarboxílicos alquil, alqueno y aril con 5 a 32 átomos de carbono, en particular 5 a 18 átomos de carbono. Éstos incluyen ácido valérico, ácido caprónico, ácido enántico, ácido caprílico, ácido pelargónico, ácido cáprico, ácido undecanóico, ácido undecenóico, ácido láurico, ácido laurólico, ácido tridecanóico, ácido mirístico, ácido miristoléico, ácido pentadecanóico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido petroselinico, ácido petroselaídico, ácido oléico, ácido linoléico, ácido linolaídico, ácido linolénico, ácido eleosteárico, ácido araquídico, ácido gadoléico, ácido araquidónico, ácido behénico, ácido erúxico, ácido brassídico, ácido clupanodónico, ácido lignocérico, ácido cerótico, ácido melésico, ácido benzóico, que puede llevar de 1 a 5 sustituyentes que tienen un total de hasta 25 átomos de carbono, en particular de 1 a 12 átomos de carbono, por ejemplo ácido terc.-butilbenzóico. Los grupos terminales también pueden tener como base ácidos hidroximonocarboxílicos con 5 a 22 átomos de carbono, que incluyen, por ejemplo, ácido hidroxivalérico, ácido hidroxicaproico, ácido ricinoléico, su producto de hidrogenación, ácido hidroxisteárico y ácido o-, m- y p-hidroxibenzóico. Los ácidos hidroximonocarboxílicos pueden a su vez estar unidos entre sí a través de su grupo hidroxilo y su grupo carboxilo y así estar presentes repetidamente en un grupo terminal. El número de unidades de ácido hidroximonocarboxílico por grupo final, es decir, su grado de oligomerización, está preferiblemente en el intervalo desde 1 a 50, en particular desde 1 a 10. En un desarrollo preferido de la invención, los polímeros de

tereftalato de etileno y tereftalato de óxido de polietileno, en los que las unidades de polietilenglicol tienen pesos molares de 750 a 5000 y la proporción molar de tereftalato de etileno a tereftalato de óxido de polietileno asciende a 50:50 a 90:10, se utilizan solos o en combinación con derivados de celulosa.

5 Los inhibidores de transferencia de colorantes que se pueden considerar para uso en composiciones según la invención para lavar textiles incluyen en particular polivinilpirrolidonas, polivinilimidazoles, N-óxidos poliméricos tales como poli (vinilpiridina N-óxido) y copolímeros de vinilpirrolidona con vinilimidazol y opcionalmente más monómeros.

10 Las composiciones de acuerdo con la invención para uso en el lavado de textiles pueden contener composiciones antiarrugas ya que los tejidos textiles, en particular de rayón, lana, algodón y mezclas de los mismos, pueden tener tendencia a arrugarse, porque las fibras individuales son sensibles a doblarse, retorcerse, presionarse y aplastarse transversalmente a la dirección de la fibra. Éstos incluyen, por ejemplo, productos sintéticos con base en ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, amidas de ácidos grasos, ésteres de alquilol de ácidos grasos, alquilol amidas de ácidos grasos o alcoholes grasos, que han reaccionado generalmente con óxido de etileno o productos a base de lecitina o ésteres modificados de ácido fosfórico.

15 Los inhibidores de agrisamiento tienen la tarea de mantener la suciedad que ha sido disuelta lejos de la superficie dura y en particular de la fibra textil suspendida en el licor. Son adecuados para este fin coloides solubles en agua de naturaleza principalmente orgánica, por ejemplo almidón, tamaño, gelatina, sales de ácidos éter carboxílicos o ácidos éter sulfónicos de almidón o celulosa o sales de ésteres de ácido sulfúrico ácido, de celulosa o almidón. También son adecuadas para este propósito poliamidas solubles en agua que contienen grupos ácidos. Pueden utilizarse adicionalmente derivados de almidón distintos de los indicados anteriormente, por ejemplo almidones de aldehído. Se utilizan preferiblemente éteres de celulosa, tales como carboximetilcelulosa (sal de Na), metilcelulosa, hidroxialquilcelulosa y éteres mixtos, tales como metilhidroxietilcelulosa, metilhidroxipropilcelulosa, metilcarboximetilcelulosa y mezclas de los mismos, por ejemplo en cantidades del 0,1 al 5% en peso con relación a las composiciones.

20 Las composiciones de lavado pueden contener abrillantadores ópticos, entre estos en particular derivados del ácido diaminostilbeno disulfónico o sus sales de metales alcalinos. Compuestos adecuados son, por ejemplo, sales de ácido 2,2'-disulfónico de 4,4'-bis (2-anilino-4-morfolino-1,3,5-triazinil-6-amino) estilbeno o compuestos de estructura similar que, en lugar del grupo morfolino, llevan un grupo dietanolamino, un grupo metilamino, un grupo anilino o un grupo 2-metoxietilamino. Además, pueden estar presentes abrillantadores del tipo difenil-estirilol sustituido, por ejemplo las sales de metal alcalino de 4,4'-bis(2-sulfostiril)difenilo, 4,4'-bis(4-cloro-3-sulfostiril)difenilo o 4-(4-cloroestiril)-4'-(2-sulfostiril)difenilo. También se pueden usar mezclas de los abrillantadores ópticos anteriormente indicados.

30 Especialmente para uso en métodos de lavado a máquina o limpieza, puede ser ventajoso añadir inhibidores de espuma convencionales a las composiciones. Los inhibidores de espuma adecuados son, por ejemplo, jabones de origen natural o sintético, que comprenden una proporción elevada de ácidos grasos C₁₈-C₂₄. Los inhibidores de espuma no tensioactivos adecuados son, por ejemplo, organopolisiloxanos y mezclas de los mismos con sílice microfina, opcionalmente silanizada, así como parafinas, ceras, ceras microcristalinas y mezclas de las mismas con sílice silanizada o alquilenodiamidas bis-ácidos grasos. También se utilizan ventajosamente mezclas de diferentes inhibidores de espuma, por ejemplo mezclas de siliconas, parafinas o ceras. Los inhibidores de espuma, en particular los inhibidores de espuma que contienen silicona y/o parafina, se enlazan preferiblemente a una sustancia portadora granular que es soluble o dispersable en agua. Son particularmente preferidas las mezclas de parafinas y bistéariletlenodiamida.

