

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 032**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/52** (2006.01)

**A23K 20/189** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2013 PCT/EP2013/077492**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14096259**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2013 E 13818739 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2934177**

54 Título: **Polipéptidos que poseen actividad proteasa y polinucleótidos que los codifican**

30 Prioridad:

**21.12.2012 EP 12198994**

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

**16.02.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BENIE, ASTRID;  
OESTERGAARD, PETER RAHBEK;  
GJERMANSEN, MORTEN y  
HOFF, TINE**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 655 032 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**

Polipéptidos que poseen actividad proteasa y polinucleótidos que los codifican

5 Referencia a un listado de secuencias

[0001] Esta solicitud contiene un listado de secuencias en forma legible por ordenador, que se incorpora a este documento por referencia.

10 Campo de la invención

[0002] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados con actividad proteasa y a secuencias de ácidos nucleicos aisladas que codifican las proteasas. La invención también se refiere a constructos de ácido nucleico, vectores y células hospederas, incluidas células vegetales y animales que comprenden las secuencias de ácido nucleico, así como métodos para producir y utilizar las proteasas, en particular el uso de las proteasas en alimento para animales, y detergentes.

Descripción de la técnica anterior

20 [0003] La presente invención proporciona polipéptidos con actividad proteasa y polinucleótidos que codifican los polipéptidos.

[0004] Durante muchos años, la industria de los detergentes ha implementado el uso de diferentes enzimas en formulaciones detergentes; las enzimas utilizadas más habitualmente incluyen proteasas, amilasas y lipasas, cada una de las cuales está adaptada para eliminar diferentes tipos de manchas. Además de las enzimas, las composiciones detergentes incluyen normalmente una combinación compleja de ingredientes. Por ejemplo, la mayoría de los productos de limpieza incluyen un sistema tensioactivo, agentes de decoloración o adyuvantes. A pesar de la complejidad de los detergentes actuales, sigue siendo necesario desarrollar composiciones detergentes nuevas que comprendan enzimas y/o mezclas de enzimas nuevas.

30 [0005] Tradicionalmente el lavado se ha realizado a temperaturas elevadas y se han seleccionado detergentes bien conocidos que se tienen un buen rendimiento a temperaturas más altas.

[0006] La creciente atención para mejorar los procesos de lavado con el fin de hacerlos más ecológicos ha resultado en una tendencia global para reducir el tiempo de lavado, pH y temperatura y disminuir la cantidad de componentes de detergente que pueden afectar el medio ambiente de forma negativa. Por lo tanto, se desea por ejemplo lavar a una temperatura inferior y, por lo tanto, se necesitan proteasas para los detergentes que presenten un rendimiento elevado en diferentes condiciones tales como temperatura baja.

40 [0007] En el uso de proteasas en alimento para animales (*in vivo*), y/o el uso de las proteasas para tratar proteínas vegetales (*in vitro*), cabe destacar que las proteínas son factores nutricionales esenciales para los animales y los seres humanos. La mayor parte del ganado y muchos seres humanos obtienen las proteínas necesarias a partir de fuentes de proteínas vegetales. Algunas fuentes de proteínas vegetales importantes son, p. ej., los cultivos de colza, legumbres y cereales.

45 [0008] Cuando, p. ej., se incluye harina de soja en los alimentos para animales monogástricos, tales como cerdos y aves de corral, una porción significativa de los sólidos de la harina de soja no es digerida de forma eficiente (la digestibilidad ileal aparente de proteínas en los lechones, cerdos de engorde y aves de corral, tales como pollos de engorde, gallinas ponedoras y gallos, es solamente de aproximadamente el 80%).

50 [0009] El tubo digestivo de los animales consiste en una serie de segmentos que representan cada uno entornos de pH diferente. En los animales monogástricos, tales como cerdos y aves de corral y muchos peces, el estómago exhibe un pH muy ácido de tan solo 1-2, mientras que el intestino exhibe un pH más neutro comprendido en el intervalo de pH 6-7. Las aves de corral, además de estómago e intestino, también tienen un buche que precede al estómago, y el pH en el buche está determinado principalmente por los alimentos ingeridos y, por lo tanto, normalmente está comprendido en el intervalo de pH 4-6. La digestión de proteínas por parte de una proteasa puede tener lugar a lo largo de todo el tubo digestivo, dado que la proteasa es activa y soporta las condiciones del tubo digestivo. Por lo tanto, las proteasas que son estables a pH muy ácido para soportar el entorno gástrico y que al mismo tiempo son activas de un modo eficaz al pH fisiológico amplio del animal diana son especialmente deseables.

60



Vista general del listado de secuencias

[0017]

- 5
- La SEQ ID NO: 1 es la secuencia de ADN de proteasa S1 1 de *Dactylosporangium variesporum*  
 La SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos según se deduce a partir de la SEQ ID NO: 1  
 La SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos de la proteasa *Dactylosporangium variesporum* madura.  
 La SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos de la proteasa 309 Subtilisina  
 10 La SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de la proteasa 10R (WO 05/035747, SEQ ID NO:2).  
 La SEQ ID NO: 6 es una señal de secreción de *Bacillus clausii*.

Breve descripción de las figuras

[0018]

- 15
- La Figura 1 muestra el perfil de pH-actividad de la proteasa S1 1 de *Dactylosporangium variesporum* en el sustrato Suc-AAPF-pNA a 37°C.  
 La Figura 2 muestra el perfil de pH-estabilidad de la proteasa S1 1 de *Dactylosporangium variesporum*  
 20 (actividad residual después de 2 horas a 37°C).  
 La Figura 3 muestra el perfil de actividad de temperatura de la proteasa S1 1 de *Dactylosporangium variesporum* en Protazyme AK a pH 7.0.  
 La Figura 4 muestra la P1-especificidad de proteasa S1 1 de *Dactylosporangium variesporum* en sustratos  
 10 Suc-AAPX-pNA a pH 9.0, 25°C.  
 25 La Figura 5 muestra la actividad en harina de soja-maíz de la proteasa S1 1 de *Dactylosporangium variesporum* en comparación con la proteasa 10R.

Definiciones

- 30 [0019] Los polipéptidos que tienen actividad proteasa, o proteasas, también se denominan a veces peptidasas, proteinasas, hidrolasas peptídicas o enzimas proteolíticas. Las proteasas pueden ser del tipo exo, que hidrolizan péptidos empezando en cualquiera de sus extremos, o bien de tipo endo, que actúan internamente en las cadenas polipeptídicas (endopeptidasas). Las endopeptidasas presentan actividad en sustratos peptídicos bloqueados en los N- y C- terminales que son relevantes para la especificidad de la proteasa en cuestión.
- 35 [0020] El término "proteasa" se define en la presente como una enzima que hidroliza enlaces peptídicos. Esta definición de proteasa también se aplica a la parte proteasa de las expresiones "proteasa original" y "variante de proteasa", tal como se utilizan en la presente. El término "proteasa" incluye cualquier enzima que pertenezca al grupo de enzimas EC 3.4 (incluidas cada una de las 13 subclases de estas). El número EC se refiere a la Nomenclatura de enzimas de 1992 de la NC-IUBMB, Academic Press, San Diego, California, incluidos los suplementos 1-5 publicados en *Eur. J. Bio-chem.* 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. La nomenclatura se complementa y actualiza periódicamente.
- 40 [0021] Las proteasas de la invención y las proteasas para el uso de acuerdo con la invención se seleccionan del grupo constituido por:
- (a) proteasas que pertenecen al grupo de enzimas EC 3.4.21.; y/o  
 (b) serina proteasas de la familia de peptidasas S1;
- 50 tal como se describe en *Biochem.J.* 290:205-218 (1993) y en la base de datos de proteasa de MEROPS, publicación, 9.4 (www.merops.ac.uk). La base de datos se describe en Rawlings, N.D., Barrett, A.J. y Bateman, A. (2010) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 38, D227-D233.
- 55 [0022] Para determinar si una proteasa dada es una serina proteasa y una familia de proteasa S1, se hace referencia al Handbook anterior y los principios indicados en él. La determinación se puede llevar a cabo para todos los tipos de proteasas, ya sean proteasas de origen natural o genéticamente intactas; o proteasas sintéticas o modificadas genéticamente.
- 60 [0023] Las proteasas de la familia S1 contienen la tríada catalítica en el orden His, Asp, Ser. La mutación de cualquiera de los aminoácidos de la tríada catalítica resultará en un cambio o pérdida de actividad enzimática. Los

aminoácidos de la tríada catalítica de la proteasa S1 1 de *Dactylosporangium variesporum* (SEQ ID NO: 2) son probablemente las posiciones His-32, Asp-56 y Ser-136.

5 [0024] La actividad proteasa se puede medir utilizando cualquier ensayo, en el que se emplee un sustrato, que incluya enlaces peptídicos relevantes para la especificidad de la proteasa en cuestión. El pH del ensayo y la temperatura del ensayo también se han de adaptar a la proteasa en cuestión. Algunos ejemplos de los valores del pH del ensayo son pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12. Los ejemplos de las temperaturas de ensayo incluyen 15, 20, 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90 o 95°C. Los ejemplos de sustratos de proteasa incluyen caseína, tal como caseína reticulada con azurina (caseína AZCL) o suc-AAPF-pNA. Los ejemplos de ensayos de proteasa adecuados se describen en la parte experimental.

10 [0025] La expresión "actividad proteasa" se refiere a una actividad proteolítica (EC 3.4.21.) que cataliza la hidrólisis del enlace de amida o una proteína mediante hidrólisis del enlace de péptido que une los aminoácidos en una cadena de polipéptidos. En la técnica se dispone de varios ensayos para determinar la actividad proteasa. A los efectos de la presente invención, la actividad proteasa puede determinarse utilizando un comprimido de Protazyme AK (caseína teñida y reticulada; de Megazyme) como se describe en los Ejemplos de la presente patente. Los polipéptidos de la presente divulgación tienen al menos 20%, *por ejemplo*, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 100% de la actividad proteasa del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.

15 [0026] La expresión "variante alélica" se refiere a cualquiera de las dos o más formas alternativas de un gen que ocupan el mismo locus cromosómico. La variación alélica aparece de manera natural debido a una mutación y puede generar polimorfismo en las poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos con secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

20 [0027] El término "dominio catalítico" significa la región de una enzima que contiene maquinaria catalítica de la enzima.

25 [0028] El término "ADNc" se refiere a una molécula de ADN que puede prepararse mediante transcripción inversa a partir de una molécula de ARNm maduro, que ya ha experimentado corte y empalme, obtenida a partir de una célula eucariota o procariota. El ADNc carece de secuencias de tipo intrón que pueden estar presentes en el ADN genómico correspondiente. El transcrito de ARN primario inicial es un precursor del ARNm que se procesa a través de una serie de pasos, que incluyen el corte y empalme, antes de aparecer como un ARNm maduro que ya ha experimentado corte y empalme.

30 [0029] La expresión "composiciones de limpieza" y "formulaciones de limpieza" se refieren a composiciones que pueden utilizarse en la eliminación de compuestos no deseados de artículos que se han de limpiar, tales como tela, alfombras, vajilla incluyendo material de vidrio, lentes de contacto, superficies duras tales como azulejos, zincs, suelos y superficies de mesa, cabello (champú), piel (jabones y cremas), dientes (enjuagues bucales, pasta de dientes), etc. Los términos abarcan cualquier material/compuesto seleccionado para el tipo particular de composición de limpieza deseada y la forma del producto (por ejemplo, composiciones líquida, en gel, gránulo o pulverización), siempre que la composición sea compatible con la proteasa de acuerdo con la invención y otras enzimas utilizadas en la composición. La selección específica de los materiales de la composición de limpieza se hace fácilmente teniendo en cuenta la superficie, el artículo o la tela que se ha de limpiar y la forma deseada de la composición para las condiciones de limpieza durante su uso. Estas expresiones se refieren además a cualquier composición que sea adecuada para limpiar, decolorar, desinfectar y/o esterilizar cualquier objeto y/o superficie. Se pretende que las expresiones incluyan, sin carácter limitante, composiciones detergentes (p. ej., detergentes para lavar la ropa sólidos y/o líquidos, y detergentes para prendas delicadas; formulaciones de limpieza de superficies duras, por ejemplo, para vidrio, madera, encimeras metálicas y de cerámica, y ventanas; limpiadores de alfombras; limpiadores de hornos; aromatizantes para telas; suavizantes para telas; y quitamanchas para el tratamiento previo al lavado de ropa y artículos textiles, así como detergentes para la vajilla).

45 [0030] La expresión "secuencia codificante" se refiere a un polinucleótido que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de un polipéptido. Los límites de la secuencia codificante se determinan generalmente mediante un marco de lectura abierta que comienza con un codón de inicio como ATG, GTG, o TTG y termina con un codón terminador como TAA, TAG o TGA. La secuencia codificante puede ser un ADN genómico, ADNc, ADN sintético o una combinación de estos.

50 [0031] El término "secuencias de control" significa secuencias de ácido nucleico necesarias para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser

nativa (es decir, del mismo gen) o exógena (es decir, de un gen diferente) respecto del polinucleótido que codifica el polipéptido o nativos o exógenos entre sí. Las secuencias de control de este tipo incluyen, sin carácter limitante, una secuencia líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia propeptídica, un promotor, una secuencia de tipo péptido señal y un terminador de la transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales terminadoras de la transcripción y la traducción. Las secuencias de control pueden estar provistas de conectores a fin de introducir sitios de restricción específicos que faciliten la unión de las secuencias de control con la región codificante del polinucleótido que codifica un polipéptido.