35 Los ingredientes activos para evitar el deslustre de los objetos de plata o "inhibidores de la corrosión de la plata" pueden además utilizarse en las composiciones de acuerdo con la invención. Las composiciones anticorrosión de plata preferidas son disulfuros orgánicos, fenoles dihídricos, fenoles trihídricos, opcionalmente triazoles sustituidos con alquilo o aminoalquilo tales como benzotriazol y sales y/o complejos de cobalto, manganeso, titanio, zirconio, hafnio, vanadio o cerio, en los que los metales indicados están presentes en uno de los estados de oxidación II, III, IV, V o VI.

40 La variante de proteasa puede asumir la forma de polvo o gránulos, que también pueden estar opcionalmente recubiertos y/o coloreados y pueden contener materiales portadores convencionales y/o auxiliares de granulación. En el caso del uso en forma de gránulos, los gránulos pueden, si se desea, contener también sustancias activas adicionales.

45 En otra realización preferida de la invención, la composición detergente es un líquido o un sólido, preferiblemente un sólido que es un polvo o está en forma granular o es un comprimido. En otra realización preferida, la composición es una composición para máquinas lavaplatos, en particular para lavaplatos automático que está en forma de tableta.

50 La producción de composiciones sólidas de acuerdo con la invención no es problemática y puede proceder de una manera conocida en principio, por ejemplo mediante secado por pulverización o granulación, añadiéndose de manera opcional, eventualmente, cualquier compuesto peroxi e ingrediente activo reforzante de blanqueo. Las

composiciones de acuerdo con la invención con una densidad aparente elevada, en particular en el intervalo desde 650 g/l a 950 g/l, se pueden producir preferiblemente por un método que comprende una etapa de extrusión. Las composiciones de lavado o limpieza o desinfectantes de acuerdo con la invención en forma de soluciones acuosas o soluciones que contienen otros disolventes convencionales se producen de manera particular, ventajosamente, mezclando simplemente los ingredientes, que pueden introducirse en un mezclador automático sin disolvente o como solución.

Métodos y usos

La presente invención se refiere también al uso de una composición detergente como se describe aquí en un proceso de limpieza tal como lavado de ropa y/o limpieza de superficies duras. Especialmente, la presente invención está dirigida al uso de composiciones detergentes de acuerdo con la invención en el lavado de textiles y tejidos, tales como lavado de ropa en casa y lavado de ropa industrial.

Además, la invención se dirige también al uso de composiciones detergentes de acuerdo con la invención en la limpieza de superficies duras tales como lavado automático de platos (ADW), lavado de coches y limpieza de superficies industriales.

Las variantes de subtilisina de la presente invención se pueden añadir y convertirse así en un componente de una composición detergente. De este modo, un aspecto de la invención se refiere al uso de una variante de subtilisina, que comprende las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2, en la que X y Z se seleccionan entre los grupos que consisten en R, K y en la que la variante tiene al menos 90% de identidad con la SEQ ID NO: 2 o 4 en un proceso de limpieza tal como lavado de ropa y/o limpieza de superficies duras. Otro aspecto se refiere al uso de una composición detergente que comprende una variante de subtilisina que comprende las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z de la SEQ ID NO: 2, en la que X y Z se seleccionan entre los grupos que consisten en R, K, en la que la variante tiene una identidad de secuencia a la SEQ ID NO: 2 o 4 de al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95% de identidad, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, pero menos de 100%, de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 o 4 en el proceso de limpieza.

Una realización de la invención se refiere al uso de una variante de subtilisina, que comprende las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z de la SEQ ID NO: 2, en la que X y Z se seleccionan entre los grupos que consisten en R, K, y en la que la variante tiene por lo menos 90% de identidad con la SEQ ID NO: 2 o 4, tal como al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95% de identidad, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, pero menos del 100%, de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 o 4 en un proceso de limpieza tal como lavado de ropa y/o limpieza de superficies duras, en la que la variante ha incrementado el rendimiento de lavado con relación al original o relativo a una proteasa original que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero que no tiene las sustituciones en una o más de dichas posiciones cuando se prueba en el ejemplo 2, como se describe en "Material y Métodos" .

El proceso de limpieza o el proceso de cuidado del textil puede ser por ejemplo un proceso de lavado de ropa, un proceso de lavado de platos o limpieza de superficies duras tales como baldosas de baño, pisos, de mesa, drenajes, fregaderos y lavabos. Los procesos de lavado de ropa pueden ser, por ejemplo, lavado de ropa doméstico, pero también puede ser lavado de ropa industrial.

Además, la descripción se refiere a un procedimiento para el lavado de telas y/o prendas de vestir, donde el procedimiento comprende tratar telas con una solución de lavado que contiene una composición detergente de acuerdo con la invención. El proceso de limpieza o un proceso de tratamiento de textiles puede llevarse a cabo, por ejemplo, en un proceso de lavado a máquina o en un proceso de lavado manual. La solución de lavado puede ser, por ejemplo, una solución de lavado acuosa que contiene una composición detergente.

Los tejidos y/o prendas sujetas a un proceso de lavado, limpieza o cuidado textil de la presente invención pueden ser ropa lavable convencional, por ejemplo ropa doméstica. Preferiblemente, la mayor parte de la ropa son prendas de vestir y telas, incluyendo tejidos de punto, tejidos planos, mezclilla, no tejidos, fieltros, hilos y toallas. Las telas pueden ser a base de celulosa tales como celulósicos naturales, incluyendo algodón, linaza, lino, yute, ramio, sisal o coco o celulósicos hechos por el hombre (por ejemplo, originarios de pulpa de madera), incluyendo viscosa/rayón, ramio, fibras de acetato de celulosa (tricell), tencel o mezclas de los mismos. Los tejidos también pueden ser de base no celulósica tales como poliamidas naturales incluyendo lana, camello, cachemira, mohair, conejo y seda o polímero sintético tales como nailon, aramida, poliéster, acrílico, polipropileno y licra/elastano, o mezclas de los mismos así como mezcla de fibras con base de celulosa y con base que no es celulosa. Ejemplos de mezclas son mezclas de algodón y/o rayón/viscosa con uno o más materiales complementarios tales como lana, fibras sintéticas (por ejemplo, fibras de poliamida, fibras acrílicas, fibras de poliéster, fibras de alcohol polivinílico, fibras de cloruro de polivinilo, fibras de poliuretano, fibras de poliurea, fibras de aramida), y fibras que contienen celulosa (por ejemplo, rayón/viscosa, ramio, linaza, lino, yute, fibras de acetato de celulosa, tencel).

En los últimos años ha habido un creciente interés en la sustitución de componentes en detergentes, que se deriva de productos petroquímicos con componentes biológicos renovables tales como enzimas y polipéptidos sin comprometer el rendimiento de lavado.