[0032] La expresión "composición detergente" incluye, a menos que se indique lo contrario, agentes de lavado de gran potencia o multiusos en forma de polvos o gránulos, especialmente detergentes de limpieza; agentes de lavado multiusos en forma de pasta, gel o líquido, especialmente los denominados de tipo líquido de gran potencia (HDL, por sus siglas en inglés); detergentes líquidos para prendas delicadas; agentes para lavar la vajilla a mano o agentes para lavar la vajilla poco potentes, especialmente aquellos del tipo que produce una gran cantidad de espuma; agentes para lavar la vajilla a máquina, incluidos los diferentes tipos de líquidos, granulados, comprimidos y abrillantadores para uso doméstico e institucional; agentes de desinfección y limpieza líquidos, incluidos los tipos de jabones para manos antibacterianos, barras de limpieza, colutorios, productos de higiene de prótesis dentales, champús para coches o alfombras, productos de limpieza para el baño; champús para el cabello y enjuagues para el cabello; geles de ducha, espumas de baño; productos de limpieza de metales; así como también auxiliares de limpieza tales como aditivos de decoloración y tipos de "quitamanchas en barra" o de pretratamientos. Las expresiones "composición detergente" y "formulación detergente" se utilizan haciendo referencia a mezclas que están diseñadas para ser utilizadas en un medio de lavado para limpiar objetos sucios. En algunas modalidades, la expresión se utiliza haciendo referencia al lavado de telas y/o prendas (p. ej., "detergentes para lavar la ropa"). En modalidades alternativas, la expresión se refiere a otros detergentes, tales como los utilizados para lavar la vajilla, la cubertería, etc. (p. ej., "detergentes lavavajillas"). No se pretende que la presente invención se limite a ninguna composición o formulación detergente concreta. Se pretende que además de la proteasa de acuerdo con la invención, el término abarca detergentes que contienen, por ejemplo, tensioactivos, adyuvantes, quelantes o agentes quelantes, sistema de blanqueo o componentes de blanqueo, polímeros, suavizantes para la ropa, potenciadores de la espuma, supresores de la espuma de jabones, tintes, perfume, inhibidores de la decoloración, abrillantadores ópticos, bactericidas, fungicidas, agentes de suspensión de la suciedad, agentes anticorrosión, inhibidores o estabilizadores enzimáticos, activadores enzimáticos, transferasa(s), enzimas hidrolíticas, oxidorreductasas, colorante azul y tintes fluorescentes, antioxidantes, polímeros y solubilizantes.

[0033] La expresión "composición para lavar la vajilla" se refiere a todas las formas de composiciones para limpiar superficies duras. La presente invención no está restringida a ningún tipo particular de composición para lavar la vajilla ni a ningún detergente en particular.

[0034] La expresión "beneficio detergente enzimático" o "detergente" se define en la presente como el efecto ventajoso que una enzima puede agregar a un detergente en comparación con el mismo detergente sin la enzima. Algunos beneficios de la detergencia importantes que pueden proporcionar las enzimas son la eliminación de manchas sin o con muy poca suciedad visible después del lavado y/o la limpieza, la prevención o reducción de la redeposición de la suciedad liberada en el proceso de lavado, un efecto que también se denomina efecto contra la redeposición, de este modo se reestablece completa o parcialmente la blancura de los artículos textiles que eran originalmente blancos pero que después del uso y lavado reiterados han adquirido un aspecto grisáceo o amarillento, un efecto que también se denomina blanqueo.

Los beneficios del cuidado de los artículos textiles, los cuales no están directamente relacionados con la eliminación catalítica de las manchas o la prevención de la redeposición de la suciedad, también son importantes para los beneficios de la detergencia enzimática. Algunos ejemplos de este tipo de beneficios en el cuidado de los artículos textiles son la prevención o reducción de la transferencia del tinte de una tela a otra tela o a otra parte de la misma tela, un efecto que también se denomina inhibición de la transferencia del tinte o efecto contra la retorción, eliminación de fibras fragmentadas o que sobresalen de la superficie de la tela para reducir la tendencia al frisado o eliminar pelusa o bolitas que ya existen, un efecto que también se denomina antifrisado, mejora de la suavidad de la tela, aclaramiento del color de la tela y eliminación de suciedad particulada que se queda atrapada en las fibras de la tela o prenda. El decoloramiento enzimático es un beneficio detergente enzimático adicional donde la actividad catalítica se utiliza generalmente para catalizar la formación de un componente de decoloración tal como el peróxido de hidrógeno u otros peróxidos.

[0035] El término "expresión" incluye toda etapa involucrada en la producción de un polipéptido que incluye, sin carácter limitante, una modificación de transcripción, post-transcripcional, traducción, modificación después de la traducción y secreción.

[0036] El término "vector de expresión" significa una molécula de ADN lineal o circular que comprende un

polinucleótido que codifica un polipéptido y está unido operativamente a secuencias de control que contemplan su expresión.

5 [0037] El término "tela" abarca cualquier material textil. Por lo tanto, se pretende que el término abarque prendas, así como telas, hilos, fibras, materiales no tejidos, materiales naturales, materiales sintéticos y cualquier otro material textil.

10 [0038] El término "fragmento" se refiere a un polipéptido que tiene uno o más (*por ejemplo*, varios) aminoácidos ausentes del extremo amino y/o carboxilo de un polipéptido o dominio maduro; en donde el fragmento tiene actividad proteasa.

15 [0039] La expresión "limpieza de superficies duras" se define en la presente como la limpieza de superficies duras donde las superficies duras pueden incluir suelos, mesas, paredes, techos, etc., así como también superficies de objetos duros tales como coches (lavado de coches) y vajilla (lavado de vajilla). El lavado de vajilla incluye, sin carácter limitante, la limpieza de platos, copas, vasos, tazones y cubertería tal como cucharas, cuchillos, tenedores, utensilios para servir, cerámicas, plásticos, metales, porcelana, vidrio y acrílicos.

20 [0040] La expresión "condiciones de rigurosidad alta" se refiere a sondas con una longitud de al menos 100 nucleótidos, que se prehibridan e hibridan a 42 °C en 5x SSPE, un 0.3% de SDS, 200 microgramos/mL de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, y un 50% de formamida, siguiendo procedimientos estándar de inmunoSouthern blot durante 12-24 horas. Finalmente, el material portador se lava tres veces, durante 15 minutos cada vez, utilizando 2X SSC y un 0.2% de SDS a 65 °C.

25 [0041] La expresión "célula hospedera" se refiere a cualquier tipo de célula que es susceptible de ser transformada, transfectada, transducida o de sufrir procesos similares con un constructo de ácido nucleico o vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención. La expresión "célula hospedera" abarca cualquier progenie de una célula original que no es idéntica a la célula original debido a mutaciones que se producen durante la replicación.

30 [0042] La expresión "rendimiento de lavado mejorado" se define en la presente como una enzima tal como una proteasa (también una mezcla de enzimas, no necesariamente solo variantes sino también estructuras principales y en combinación con cierta composición de limpieza etc.) que presenta una alteración del rendimiento de lavado de por ejemplo la proteasa con respecto al desempeño de lavado de la otra proteasa o proteasa original por ejemplo mediante el aumento de la eliminación de manchas. La expresión "rendimiento de lavado" incluye el rendimiento de lavado al lavar la ropa pero también, p. ej., al lavar la vajilla.

35

[0043] El término "aislado" se refiere a una sustancia en una forma o entorno que no se encuentra en la naturaleza. Los ejemplos no limitantes de sustancias aisladas incluyen (1) cualquier sustancia que no esté presente de manera natural, (2) cualquier sustancia, que incluye, sin carácter limitante, cualquier enzima, variante, ácido nucleico, proteína, péptido o cofactor, que se haya separado, al menos en parte, de uno o más o de todos los constituyentes presentes de manera natural con los cuales está asociada en la naturaleza; (3) cualquier sustancia modificada por intervención humana respecto a la sustancia que se encuentra en la naturaleza; o (4) cualquier sustancia modificada por el incremento de la cantidad de la sustancia respecto a otros componentes con los cuales está asociada de manera natural (p. ej., copias múltiples de un gen que codifica la sustancia; el uso de un promotor más potente que el promotor asociado de manera natural con el gen que codifica la sustancia). Una sustancia aislada puede estar presente en una muestra de caldo de fermentación.

40

45

[0044] La expresión "condiciones de rigurosidad baja" se refiere, para sondas con una longitud de al menos 100 nucleótidos, a una prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, un 0.3% de SDS, 200 microgramos/mL de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, y un 25% de formamida, siguiendo procedimientos estándar de Southern blot durante 12-24 horas. Finalmente, el material portador se lava tres veces, durante 15 minutos cada vez, utilizando 2X SSC y un 0.2% de SDS a 50 °C.

50

[0045] La expresión "polipéptido maduro" se refiere a un polipéptido en su forma final luego de la traducción y cualquier modificación post-traducción, tal como procesamiento del N-terminal, truncación del C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro está constituido por los aminoácidos comprendidos entre el aminoácido 1 y 187 de la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO 3 en base a la secuenciación de aminoácidos utilizando la química de la degradación de Edman. En la técnica existe constancia de que una célula hospedera puede producir una mezcla de dos o más polipéptidos maduros diferentes (es decir, con un aminoácido diferente en el C-terminal y/o el N-terminal) expresados por el mismo polinucleótido.

55

60

[0046] La expresión "secuencia que codifica el polipéptido maduro" se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro que tiene actividad proteasa. En un aspecto, la secuencia que codifica el polipéptido maduro está constituida por los nucleótidos comprendidos entre el nucleótido 656 y 1216 de la SEQ ID NO: 1.

5 [0047] La expresión "condiciones de rigurosidad media" se refiere, para sondas con una longitud de al menos 100 nucleótidos, a una prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, un 0.3% de SDS, 200 microgramos/mL de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, y un 35% de formamida, siguiendo los procedimientos estándar de Southern blot durante 12-24 horas. Finalmente, el material portador se lava tres veces, durante 15 minutos cada vez, utilizando 2X SSC y un 0.2% de SDS a 55 °C.

10 [0048] La expresión "condiciones de rigurosidad media-alta" se refiere, para sondas con una longitud de al menos 100 nucleótidos, a una prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, un 0.3% de SDS, 200 microgramos/mL de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, y un 35% de formamida, siguiendo procedimientos estándar de Southern blot durante 12-24 horas. Finalmente, el material portador se lava tres veces, durante 15 minutos cada vez, utilizando 2X SSC y un 0.2% de SDS a 60 °C.

[0049] expresión "constructo de ácido nucleico" se refiere a una molécula de ácido nucleico, ya sea mono- o bicatenaria, la cual se aísla a partir de un gen presente de manera natural o se modifica para que contenga segmentos de ácidos nucleicos de un modo que de otra manera no existiría en la naturaleza o que es sintético, que comprende una o más secuencias de control.

[0050] La expresión "ligado/a operablemente" se refiere a una configuración en la cual una secuencia de control se coloca en una posición adecuada respecto a la secuencia codificante de un polinucleótido de modo que la secuencia de control dirija la expresión de la secuencia codificante.

25 [0051] El grado de correlación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe mediante el parámetro "identidad secuencial".

[0052] A los efectos de la presente invención, la identidad secuencial entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) según se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite", Rice *et al.*, 2000, *Trends Genet.* 16: 276-277), preferentemente la versión 5.0.0 o versiones posteriores. Los parámetros utilizados son una penalización por la apertura de un hueco de 10, una penalización por la extensión del hueco de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62). El resultado de Needle denominado "la identidad más larga" (que se obtiene utilizando la opción no resumida) se utiliza como la identidad porcentual y se calcula como se indica a continuación:

$$(\text{Residuos idénticos} \times 100) / (\text{Longitud de la alineación} - \text{Número total de huecos en la alineación})$$

40 [0053] A efectos de la presente invención, la identidad secuencial entre dos secuencias de desoxirribonucleótidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, mencionado anteriormente) según se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite", Rice *et al.*, 2000, mencionado anteriormente), preferentemente la versión 5.0.0 o versiones posteriores. Los parámetros utilizados son una penalización por la apertura de un hueco de 10, una penalización por la extensión del hueco de 0.5 y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión EMBOSS de NCBI NUC4.4). El resultado de Needle denominado "la identidad más larga" (que se obtiene utilizando la opción no resumida) se utiliza como la identidad porcentual y se calcula como se indica a continuación:

$$(\text{Desoxirribonucleótidos idénticos} \times 100) / (\text{Longitud de la alineación} - \text{Número total de huecos en la alineación})$$

50 [0054] El término "subsecuencia" se refiere a un polinucleótido que tiene uno o más (*por ejemplo*, varios) nucleótidos ausentes del extremo 5' y/o 3' de una secuencia que codifica un polipéptido maduro; en donde la subsecuencia codifica un fragmento que tiene actividad proteasa.

55 [0055] La expresión "polinucleótido sustancialmente puro" se refiere a un preparado polinucleotídico exento de otros nucleótidos extraños o no deseados y que se encuentra en una forma adecuada para su uso en los sistemas de producción de polipéptidos modificados genéticamente. Por lo tanto, un polinucleótido sustancialmente puro contiene como máximo un 10%, como máximo un 8%, como máximo un 6%, como máximo un 5%, como máximo un 4%, como máximo un 3%, como máximo un 2%, como máximo un 1% y como máximo un 0.5% en peso de otro material polinucleotídico con el cual está asociado de manera natural o recombinante. Sin embargo, un polinucleótido sustancialmente puro puede incluir regiones no traducidas 5' y 3' de origen natural, tales como promotores y

60

terminadores. Preferentemente, el polinucleótido tiene una pureza de al menos un 90%, p. ej., al menos un 92%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% y al menos un 99.5% en peso. Los polinucleótidos de la presente invención se encuentran preferentemente en una forma sustancialmente pura.

5

[0056] La expresión "polipéptido sustancialmente puro" se refiere a un preparado que contiene como máximo un 10%, como máximo un 8%, como máximo un 6%, como máximo un 5%, como máximo un 4%, como máximo un 3%, como máximo un 2%, como máximo un 1% y como máximo un 0.5% en peso de otro material polipeptídico con el cual está asociado de manera natural o recombinante. Preferentemente, el polipéptido tiene una pureza de al menos un 92%, p. ej., una pureza de al menos un 94%, una pureza de al menos un 95%, una pureza de al menos un 96%, una pureza de al menos un 97%, una pureza de al menos un 98%, una pureza de al menos un 99%, una pureza de al menos un 99.5% y una pureza de un 100% en peso respecto al material polipeptídico total presente en el preparado. Los polipéptidos de la presente invención se encuentran preferentemente en una forma sustancialmente pura. Esto se puede conseguir, por ejemplo, preparando el polipéptido mediante métodos recombinantes de uso común o mediante métodos de purificación clásicos.