5 La invención se refiere además al uso de variantes de proteasa y/o composiciones detergentes de la invención en procesos de eliminación de manchas proteínicas. Las manchas proteínicas pueden ser manchas tales como manchas de alimentos, por ejemplo, alimentos para bebés, sebo, cacao, huevo, sangre, leche, tinta, pasto o una combinación de los mismos.

10 Las composiciones detergentes típicas incluyen varios componentes además de las enzimas, estos componentes tienen diferentes efectos, algunos componentes como los tensioactivos disminuyen la tensión superficial en el detergente, lo que permite que la mancha que se está limpiando se levante y se disperse y luego se elimina, otros componentes como los sistemas de blanqueo eliminan el descolorado a menudo por oxidación y muchos blanqueadores también tienen fuertes propiedades bactericidas, y se usan para desinfectar y esterilizar. Aún otros componentes tales como aditivo y quelante suavizan, por ejemplo, el agua de lavado eliminando los iones metálicos del líquido.

En una realización particular, la invención se refiere al uso de una composición detergente de acuerdo con la invención, es decir, que comprende una variante de proteasa como se ha descrito anteriormente, en lavado de ropa o de platos, en el que dicha composición detergente comprende además al menos uno o más de los siguientes: un tensioactivo, un aditivo, un quelador o agente quelante, un sistema de blanqueo y/o un componente de blanqueo, en particular un tensioactivo, un aditivo, un quelador o agente quelante, un sistema de blanqueo y/o un componente de blanqueo como se ha descrito anteriormente. En otra realización de dicho uso, se reducen las cantidades de un tensioactivo, un aditivo, un quelador o agente quelante, un sistema de blanqueo y/o un componente de blanqueo, en comparación con la cantidad de un tensioactivo, un aditivo, un quelador o agente quelante, un sistema de blanqueo y/o un componente de blanqueo, utilizados sin la variante de proteasa añadida de la invención. Preferiblemente al menos un componente que es un tensioactivo, un aditivo, un quelador o agente quelante, un sistema de blanqueo y/o un componente de blanqueo, está presente en una cantidad que es 1% menos, tal como 2% menos, tal como 3% menos, tal como 4% menos, tal como 5% menos, tal como 6% menos, tal como 7% menos, tal como 8% menos, tal como 9% menos, tal como 10% menos, tal como 15% menos, tal como 20% menos, tal como 25% menos, tal como 30% menos, tal como 35% menos, tal como 40% menos, tal como 45% menos, tal como 50% menos que la cantidad del componente en el sistema sin la adición de la variante de proteasa de la invención, tal como una cantidad convencional de tal componente. En un aspecto, se usa una variante de proteasa de la invención en composiciones detergentes en las que dicha composición está libre de al menos un componente que es un tensioactivo, un aditivo, un quelador o agente quelante, un sistema de blanqueo y/o un componente de blanqueo, y/o polímero.

Método de lavado

40 Las composiciones detergentes de la presente invención son ideales para uso en aplicaciones de lavandería. Por consiguiente, la presente descripción incluye un método para lavar una tela. El método comprende las etapas de poner en contacto una tela a lavar con una solución de lavado de limpieza que comprende la composición detergente de acuerdo con la invención. La tela puede comprender cualquier tela capaz de ser lavada en condiciones normales de uso del consumidor. La solución preferiblemente tiene un pH desde aproximadamente 5,5 a aproximadamente 11,5. Las composiciones se pueden emplear a concentraciones desde aproximadamente 100 ppm, preferiblemente 500 ppm a aproximadamente 15,000 ppm en solución. Las temperaturas del agua varían típicamente desde aproximadamente 5°C a aproximadamente 95°C, incluyendo aproximadamente 10°C, aproximadamente 15°C, aproximadamente 20°C, aproximadamente 25°C, aproximadamente 30°C, aproximadamente 35°C, aproximadamente 40°C, aproximadamente 45°C, aproximadamente 50°C, aproximadamente 55°C, aproximadamente 60°C, aproximadamente 65°C, aproximadamente 70°C, aproximadamente 75°C, aproximadamente 80°C, aproximadamente 85°C y aproximadamente 90°C. La proporción de agua a tela es típicamente desde aproximadamente 1:1 a aproximadamente 30:1.

En realizaciones particulares, el método de lavado se lleva a cabo a un pH desde aproximadamente 5,0 a aproximadamente 11,5, o desde aproximadamente 6 a aproximadamente 10,5, aproximadamente 5 a aproximadamente 11, aproximadamente 5 a aproximadamente 10, aproximadamente 5 a aproximadamente 9, aproximadamente 5 a aproximadamente 8, aproximadamente 5 a aproximadamente 7, aproximadamente 5,5 a aproximadamente 11, aproximadamente 5,5 a aproximadamente 10, aproximadamente 5,5 a aproximadamente 9, aproximadamente 5,5 a aproximadamente 8, aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7, aproximadamente 6 a aproximadamente 11, aproximadamente 6 a aproximadamente 10, aproximadamente 6 a aproximadamente 9, aproximadamente 6 a aproximadamente 8, aproximadamente 6 a aproximadamente 7, aproximadamente 6,5 a aproximadamente 11, aproximadamente 6,5 a aproximadamente 10, aproximadamente 6,5 a aproximadamente 9, aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8, aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7, aproximadamente 7 a aproximadamente 11, aproximadamente 7 a aproximadamente 10, aproximadamente 7 a aproximadamente 9, o aproximadamente 7 a aproximadamente 8, aproximadamente 8 a aproximadamente 11, aproximadamente 8 a aproximadamente 10, aproximadamente 8 a aproximadamente 9, aproximadamente 9 a aproximadamente 11,

aproximadamente 9 a aproximadamente 10, aproximadamente 10 a aproximadamente 11, preferiblemente aproximadamente 5,5 a aproximadamente 11,5.

5 En realizaciones particulares, el método de lavado se lleva a cabo a un grado de dureza de aproximadamente 0°dH a aproximadamente 30°dH, tal como aproximadamente 1°dH, aproximadamente 2°dH, aproximadamente 3°dH, aproximadamente 4°dH, aproximadamente 5°dH, aproximadamente 6°dH, aproximadamente 7°dH, aproximadamente 8°dH, aproximadamente 9°dH, aproximadamente 10°dH, aproximadamente 11°dH, aproximadamente 12°dH, aproximadamente 13°dH, aproximadamente 14°dH, aproximadamente 15°dH, aproximadamente 16°dH, aproximadamente 17°dH, aproximadamente 18°dH, aproximadamente 19°dH, 10 aproximadamente 20°dH, aproximadamente 21°dH, aproximadamente 22°dH, aproximadamente 23°dH, aproximadamente 24°dH, aproximadamente 25°dH, aproximadamente 26°dH, aproximadamente 27°dH, aproximadamente 28°dH, aproximadamente 29°dH, aproximadamente 30°dH. Bajo condiciones de lavado típicas europeas, el grado de dureza es de aproximadamente 16°dH, bajo condiciones de lavado típicas de los Estados Unidos aproximadamente 6°dH, y bajo condiciones de lavado típicas de Asia, aproximadamente 3°dH.

15 La presente invención se refiere a un método para limpiar una tela, una vajilla o una superficie dura con una composición detergente que comprende una variante de proteasa de la invención.

20 Una realización preferida se refiere a un método de limpieza, comprendiendo dicho método las etapas de: poner en contacto un objeto con una composición de limpieza que comprende una variante de proteasa de la invención en condiciones adecuadas para limpiar dicho objeto. En una realización preferida, la composición limpiadora es una composición detergente y el proceso es un proceso de lavado de ropa o lavado de platos.

25 Otra realización más se refiere a un método para eliminar manchas de tela que comprende poner en contacto dicho tejido con una composición que comprende una proteasa de la invención en condiciones adecuadas para limpiar dicho objeto.

30 En una realización preferida, las composiciones para uso en los métodos anteriores comprenden además al menos una enzima adicional como se ha descrito anteriormente, tal como una enzima seleccionada del grupo de hidrolasas tales como proteasas, lipasas, cutinasas, carbohidrasas tales como amilasas, celulasas, hemicelulasas, xilanasas y pectinasa o una combinación de las mismas. En otra realización preferida las composiciones para uso en los métodos anteriores comprenden una cantidad reducida de al menos uno o más de los siguientes componentes: un tensoactivo, un aditivo, un quelador o agente quelante, un sistema de blanqueo y/o un componente de blanqueo, o un polímero.

35 También se contemplan composiciones y métodos de tratamiento de telas (por ejemplo, para desencolar un textil) usando una o más de la proteasa de la invención. La proteasa puede usarse en cualquier método de tratamiento de tela que sea bien conocido en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 6,077,316). Por ejemplo, en un aspecto, la sensación y el aspecto de un tejido se mejoran mediante un método que comprende 40 poner en contacto el tejido con una variante de proteasa de la invención en una solución. En un aspecto, la tela se trata con la solución bajo presión.

45 En una realización, la variante de proteasa se aplica durante o después del tejido de textiles, o durante la etapa de desencolado, o una o más etapas adicionales de procesamiento de telas. Durante el tejido de los textiles, los hilos están expuestos a una considerable deformación mecánica. Antes de tejer en telares mecánicos, los hilos de urdimbre se recubren a menudo con almidón de encolado o derivados de almidón con el fin de aumentar su resistencia a la tracción y evitar la rotura. La variante de proteasa se puede aplicar para eliminar estas proteínas de encolado o derivadas de proteína. Después de que los tejidos han sido tejidos, un tejido puede proceder a una etapa de desencolado. Esto puede ser seguido por una o más etapas de procesamiento de tejido adicionales. El desencolado es el acto de eliminar el tamaño de los textiles. Después de tejer, el recubrimiento de encolado debe ser eliminado antes de procesar la tela a fin de asegurar un resultado homogéneo y a prueba de lavado. También se proporciona un método de desencolado que comprende hidrólisis enzimática del encolado por la acción de una enzima.

55 Todos los asuntos, el tema y las realizaciones que se describen para las composiciones detergentes en esta solicitud son también aplicables para los métodos y usos descritos aquí. Por lo tanto, se hace referencia explícitamente a dicha descripción para los métodos y usos descritos aquí también.

60 Ejemplos

Materiales y métodos

Métodos generales de biología molecular:

65 A no ser que se mencione otra cosa, las manipulaciones y transformaciones del ADN se realizaron utilizando métodos estándar de biología molecular (Sambrook et al., 1989), Ausubel et al. (1995), Harwood y Cutting (1990).

Ensayo de proteasa:

1) Ensayo Suc-AAPF-pNA:

- 5 sustrato pNA: Suc-AAPF-pNA (Bachem L-1400).
 Temperatura: temperatura ambiente (25°C)
 Reguladores de ensayo: 100 mM de ácido succínico, 100 mM de HEPES, 100 mM de CHES, 100 mM de CABS,
 1mM de CaCl₂, 150mM de KCl, Triton X-100 al 0.01% ajustado a valores de pH 2.0, 3.0,
 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, y 11.0 con HCl o NaOH.

10 Se mezclaron 20 µl de proteasa (diluida en Triton X-100 al 0,01%) con 100 µl de regulador de ensayo. El ensayo se inició añadiendo 100 µl de sustrato de pNA (50 mg disueltos en 1,0 ml de DMSO y se diluyó adicionalmente 45 veces con Triton X-100 al 0,01%). El aumento en OD405 se monitorizó como una medida de la actividad de la proteasa.

15 2) Ensayo de Protazyme AK:

- Sustrato: comprimido de Protazyme AK (caseína entrecruzada y teñida; de Megazyme)
 Temperatura: 37°C (o establecida a otra temperatura de ensayo).
 20 Regulador de ensayo: 100 mM de ácido succínico, 100 mM de HEPES, 100 mM de CHES, 100 mM de CABS, 1mM de CaCl₂, 150mM de KCl, Triton X-100 al 0.01%, pH de 6,5 o pH de 7,0.

25 Se suspendió un comprimido de Protazyme AK en 2,0 ml de Triton X-100 al 0,01% mediante agitación suave. Se dispensaron 500 µl de esta suspensión y 500 µl de regulador de ensayo en un tubo de microcentrifuga y se colocaron sobre hielo. Se añadieron 20 µl de solución de proteasa (diluida en Triton X-100 al 0,01%) a la mezcla enfriada con hielo. El ensayo se inició transfiriendo el tubo a un termomezclador a 37°C y agitando a su velocidad más alta (1400 rpm). Después de 15 minutos, el tubo se puso de nuevo en el baño de hielo. Para eliminar el sustrato sin reaccionar, la mezcla se centrifugó en una centrifuga enfriada con hielo durante unos minutos y se transfirieron 30 200 µl de sobrenadante a una placa de microconcentración. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 650 nm. Se analizó en paralelo una muestra con 20 µl de Triton X-100 al 0,01% en lugar de solución de proteasa, y su valor se restó de la medición de la muestra de proteasa.