10

15

[0057] La expresión "artículo textil" se refiere a cualquier material textil, incluidos los hilos, intermedios de hilos, fibras, materiales no tejidos, materiales naturales, materiales sintéticos y cualquier otro material textil, telas confeccionadas con estos materiales y productos confeccionados a partir de las telas (p. ej., prendas y otros artículos). El artículo textil o la tela puede estar en forma de artículos de punto, tejidos, vaqueros, no tejidos, fieltros, hilos y toallas. El artículo textil puede tener una base celulósica, tal como materiales celulósicos naturales, que incluyen algodón, fibra de lino/tejido de lino, yute, ramio, sisal o fibra de coco, o materiales celulósicos hechos por el hombre (p. ej., que se han originado a partir de pulpa de madera), que incluyen viscosa/rayón, ramio, fibras de acetato de celulosa (tricell), lyocell o mezclas de estos. El artículo textil o la tela también puede tener una base no celulósica tal como poliamidas naturales que incluyen lana, camello, cachemir, angora, conejo y seda, o un polímero sintético tal como nailon, aramida, poliéster, acrílico, polipropileno y espandex/elastano o mezclas de estos, así como también una mezcla de fibras de base celulósica y de base no celulósica. Algunos ejemplos de mezclas son mezclas de algodón y/o rayón/viscosa con uno o más materiales que los acompañan, tales como lana, fibras sintéticas (p. ej., fibras de poliaramida, fibras acrílicas, fibras de poliéster, fibras de alcohol polivinílico, fibras de cloruro polivinílico, fibras de poliuretano, fibras de poliurea, fibras de aramida) y fibras que contienen celulosa (p. ej., rayón/viscosa, ramio, fibra de lino/tejido de lino, yute, fibras de acetato de celulosa, lyocell). Las telas pueden ser ropa sucia que se pueda lavar de manera convencional, p. ej. ropa sucia doméstica manchada. Cuando se utilice el término tela o prenda se pretende que también incluya la expresión más amplia artículos textiles.

20

25

30

35

40

45

[0058] La expresión "beneficios en cuanto al cuidado de textiles", que no están relacionados directamente con la eliminación de manchas catalítica o prevención de redeposición de suciedad, también son importantes para los beneficios detergentes enzimáticos. Algunos ejemplos de tales beneficios del cuidado de los artículos textiles son la prevención o reducción de la transferencia de tinte de un artículo textil a otro artículo textil u otra parte del mismo artículo textil, un efecto que también se denomina inhibición de la transferencia de tinte o efecto contra la retorción, la eliminación de fibras rotas o que sobresalen de una superficie del artículo textil para reducir la tendencia al frisado o eliminar pelusa o bolitas que ya existen, un efecto que también se denomina antifrisado, la mejora de la suavidad del artículo textil, aclaramiento del color del artículo textil y la eliminación de la suciedad particulada que queda atrapada en las fibras del artículo textil. La decoloración enzimática es un beneficio de la detergencia enzimática adicional en el que generalmente se utiliza la actividad catalítica para catalizar la formación de un componente decolorante tal como el peróxido de hidrógeno u otros peróxidos u otras especies decolorantes.

50

[0059] El término "variante" se refiere a un polipéptido con actividad proteasa que comprende una alteración, es decir, una sustitución, inserción y/o supresión, en una o más (por ejemplo, varias) posiciones. Una sustitución se refiere al reemplazo del aminoácido que ocupa una posición por un aminoácido diferente; una supresión se refiere a la eliminación del aminoácido que ocupa una posición; y una inserción se refiere a la adición de uno o más (por ejemplo varios) aminoácidos, por ejemplo 1-5 aminoácidos adyacentes a un aminoácido que ocupa una posición y que le sigue inmediatamente.

55

[0060] La expresión "condiciones de rigurosidad muy alta" se refiere a sondas con una longitud de al menos 100 nucleótidos, que se prehibridan e hibridan a 42 °C en 5x SSPE, un 0.3% de SDS, 200 microgramos/mL de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, y un 50% de formamida, siguiendo procedimientos estándar de inmunoSouthern blot durante 12-24 horas. Finalmente, el material portador se lava tres veces, durante 15 minutos cada vez, utilizando 2X SSC y un 0.2% de SDS a 70 °C.

60

[0061] La expresión "condiciones de rigurosidad muy baja" se refiere, para sondas con una longitud de al menos 100 nucleótidos, a una prehibridación e hibridación a 42 °C en 5x SSPE, un 0.3% de SDS, 200 microgramos/mL de ADN

de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, y un 25% de formamida, siguiendo procedimientos estándar de Southern blot durante 12-24 horas. Finalmente, el material portador se lava tres veces, durante 15 minutos cada vez, utilizando 2X SSC y un 0.2% de SDS a 45 °C.

5 [0062] La expresión "rendimiento de lavado" se utiliza como la capacidad de una enzima para eliminar manchas presentes en el objeto que se va a limpiar durante, p. ej., el lavado o la limpieza de una superficie dura.

[0063] El término "blancura" se define en la presente como un término amplio con diferentes significados en diferentes regiones y para diferentes clientes. La pérdida de la blancura puede deberse, p. ej., al agrisado, amarilleamiento o eliminación de abrillantadores ópticos/agentes que modifican la tonalidad. El agrisado y amarilleamiento pueden deberse al redépósito de la suciedad, suciedad corporal, coloración de, p. ej., iones de hierro y cobre o transferencia del tinte. La blancura puede incluir uno o varios de los problemas de la siguiente lista: Efectos del colorante o tinte; eliminación de manchas incompleta (p. ej., suciedad corporal, sebo, etc.); redeposición (agrisado, amarilleamiento u otras decoloraciones del objeto) (la suciedad eliminada se vuelve a asociar con otras partes del artículo textil, sucio o no sucio); cambios químicos en el artículo textil durante la aplicación; y aclaramiento o iluminación de colores.

Descripción detallada de la invención

20 [0064] En una modalidad, la presente invención se refiere a un polipéptido aislado que posee una identidad secuencial respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de 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%, que tiene actividad proteasa. En un aspecto, el polipéptido difiere en más de 20 aminoácidos, *por ejemplo*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.

25 [0065] En una modalidad, la divulgación se refiere a un polipéptido aislado que posee una identidad secuencial respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de al menos 80% que tiene actividad proteasa.

30 [0066] En una modalidad, la divulgación se refiere a un polipéptido aislado que posee una identidad secuencial respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de al menos 81% que tiene actividad proteasa.

[0067] En una modalidad, la divulgación se refiere a un polipéptido aislado que posee una identidad secuencial respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de al menos 82% que tiene actividad proteasa.

35 [0068] En una modalidad, la divulgación se refiere a un polipéptido aislado que posee una identidad secuencial respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de al menos 83% que tiene actividad proteasa.

[0069] En una modalidad, la divulgación se refiere a un polipéptido aislado que posee una identidad secuencial respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de al menos 85% que tiene actividad proteasa.

40 [0070] En una modalidad, la divulgación se refiere a un polipéptido aislado que posee una identidad secuencial respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de al menos 85% que tiene actividad proteasa.

45 [0071] En una modalidad, la divulgación se refiere a un polipéptido aislado que posee una identidad secuencial respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de al menos 86% que tiene actividad proteasa.

[0072] En una modalidad, la divulgación se refiere a un polipéptido aislado que posee una identidad secuencial respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de al menos 87% que tiene actividad proteasa.

50 [0073] En una modalidad, la divulgación se refiere a un polipéptido aislado que posee una identidad secuencial respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de al menos 88% que tiene actividad proteasa.

[0074] En una modalidad, la divulgación se refiere a un polipéptido aislado que posee una identidad secuencial respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de al menos 89% que tiene actividad proteasa.

55 [0075] En una modalidad, la invención se refiere a un polipéptido aislado que posee una identidad secuencial respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de al menos 90% que tiene actividad proteasa.

60 [0076] En una modalidad, la invención se refiere a un polipéptido aislado que posee una identidad secuencial respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de al menos 91% que tiene actividad proteasa.