35 Ensayo de esfuerzo mecánico automático (AMSA) para lavado de ropa

Con el fin de evaluar el rendimiento de lavado en lavado de ropa se realizan experimentos, utilizando el ensayo de Esfuerzo Mecánico Automático (AMSA). Con el AMSA, se puede examinar el rendimiento de lavado de una gran cantidad de soluciones de detergentes enzimáticas de pequeño volumen. La placa AMSA tiene varias ranuras para soluciones de prueba y una tapa que aprieta firmemente la muestra de ropa, el textil que se va a lavar contra todas las aberturas de las ranuras. Durante el tiempo de lavado, la placa, las soluciones de prueba, el textil y la tapa se agitan vigorosamente para poner la solución de prueba en contacto con el material textil y aplicar tensión mecánica de forma regular y periódica oscilante. Para descripción adicional véase WO02/42740 especialmente el párrafo "Realizaciones de métodos especiales" en las páginas 23-24.

45 Los experimentos de lavado de ropa se llevan a cabo bajo las condiciones experimentales especificadas a continuación:

Dosificación de Detergente	5 g/L (detergente líquido) 2.5 g/L (detergente en polvo)
Volumen de la solución de prueba	160 micro L
pH	Tal cual
Tiempo de lavado	20 minutos
Temperatura	30°C
Dureza del agua	15°dH

50 Los detergentes modelo y los materiales de prueba fueron los siguientes:

	<p>6.0% de alquiletoxi sulfato de sodio (C-9-15, 2EO)</p> <p>3.0% de dodecil benceno sulfonato de sodio</p> <p>3.0% de tolueno sulfonato de sodio</p>
Detergente líquido modelo para lavar ropa	<p>2.0% de ácido oleico</p> <p>3.0% de etoxilato de alcohol primario (C12-15, 7EO)</p> <p>2.5% de etoxilato de alcohol primario (C12-15, 3EO)</p> <p>0.5% de Etanol</p> <p>2.0% de Monopropilenglicol</p> <p>4.0% de citrato trisódico 2H₂O</p> <p>0.4% de Trietanolamina</p> <p>100% de agua desionizada</p> <p>pH ajustado a 8,5 con NaOH</p>
Detergente modelo en polvo para lavar ropa	<p>32.3% de Deshidratado de citrato de sodio</p> <p>24.2% de Sodio-LAS</p> <p>32.2% de lauril sulfato de sodio</p> <p>6.4% de Neodol 25-7 (etoxilato de alcohol)</p>
	4.9% de sulfato de sodio
Material de prueba	<p>PC-S-37 (huevo entero sobre algodón/poliéster)</p> <p>PC-S-39 (huevo envejecido entero sobre algodón/poliéster)</p>

La dureza del agua se ajustó a 15°dH mediante la adición de CaCl₂, MgCl₂ y NaHCO₃ (Ca²⁺:Mg²⁺ = 4:1:7,5) al sistema de prueba. Después del lavado, los textiles se lavaron abundantemente en agua del grifo y se secaron.

5 El rendimiento de lavado se mide como el brillo del color del textil lavado. El brillo también puede expresarse como la intensidad de la luz reflejada de la muestra cuando se ilumina con luz blanca. Cuando la muestra está manchada, la intensidad de la luz reflejada es menor que la de una muestra limpia. Por lo tanto, la intensidad de la luz reflejada puede usarse para medir el rendimiento de lavado.

10 Las mediciones de color se realizan con un escáner de cama plana profesional (Kodak iQsmart, Kodak, Midtager 29, DK-2605 Brøndby, Dinamarca), que se utiliza para capturar una imagen del textil lavado.

15 Para extraer un valor para la intensidad de luz de las imágenes escaneadas, los valores de píxeles de 24 bits de la imagen se convierten en valores para rojo, verde y azul (RGB). El valor de intensidad (Int) se calcula sumando los valores RGB juntos como vectores y luego tomando la longitud del vector resultante:

$$Int = \sqrt{r^2 + g^2 + b^2}$$

20 Ejemplo 1: Preparación y pruebas de variantes de proteasa

Preparación y expresión de variantes

25 Mutación e introducción de un casete de expresión en *Bacillus subtilis*.

Todas las manipulaciones de ADN se realizaron por PCR (por ejemplo, Sambrook et al.; Molecular Cloning; Cold Spring Harbor Laboratory Press) y pueden repetirse por todos los experimentados en la técnica.

Se utilizaron estructuras de *B. subtilis* recombinantes que codificaban variantes de proteasa para inocular un matraz de agitación que contenían un medio rico (por ejemplo PS-1:100 g/L de sacarosa (Danisco no. de catálogo 109-0429), 40 g/L de corteza de soja (harina de semilla de soja), 10g/L Na₂HPO₄.12H₂O (Merck no. de catálogo 6579), 0,1 ml/L de Pluronic PE 6100 (BASF 102-3098)). El cultivo tarda típicamente 4 días a 30°C agitando con 220 rpm.

5 Fermentación de variantes

La fermentación se puede realizar por métodos bien conocidos en la técnica o como sigue. Una cepa de *B. subtilis* que albergaba el plásmido de expresión relevante se trazó en una placa de LB-agar con un antibiótico relevante (6 µg/ml de cloranfenicol) y se cultivó durante la noche a 37°C.

Las colonias se transfirieron a 100 ml de medio PS-1 suplementado con el antibiótico relevante en un matraz de agitación de 500 ml.

15 Las células y otro material no disuelto se retiraron del caldo de fermentación por centrifugación a 4500 rpm durante 20-25 minutos. Después el sobrenadante se filtró para obtener una solución transparente.

Ejemplo 2: Pruebas de las variantes de subtilisina

20 El rendimiento de lavado de las variantes de proteasa con respecto a BPN' (SEQ ID NO: 2) con la mutación Y217L se probaron en un polvo y un detergente modelo líquido a una temperatura de 30°C usando el método AMSA como se describe en "Material y Métodos".

Resultados:

25 El rendimiento de lavado relativo de las variantes de proteasa y su correspondiente proteasa original (SEQ ID NO: 2) con el Y217L para dos manchas PC-S-37 (huevo entero sobre algodón/poliéster) y PC-S-39 (huevo envejecido entero algodón/poliéster) se muestran en la Tabla 2.1 a continuación.