- [0077] En una modalidad, la invención se refiere a un polipéptido aislado que posee una identidad secuencial respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de al menos 92% que tiene actividad proteasa.
- 5 [0078] En una modalidad, la invención se refiere a un polipéptido aislado que posee una identidad secuencial respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de al menos 93% que tiene actividad proteasa.
- [0079] En una modalidad, la invención se refiere a un polipéptido aislado que posee una identidad secuencial respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de al menos 94% que tiene actividad proteasa.
- 10 [0080] En una modalidad, la invención se refiere a un polipéptido aislado que posee una identidad secuencial respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de al menos 95% que tiene actividad proteasa.
- [0081] En una modalidad, la invención se refiere a un polipéptido aislado que posee una identidad secuencial respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de al menos 96% que tiene actividad proteasa.
- 15 [0082] En una modalidad, la invención se refiere a un polipéptido aislado que posee una identidad secuencial respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de al menos 97% que tiene actividad proteasa.
- [0083] En una modalidad, la invención se refiere a un polipéptido aislado que posee una identidad secuencial respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de al menos 98% que tiene actividad proteasa.
- 20 [0084] En una modalidad, la invención se refiere a un polipéptido aislado que posee una identidad secuencial respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de al menos 99% que tiene actividad proteasa.
- 25 [0085] Un polipéptido de la presente invención comprende o está constituido preferentemente por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o una variante alélica de esta; o es un fragmento de este que tiene actividad proteasa. En otro aspecto, el polipéptido comprende o está constituido por el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, el polipéptido comprende o está constituido por los aminoácidos comprendidos entre el aminoácido 1 y 187 de la SEQ ID NO: 2.
- 30 [0086] En otra modalidad, la presente divulgación se refiere a un polipéptido aislado que tiene actividad proteasa codificada por un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones de rigurosidad muy baja, condiciones de rigurosidad baja, condiciones de rigurosidad media, condiciones de rigurosidad media-alta, condiciones de rigurosidad alta o condiciones de rigurosidad muy alta con la secuencia que codifica el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1, o el complemento de longitud completa de esta (Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2a edición, Cold Spring Harbor, Nueva York).
- 35 [0087] El polinucleótido de la SEQ ID NO: 1 o una subsecuencia de este, así como el polipéptido de la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma puede utilizarse para diseñar sondas de ácido nucleico para identificar y clonar polipéptidos que codifican ADN que tienen actividad proteasa de cepas de diferentes géneros o especies de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. En particular, este tipo de sondas se pueden utilizar para la hibridación con el ADN genómico o ADNc de una célula de interés, siguiendo procedimientos estándar de Southern blot, con el fin de identificar y aislar el gen correspondiente en este. Este tipo de sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia completa, pero deben tener una longitud de al menos 15, p. ej., al menos 25, al menos 35 o al menos 70 nucleótidos. Preferentemente, la sonda de ácido nucleico tiene una longitud de al menos 100 nucleótidos, p. ej., una longitud de 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. Se pueden utilizar sondas tanto de ADN como de ARN. Las sondas se etiquetan típicamente para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con <sup>32</sup>P, <sup>3</sup>H, <sup>35</sup>S, biotina o avidina). La presente invención abarca este tipo de sondas.
- 40 [0087] El polinucleótido de la SEQ ID NO: 1 o una subsecuencia de este, así como el polipéptido de la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma puede utilizarse para diseñar sondas de ácido nucleico para identificar y clonar polipéptidos que codifican ADN que tienen actividad proteasa de cepas de diferentes géneros o especies de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. En particular, este tipo de sondas se pueden utilizar para la hibridación con el ADN genómico o ADNc de una célula de interés, siguiendo procedimientos estándar de Southern blot, con el fin de identificar y aislar el gen correspondiente en este. Este tipo de sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia completa, pero deben tener una longitud de al menos 15, p. ej., al menos 25, al menos 35 o al menos 70 nucleótidos. Preferentemente, la sonda de ácido nucleico tiene una longitud de al menos 100 nucleótidos, p. ej., una longitud de 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. Se pueden utilizar sondas tanto de ADN como de ARN. Las sondas se etiquetan típicamente para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con <sup>32</sup>P, <sup>3</sup>H, <sup>35</sup>S, biotina o avidina). La presente invención abarca este tipo de sondas.
- 45 [0087] El polinucleótido de la SEQ ID NO: 1 o una subsecuencia de este, así como el polipéptido de la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma puede utilizarse para diseñar sondas de ácido nucleico para identificar y clonar polipéptidos que codifican ADN que tienen actividad proteasa de cepas de diferentes géneros o especies de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. En particular, este tipo de sondas se pueden utilizar para la hibridación con el ADN genómico o ADNc de una célula de interés, siguiendo procedimientos estándar de Southern blot, con el fin de identificar y aislar el gen correspondiente en este. Este tipo de sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia completa, pero deben tener una longitud de al menos 15, p. ej., al menos 25, al menos 35 o al menos 70 nucleótidos. Preferentemente, la sonda de ácido nucleico tiene una longitud de al menos 100 nucleótidos, p. ej., una longitud de 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. Se pueden utilizar sondas tanto de ADN como de ARN. Las sondas se etiquetan típicamente para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con <sup>32</sup>P, <sup>3</sup>H, <sup>35</sup>S, biotina o avidina). La presente invención abarca este tipo de sondas.
- 50 [0087] El polinucleótido de la SEQ ID NO: 1 o una subsecuencia de este, así como el polipéptido de la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma puede utilizarse para diseñar sondas de ácido nucleico para identificar y clonar polipéptidos que codifican ADN que tienen actividad proteasa de cepas de diferentes géneros o especies de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. En particular, este tipo de sondas se pueden utilizar para la hibridación con el ADN genómico o ADNc de una célula de interés, siguiendo procedimientos estándar de Southern blot, con el fin de identificar y aislar el gen correspondiente en este. Este tipo de sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia completa, pero deben tener una longitud de al menos 15, p. ej., al menos 25, al menos 35 o al menos 70 nucleótidos. Preferentemente, la sonda de ácido nucleico tiene una longitud de al menos 100 nucleótidos, p. ej., una longitud de 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. Se pueden utilizar sondas tanto de ADN como de ARN. Las sondas se etiquetan típicamente para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con <sup>32</sup>P, <sup>3</sup>H, <sup>35</sup>S, biotina o avidina). La presente invención abarca este tipo de sondas.
- 55 [0088] Se puede cribar una colección de ADN genómico o ADNc preparada a partir de otras cepas de este tipo para detectar ADN que se hibride con las sondas descritas anteriormente y que codifique un polipéptido que tiene actividad proteasa. El ADN genómico o de otro tipo procedente de otras cepas de este tipo se puede separar mediante electroforesis en gel de poliacrilamida o agarosa, o mediante otras técnicas de separación. El ADN de las colecciones o el ADN separado se puede transferir a nitrocelulosa u otro material portador adecuado e inmovilizarlo sobre este. Con el fin de identificar un clon o ADN que se hibride con la SEQ ID NO: 1 o una subsecuencia de esta, el material portador se utiliza en una Southern blot.
- 60 [0089] A efectos de la presente divulgación, la hibridación indica que el polinucleótido se hibrida con una sonda de ácido nucleico marcada correspondiente a (i) la SEQ ID NO: 1; (ii) la secuencia que codifica el polipéptido maduro de

la SEQ ID NO: 1; (iii) el complemento de longitud completa de esta; o (iv) una subsecuencia de esta; en condiciones de rigurosidad de muy baja a muy alta. Las moléculas con las cuales se hibrida la sonda de ácido nucleico en estas condiciones se pueden detectar utilizando, por ejemplo, una película de rayos X o cualquier otro medio de detección conocido en la técnica.