30 Tabla 2.1 datos AMSA

Mancha	PC-S-37		PC-S-39
	Det 5	PDET 2	PDET 2
Y217L	100%	100%	100%
Y217E	109%	283%	133%
Y217D	438%	700%	267%
Y217R	120%	436%	144%
N218E	648%	200%	630%
N218D	335%	432%	170%
N218S	631%	-	830%
N218T	352%	308%	520%
Y217E N218D	949%	693%	1348%
Y217E N218E	792%	731%	1754%
Y217K N218K	582%	1001%	160%
Y217R N218R	698%	634%	200%
Y217R N218K	569%	912%	144%
Y217K N218R	655%	859%	-
Y217E N218S	448%	660%	827%
Y217E N218T	137%	511%	-
Y217D N218S	796%	732%	2069%
Y217D N218R	10%	318%	213%
Y217E N218K	2%	148%	8%

Los resultados muestran que una carga positiva en la posición 217 o 218, que puede ser proporcionada por el residuo R o K, aumenta el rendimiento comparado con una variante sin carga en una de estas posiciones, es decir, Y217L.

5 Además, una carga positiva en la posición 217 o 218 proporcionada por los residuos K o R, aumenta el rendimiento. Este efecto podría potenciarse mediante dos cargas positivas en la posición 217 y 218, respectivamente, es decir, Y217R+N218R, Y217K+N218R y Y217R+N218K tienen un rendimiento aumentado en comparación con variantes con una sola carga, por ejemplo, Y217R.

10 Las variantes con dos cargas positivas en las posiciones 217 y 218 eran mejores que las variantes que combinaban una carga negativa con una positiva (Y217D+N218R, Y217E+N218K).

A partir de estos resultados es evidente que las composiciones detergentes de acuerdo con la invención, es decir, que comprenden variantes como las descritas, son ventajosas.

15

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <110> Henkel AG & Co. KGaA
- <120> Composiciones detergentes que comprenden variantes de subtilasa
- <130> PT031293PCT
- 25 <150> EP12155909.0
- <151> 2012-02-17
- <160> 4
- 30 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- 35 <211> 1149
- <212> ADN
- <213> Bacillus amyloliquefaciens
- 40 <220>
- <221> CDS
- 45 <222> (1)..(1146)
- <220>
- <221> péptido sig
- 50 <222> (1)..(90)
- <220>
- 55 <221> péptido mat
- <222> (322)..(1146)
- 60 <400> 1

ES 2 635 631 T3

atg aga ggc	aaa aaa gta tgg atc	agt ttg ctg ttt gct tta gcg tta	48
Met Arg Gly	Lys Lys Val Trp Ile	Ser Leu Leu Phe Ala Leu Ala Leu	
-105	-100	-95	
atc ttt acg atg gcg ttc ggc agc aca tcc tct gcc cag gcg gca ggg	96		
Ile Phe Thr Met Ala Phe Gly Ser Thr Ser Ser Ala Gln Ala Ala Gly			
-90	-85	-80	
aaa tca aac ggg gaa aag aaa tat att gtc ggg ttt aaa cag aca atg	144		
Lys Ser Asn Gly Glu Lys Lys Tyr Ile Val Gly Phe Lys Gln Thr Met			
-75	-70	-65	-60
agc acg atg agc gcc gct aag aag aaa gat gtc att tct gaa aaa ggc	192		
Ser Thr Met Ser Ala Ala Lys Lys Lys Asp Val Ile Ser Glu Lys Gly			
-55	-50	-45	
ggg aaa gtg caa aag caa ttc aaa tat gta gac gca gct tca gct aca	240		
Gly Lys Val Gln Lys Gln Phe Lys Tyr Val Asp Ala Ala Ser Ala Thr			
-40	-35	-30	
tta aac gaa aaa gct gta aaa gaa ttg aaa aaa gac ccg agc gtc gct	288		
Leu Asn Glu Lys Ala Val Lys Glu Leu Lys Lys Asp Pro Ser Val Ala			
-25	-20	-15	
tac gtt gaa gaa gat cac gta gca cat gcg tac gcg cag tcc gtg cct	336		
Tyr Val Glu Glu Asp His Val Ala His Ala Tyr Ala Gln Ser Val Pro			
-10	-5	-1 1	5
tac ggc gta tca caa att aaa gcc cct gct ctg cac tct caa ggc tac	384		

ES 2 635 631 T3

Tyr	Gly	Val	Ser	Gln	Ile	Lys	Ala	Pro	Ala	Leu	His	Ser	Gln	Gly	Tyr		
				10					15					20			
act	gga	tca	aat	ggt	aaa	gta	gcg	ggt	atc	gac	agc	ggt	atc	gat	tct	432	
Thr	Gly	Ser	Asn	Val	Lys	Val	Ala	Val	Ile	Asp	Ser	Gly	Ile	Asp	Ser		
			25					30					35				
tct	cat	cct	gat	tta	aag	gta	gca	ggc	gga	gcc	agc	atg	ggt	cct	tct	480	
Ser	His	Pro	Asp	Leu	Lys	Val	Ala	Gly	Gly	Ala	Ser	Met	Val	Pro	Ser		
		40					45					50					
gaa	aca	aat	cct	ttc	caa	gac	aac	aac	tct	cac	gga	act	cac	ggt	gcc	528	
Glu	Thr	Asn	Pro	Phe	Gln	Asp	Asn	Asn	Ser	His	Gly	Thr	His	Val	Ala		
	55					60					65						
ggc	aca	ggt	gcg	gct	ctt	aat	aac	tca	atc	ggt	gta	tta	ggc	ggt	gcg	576	
Gly	Thr	Val	Ala	Ala	Leu	Asn	Asn	Ser	Ile	Gly	Val	Leu	Gly	Val	Ala		
70					75					80					85		
cca	agc	gca	tca	ctt	tac	gct	gta	aaa	ggt	ctc	ggt	gct	gac	ggt	tcc	624	
Pro	Ser	Ala	Ser	Leu	Tyr	Ala	Val	Lys	Val	Leu	Gly	Ala	Asp	Gly	Ser		
				90					95					100			
ggc	caa	tac	agc	tgg	atc	att	aac	gga	atc	gag	tgg	gcg	atc	gca	aac	672	
Gly	Gln	Tyr	Ser	Trp	Ile	Ile	Asn	Gly	Ile	Glu	Trp	Ala	Ile	Ala	Asn		
			105					110					115				
aat	atg	gac	ggt	att	aac	atg	agc	ctc	ggc	gga	cct	tct	ggt	tct	gct	720	
Asn	Met	Asp	Val	Ile	Asn	Met	Ser	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Gly	Ser	Ala		
	120						125					130					
gct	tta	aaa	gcg	gca	ggt	gat	aaa	gcc	ggt	gca	tcc	ggc	gtc	gta	gtc	768	
Ala	Leu	Lys	Ala	Ala	Val	Asp	Lys	Ala	Val	Ala	Ser	Gly	Val	Val	Val		
	135					140					145						
ggt	gcg	gca	gcc	ggt	aac	gaa	ggc	act	tcc	ggc	agc	tca	agc	aca	gtg	816	
Val	Ala	Ala	Ala	Gly	Asn	Glu	Gly	Thr	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Thr	Val		
150					155					160					165		
ggc	tac	cct	ggt	aaa	tac	cct	tct	gtc	att	gca	gta	ggc	gct	ggt	gac	864	
Gly	Tyr	Pro	Gly	Lys	Tyr	Pro	Ser	Val	Ile	Ala	Val	Gly	Ala	Val	Asp		
				170					175					180			
agc	agc	aac	caa	aga	gca	tct	ttc	tca	agc	gta	gga	cct	gag	ctt	gat	912	
Ser	Ser	Asn	Gln	Arg	Ala	Ser	Phe	Ser	Ser	Val	Gly	Pro	Glu	Leu	Asp		
			185					190					195				
gtc	atg	gca	cct	ggc	gta	tct	atc	caa	agc	acg	ctt	cct	gga	aac	aaa	960	
Val	Met	Ala	Pro	Gly	Val	Ser	Ile	Gln	Ser	Thr	Leu	Pro	Gly	Asn	Lys		
		200					205					210					
tac	ggg	gcg	tac	aac	ggt	acg	tca	atg	gca	tct	ccg	cac	ggt	gcc	gga	1008	
Tyr	Gly	Ala	Tyr	Asn	Gly	Thr	Ser	Met	Ala	Ser	Pro	His	Val	Ala	Gly		
	215					220					225						
gcg	gct	gct	ttg	att	ctt	tct	aag	cac	ccg	aac	tgg	aca	aac	act	caa	1056	
Ala	Ala	Ala	Leu	Ile	Leu	Ser	Lys	His	Pro	Asn	Trp	Thr	Asn	Thr	Gln		
230					235					240					245		
gtc	cgc	agc	agt	tta	gaa	aac	acc	act	aca	aaa	ctt	ggt	gat	tct	ttc	1104	
Val	Arg	Ser	Ser	Leu	Glu	Asn	Thr	Thr	Thr	Lys	Leu	Gly	Asp	Ser	Phe		
				250					255					260			
tac	tat	gga	aaa	ggg	ctg	atc	aac	gta	cag	gcg	gca	gct	cag	taa		1149	
Tyr	Tyr	Gly	Lys	Gly	Leu	Ile	Asn	Val	Gln	Ala	Ala	Ala	Gln				
			265					270					275				

<210> 2

<211> 382

5 <212> PRT

<213> *Bacillus amyloliquefaciens*

<400> 2

ES 2 635 631 T3

Met Arg Gly Lys Lys Val Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Ala Leu
 -105 -100 -95

Ile Phe Thr Met Ala Phe Gly Ser Thr Ser Ser Ala Gln Ala Ala Gly
 -90 -85 -80

Lys Ser Asn Gly Glu Lys Lys Tyr Ile Val Gly Phe Lys Gln Thr Met
 -75 -70 -65 -60

Ser Thr Met Ser Ala Ala Lys Lys Lys Asp Val Ile Ser Glu Lys Gly
 -55 -50 -45

Gly Lys Val Gln Lys Gln Phe Lys Tyr Val Asp Ala Ala Ser Ala Thr
 -40 -35 -30

Leu Asn Glu Lys Ala Val Lys Glu Leu Lys Lys Asp Pro Ser Val Ala
 -25 -20 -15

Tyr Val Glu Glu Asp His Val Ala His Ala Tyr Ala Gln Ser Val Pro
 -10 -5 -1 1 5

Tyr Gly Val Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu His Ser Gln Gly Tyr
 10 15 20

Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp Ser Gly Ile Asp Ser
 25 30 35

Ser His Pro Asp Leu Lys Val Ala Gly Gly Ala Ser Met Val Pro Ser
 40 45 50

Glu Thr Asn Pro Phe Gln Asp Asn Asn Ser His Gly Thr His Val Ala
 55 60 65

Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly Val Ala
 70 75 80 85

Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala Asp Gly Ser
 90 95 100

ES 2 635 631 T3

Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu Trp Ala Ile Ala Asn
 105 110 115

Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro Ser Gly Ser Ala
 120 125 130

Ala Leu Lys Ala Ala Val Asp Lys Ala Val Ala Ser Gly Val Val Val
 135 140 145

Val Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Thr Ser Gly Ser Ser Ser Thr Val
 150 155 160 165

Gly Tyr Pro Gly Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala Val Gly Ala Val Asp
 170 175 180

Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly Pro Glu Leu Asp
 185 190 195

Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr Leu Pro Gly Asn Lys
 200 205 210

Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala Gly
 215 220 225

Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Trp Thr Asn Thr Gln
 230 235 240 245

Val Arg Ser Ser Leu Glu Asn Thr Thr Thr Lys Leu Gly Asp Ser Phe
 250 255 260

Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala Ala Ala Gln
 265 270 275

<210> 3

<211> 1143

5

<212> ADN

<213> Bacillus lentus

10

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1140)

15

<220>

<221> péptido sig

5 <222> (1)..(81)

<220>

<221> péptido mat

10 <222> (334)..(1140)