5 [0090] En un aspecto, la sonda de ácido nucleico está constituida por los nucleótidos comprendidos entre el nucleótido 101 y 1405, entre el nucleótido 188 y 1222, entre el nucleótido 665 y 1222 o entre el nucleótido 800 y 1200 de la SEQ ID NO: 1. En otro aspecto, la sonda de ácido nucleico es un polinucleótido que codifica el polipéptido de la SEQ ID NO: 2; el polipéptido maduro de este; o un fragmento de este. En otro aspecto, la sonda de ácido nucleico es la SEQ ID NO: 1.

10 [0091] En otra modalidad, la presente invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene actividad proteasa codificado por un polinucleótido que tiene una identidad secuencial respecto a la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1 de 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%.

15 [0092] En otra modalidad, la presente divulgación se relaciona con variantes del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2 que comprende una sustitución, eliminación y/o inserción en una o más (*por ejemplo*, varias) posiciones. En una modalidad, el número de sustituciones, supresiones y/o inserciones de aminoácidos introducidas en el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 es no más de 20, *por ejemplo*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19. En otra modalidad, el número de posiciones que comprende una sustitución, supresión y/o inserción en el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 es entre 1 y 20, tal como las posiciones 1-15, 1-10 o 1-5. En una modalidad, el número de posiciones que comprende una sustitución, supresión y/o inserción en el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 es no más de 10, *por ejemplo*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En otra modalidad, el número de sustituciones, supresiones y/o inserciones en el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 es no más de 10, *por ejemplo*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En una modalidad adicional, el número de sustituciones en el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 es no más de 10, *por ejemplo*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

20 En una modalidad adicional, el número de sustituciones conservadoras en el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 es no más de 10, *por ejemplo*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. Los cambios de los aminoácidos pueden ser poco relevantes, es decir, inserciones o sustituciones conservadoras de aminoácidos que no afectan significativamente al plegamiento y/o la actividad de la proteína; supresiones pequeñas, normalmente de 1-30 aminoácidos; extensiones pequeñas en el extremo amino o en el C-terminalarboxilo, tales como un residuo de metionina en el extremo amino; un péptido conector pequeño de hasta 20-25 residuos; o una extensión pequeña que facilita la purificación al cambiar la carga neta u otra función, tal como una región de polihistidina, un epitopo antigénico o un dominio de unión.

25 [0093] Algunos ejemplos de sustituciones conservadoras son las sustituciones dentro de los grupos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrófobos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) y aminoácidos de bajo peso molecular (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). En la técnica existe constancia de sustituciones de aminoácidos que no alteran generalmente la actividad específica y han sido descritas, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, en *The Proteins*, Academic Press, Nueva York. Algunas sustituciones comunes son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly.

30 [0094] De forma alternativa, los cambios de los aminoácidos son de una naturaleza tal que las propiedades fisicoquímicas de los polipéptidos se alteran. Por ejemplo, los cambios de los aminoácidos pueden mejorar la estabilidad térmica del polipéptido, alterar la especificidad por el sustrato, cambiar el pH óptimo y similares.

35 [0095] Los aminoácidos esenciales de un polipéptido se pueden identificar de acuerdo con procedimientos de uso común en la técnica tales como la mutagénesis dirigida o la mutagénesis de barrido de alanina (Cunningham y Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). En esta última técnica, se introducen mutaciones de una única alanina en cada residuo de la molécula y las moléculas mutadas resultantes se evalúan para determinar su actividad proteasa con el fin de identificar los residuos aminoacídicos que son cruciales para la actividad de la molécula. Remítase también a Hilton *et al.*, 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica también se puede determinar mediante el análisis físico de la estructura, que se determina mediante técnicas tales como la resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o marcaje de fotoafinidad, junto con la mutación de posibles aminoácidos del sitio de contacto. Remítase, por ejemplo, a 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 los aminoácidos esenciales también se puede deducir a partir de una alineación con un polipéptido relacionado. En el polipéptido de la presente invención los aminoácidos esenciales que forman la tríada catalítica se han identificado como aminoácidos que corresponden a His-32, Asp-56 y Ser-136 en la SEQ ID NO: 2 mediante alineación con la

secuencia de aminoácidos de la proteasa 10R (SEQ ID NO 5).

[0096] Las sustituciones, supresiones y/o inserciones de un único aminoácido o de múltiples aminoácidos se pueden realizar y evaluar utilizando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o reordenamiento, seguidos de un procedimiento de cribado relevante, como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, *Science* 241: 53-57; Bowie y Sauer, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2152-2156; WO 95/17413 o WO 95/22625. Otros métodos que se pueden utilizar incluyen la PCR propensa a error, la presentación en fagos (p. ej., Lowman *et al.*, 1991, *Biochemistry* 30: 10832-10837; Patente de EE. UU. N.º 5.223.409; WO 92/06204), mutagénesis dirigida a una región (Derbyshire *et al.*, 1986, *Gene* 46: 145; Ner *et al.*, 1988, *DNA* 7: 127).

[0097] Los métodos de mutagénesis/reordenamiento se pueden combinar con métodos de cribado automáticos de alto rendimiento para detectar la actividad de polipéptidos mutados clonados expresados por las células hospederas (Ness *et al.*, 1999, *Nature Biotechnology* 17: 893-896).

Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos pueden recuperarse de las células hospederas y secuenciarse rápidamente utilizando métodos estándar en la técnica. Estos métodos permiten determinar rápidamente la importancia de residuos aminoacídicos individuales en un polipéptido.

[0098] El polipéptido puede ser un polipéptido híbrido en el cual una región de un polipéptido se fusiona con el N-terminal o el C-terminal de una región de otro polipéptido.

[0099] El polipéptido puede ser un polipéptido de fusión o un polipéptido de fusión escindible en donde otro polipéptido se fusiona en el N-terminal o C-terminal del polipéptido de la presente invención. Un polipéptido de fusión se produce fusionando un polinucleótido que codifica otro polipéptido con un polinucleótido de la presente invención. Las técnicas para producir polipéptidos de fusión son de uso común en la técnica e incluyen ligar las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de modo que estén en fase y que la expresión del polipéptido de fusión esté controlada por el mismo promotor o promotores y el mismo terminador. Los polipéptidos de fusión también se pueden construir utilizando la tecnología de inteínas en la cual los polipéptidos de fusión se crean después de la traducción (Cooper *et al.*, 1993, *EMBO J.* 12: 2575-2583; Dawson *et al.*, 1994, *Science* 266: 776-779).

[0100] Un polipéptido de fusión puede comprender además un sitio de escisión entre los dos polipéptidos. Al secretar la proteína de fusión, el sitio se escinde y se liberan los dos polipéptidos. Los ejemplos de sitios de escisión incluyen, sin carácter limitante, 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; 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.

Modalidades

[0101] En ciertas modalidades de la invención, la proteasa de la invención exhibe propiedades térmicas beneficiosas tales como termoestabilidad, estabilidad de vapor, propiedades de pH, tales como estabilidad ácida, etc.