<400> 3

ES 2 635 631 T3

atg aag aaa ccg ttg ggg aaa att gtc gca agc acc gca cta ctc	45
Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu	
-110 -105 -100	
att tct gtt gct ttt agt tca tcg atc gca tcg gct gct gaa gaa gca	93
Ile Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ala Glu Glu Ala	
-95 -90 -85	
aaa gaa aaa tat tta att ggc ttt aat gag cag gaa gct gtc agt gag	141
Lys Glu Lys Tyr Leu Ile Gly Phe Asn Glu Gln Glu Ala Val Ser Glu	
-80 -75 -70 -65	
ttt gta gaa caa gta gag gca aat gac gag gtc gcc att ctc tct gag	189
Phe Val Glu Gln Val Glu Ala Asn Asp Glu Val Ala Ile Leu Ser Glu	
-60 -55 -50	
gaa gag gaa gtc gaa att gaa ttg ctt cat gaa ttt gaa acg att cct	237
Glu Glu Glu Val Glu Ile Glu Leu Leu His Glu Phe Glu Thr Ile Pro	
-45 -40 -35	
gtt tta tcc gtt gag tta agc cca gaa gat gtg gac gcg ctt gaa ctc	285
Val Leu Ser Val Glu Leu Ser Pro Glu Asp Val Asp Ala Leu Glu Leu	
-30 -25 -20	
gat cca gcg att tct tat att gaa gag gat gca gaa gta acg aca atg	333
Asp Pro Ala Ile Ser Tyr Ile Glu Glu Asp Ala Glu Val Thr Thr Met	
-15 -10 -5 -1	
gcg caa tcg gta cca tgg gga att agc cgt gtg caa gcc cca gct gcc	381
Ala Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala	
1 5 10 15	
cat aac cgt gga ttg aca ggt tct ggt gta aaa gtt gct gtc ctc gat	429
His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp	
20 25 30	
aca ggg ata tcc act cat cca gat cta aat att cgt ggt ggc gca agc	477
Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser	
35 40 45	
ttt gta cca ggg gaa ccg tcg act caa gat ggg aat ggg cat ggc acg	525
Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr	
50 55 60	
cat gtg gcc ggg acg atc gct gct tta aac aat tcg att ggc gtt ctt	573
His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu	
65 70 75 80	
ggc gta gct cct agc gct gag cta tac gct gtt aaa gtc cta ggg gcg	621
Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala	
85 90 95	
agc ggt tca ggt tcg gtc agc tcg att gcc caa gga ttg gaa tgg gca	669
Ser Gly Ser Gly Ser Val Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala	
100 105 110	
ggg aac aat ggc atg cac gtt gct aat ttg agt tta gga agc cct tcg	717
Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser	
115 120 125	
cca agt gcc aca ctc gag caa gct gtt aat agc gcg act tct aga ggc	765
Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly	

ES 2 635 631 T3

130	135	140	
gtt ctt gtt gta gcg gca tct ggg aat tca ggt gca ggc tca atc agc			813
Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Ser Gly Ala Gly Ser Ile Ser			
145	150	155	160
tat ccg gcg cgc tat gcg aac gca atg gca gtc gga gct act gat caa			861
Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln			
	165	170	175
aac aac aac cgc gct agc ttt tca cag tat ggc gca ggc ctt gac att			909
Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile			
	180	185	190
gtc gca ccc ggg gta aac gtg cag agc aca tac cca ggt tca aca tat			957
Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr			
	195	200	205
gcc agc tta aac ggt aca tcg atg gct act cct cat gtt gca ggt gcg			1005
Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala			
	210	215	220
gcc gcc ctt gtt aaa caa aag aac cca tct tgg tct aat gta caa att			1053
Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile			
	225	230	235
cga aat cat cta aag aat acg gca act agt tta gga agc acg aac ttg			1101
Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu			
	245	250	255
tat gga agc gga ctt gtt aac gca gaa gcg gca acg cgt taa			1143
Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg			
	260	265	

<210> 4

5 <211> 380

<212> PRT

<213> Bacillus lentus

10

<400> 4

ES 2 635 631 T3

Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu
-110 -105 -100

Ile Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ala Glu Glu Ala
-95 -90 -85

Lys Glu Lys Tyr Leu Ile Gly Phe Asn Glu Gln Glu Ala Val Ser Glu
-80 -75 -70 -65

Phe Val Glu Gln Val Glu Ala Asn Asp Glu Val Ala Ile Leu Ser Glu
-60 -55 -50

Glu Glu Glu Val Glu Ile Glu Leu Leu His Glu Phe Glu Thr Ile Pro
-45 -40 -35

Val Leu Ser Val Glu Leu Ser Pro Glu Asp Val Asp Ala Leu Glu Leu

ES 2 635 631 T3

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

ES 2 635 631 T3

Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile
225 230 235 240

Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu
245 250 255

Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
260 265

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición detergente que comprende una variante de subtilisina que tiene actividad de proteasa, comprendiendo la variante las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z del polipéptido maduro codificado por la SEQ ID NO: 2, en la que X y Z se seleccionan del grupo que consiste en R o K, en el que la variante tiene al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, o al menos el 99%, pero menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO : 2 o 4.
- 10 2. La composición detergente de acuerdo con la reivindicación 1, en la que en la variante, X y Z son el mismo aminoácido.
3. La composición detergente de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que la variante consiste en 150 a 350, por ejemplo, 175 a 330, 200 a 310, 220 a 300, 240 a 290, 260 a 280, 270 a 275 aminoácidos.
- 15 4. La composición detergente de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el número de alteraciones en la variante es 1-20, por ejemplo, 1-10 y 1-5, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 alteraciones.
- 20 5. La composición detergente de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la variante comprende cualquiera de las sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en [Y217K+N218K], [Y217R+N218R], [Y217K+N218R], [Y217R+N218K].
- 25 6. La composición detergente de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la variante tiene un rendimiento de lavado mejorado en las manchas de huevo en comparación con el original o comparado con una proteasa con la SEQ ID NO: 2.
- 30 7. La composición detergente de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la composición es un líquido o un sólido, preferiblemente un sólido que es un polvo o está en forma granular o es un comprimido.
- 35 8. La composición detergente de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la composición es una composición detergente para lavado de ropa o una composición para el lavado de platos, preferiblemente una composición para lavado de platos a máquina.
9. El uso de una composición detergente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en un procedimiento de limpieza.
- 40 10. El uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el proceso de limpieza es lavado de ropa.
11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el proceso de limpieza es una limpieza de superficies duras, tal como un lavado de platos.
- 45 12. El uso de la reivindicación 9, en el que el proceso de limpieza implica la eliminación de manchas de huevo.
- 50 13. Un método para producir una composición detergente que comprende la etapa de añadir una variante de subtilisina que se obtuvo por un método que comprende introducir en una subtilisina original las sustituciones correspondientes a Y217X y N218Z de la SEQ ID NO: 2, en la que X y Z se seleccionan del grupo que consiste en R o K, en el que la subtilisina original tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 o 4.
- 55 14. El método de la reivindicación 13, en el que la subtilisina original se selecciona del grupo que consiste en:
 a. un polipéptido que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 o 4;
 b. un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones de alta rigurosidad con (i) la secuencia codificadora del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1 o 3, (ii) la secuencia de ADNc del mismo, o (iii) el complemento de longitud completa de (i) o (ii);
 c. un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene al menos 90% de identidad con la secuencia codificadora del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1 o 3, o la secuencia de ADNc del mismo; y
 d. un fragmento del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 o 4, que tiene actividad de proteasa.