Propiedades de acidez/alcalinidad

[0102] En ciertas modalidades de la invención, la proteasa de la invención exhibe propiedades beneficiosas con respecto al pH, tal como estabilidad ácida, etc. La estabilidad de la proteasa a un pH bajo es beneficiosa ya que la proteasa puede tener actividad en el intestino después de pasar a través del estómago. La estabilidad de la proteasa a un pH alto es beneficiosa para la limpieza y lavado ya que las composiciones de detergente a menudo tienen pH alcalino.

En una modalidad de la invención, la proteasa retiene >90% de la actividad después de 2 horas a pH 4 según se determinó utilizando el método descrito en el Ejemplo 4. En otra modalidad de la invención, la proteasa retiene >90% de la actividad después de 2 horas a pH 10 según se determinó utilizando el método descrito en el Ejemplo 4.

[0103] La presente invención proporciona polipéptidos con actividad proteasa y polinucleótidos que codifican los polipéptidos. Las proteasas de la invención son serina proteasas de la familia de peptidasas S1. Las proteasas de la invención exhiben propiedades de pH sorprendentes, especialmente propiedades de estabilidad de pH que las hace candidatos interesantes para su uso en alimentos para animales y/o detergentes.

Rendimiento de lavado

[0104] En ciertas modalidades de la invención, la proteasa de la invención exhibe un rendimiento de lavado beneficioso. Por lo tanto, la proteasa S1 1 de *Dactylosporangium variesporum* es más efectiva para eliminar manchas en comparación con un detergente sin ninguna proteasa. La proteasa S1 de *Dactylosporangium variesporum* es efectiva para eliminar manchas de sangre y huevo incluso a 20°C.

#### Aplicación en alimentos

[0105] La proteasa de la invención es activa en Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA dentro de un amplio intervalo de pH 4-11 y exhibe actividad especialmente alta en el intervalo de pH 6-11, es activa en un sustrato de harina de maíz-harina de soja correspondiente a alimento a valores pH relevantes para el intestino delgado así como el cultivo de aves de corral y retiene más de 70% de actividad después de someterse durante 2 horas a pH tan bajo como 3. Por lo tanto la proteasa S1 1 de *Dactylosporangium variesporum* de la invención es adecuada para varias aplicaciones en alimentos.

#### Fuentes de polipéptidos con actividad proteasa

[0106] Un polipéptido con actividad proteasa de la presente invención se puede obtener a partir de microorganismos de cualquier género. A los efectos de la presente invención, la expresión "obtenido a partir de", tal como se utiliza en la presente en relación con una fuente determinada, significará que el polipéptido codificado por un polinucleótido es producido por la fuente o por una cepa en la cual se ha insertado el polinucleótido procedente de la fuente. En un aspecto, el polipéptido obtenido a partir de una fuente determinada se secreta extracelularmente.

[0107] El polipéptido puede ser un polipéptido bacteriano. Por ejemplo, el polipéptido puede ser un polipéptido bacteriano Gram-positivo tal como un polipéptido de *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Saccharothrix* o *Streptomyces* que tiene actividad proteasa o un polipéptido bacteriano Gram-negativo tal como un polipéptido *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* o *Ureaplasma*.

[0108] En un aspecto, el polipéptido es una proteasa de una bacteria de la clase *Actinobacteria*, tal como del orden *Actinomycetales*, o del suborden *Micromonosporineae*, o de la familia *Micromonosporineae*, o de los géneros *Dactylosporangium*. En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido *Dactylosporangium variesporum*.

Las cepas de estas especies son de dominio público y se puede acceder a ellas fácilmente en una serie de colecciones de cultivos, tales como la *American Type Culture Collection* (ATCC), *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ), *Centraalbureau Voor Schimmelcultures* (CBS) y *Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center* (NRRL). La cepa utilizada está públicamente disponible con el número de acceso ATCC 31203 o DSM 43911.

[0109] El polipéptido puede identificarse y obtenerse de otras fuentes que incluyen microorganismos aislados de muestras naturales (*p.ej.*, suelo, compuestos, agua, etc.) o de ADN obtenidas directamente de materiales naturales (*p.ej.*, suelo, abono, agua, etc.) utilizando las sondas anteriormente mencionadas. Las técnicas para aislar microorganismos y ADN directamente a partir de hábitats naturales son de uso común en la técnica. Un polinucleótido que codifica el polipéptido puede obtenerse mediante el análisis similar de una colección de ADN genómico o ADNc de otro microorganismo o una muestra de ADN mezclada. Una vez que el polinucleótido que codifica un polipéptido ha sido detectado con las sondas, el polinucleótido puede aislarse o clonarse utilizando técnicas que son conocidas por los entendidos en la técnica (ver, *p.ej.*, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

#### Polinucleótidos

[0110] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican un polipéptido de la presente invención como se describe en la presente.

[0111] Las técnicas utilizadas para aislar o clonar un polinucleótido son conocidas en la técnica e incluyen el aislamiento de ADN genómico o ADNc, o una combinación de estos. La clonación de los polinucleótidos de ADN genómico puede efectuarse, *por ejemplo*, mediante el uso de una reacción en cadena de polimerasa (PCR) bien conocida o detección de anticuerpos de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN clonados con características estructurales compartidas. Ver, *por ejemplo*, Innis *et al.*, 1990, *PCR: A Guide to Methods and Application*, Academic Press, Nueva York. También se pueden utilizar otros procedimientos para la amplificación de ácidos nucleicos tal como la reacción en cadena de la ligasa (LCR, por sus siglas en inglés), transcripción activada por la ligadura (LAT, por sus siglas en inglés) y amplificación basada en polinucleótidos (NASBA). Los polinucleótidos

pueden clonarse de una cepa de *Dactylosporangium*, o un organismo relacionado y por lo tanto, por ejemplo, pueden ser una variante alélica o de especie de la región que codifica el polipéptido del polinucleótido.

[0112] La modificación de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser necesaria para sintetizar polipéptidos sustancialmente similares al polipéptido. La expresión "sustancialmente similar" al polipéptido se refiere a formas del polipéptido que no son de origen natural. Estos polipéptidos pueden diferir en cierto modo modificado del polipéptido aislado a partir de su fuente nativa, p. ej., variantes que difieren en la actividad específica, termoestabilidad, pH óptimo o similares. Las variantes pueden construirse a partir del polinucleótido presentado como la secuencia que codifica el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1, p. ej., una subsecuencia de esta, y/o mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos que no provocan un cambio en la secuencia de aminoácidos del polipéptido, pero que corresponden al uso del codón del organismo hospedador destinado a la producción de la enzima, o mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos que pueden dar lugar a una secuencia de aminoácidos diferente. Para consultar una descripción general de una sustitución de nucleótidos, remítase a, p. ej., Ford *et al.*, 1991, *Protein Expression and Purification* 2: 95-107.

Constructos de ácido nucleico

[0113] La presente invención también se refiere a constructos de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido de la presente invención ligado operablemente a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula hospedera adecuada en condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0114] Un polinucleótido se puede manipular de diferentes maneras para hacer posible la expresión del polipéptido. La manipulación del polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar polinucleótidos que utilizan métodos de ADN recombinante son de uso común en la técnica.

[0115] La secuencia de control puede ser un promotor, un polinucleótido que es reconocido por una célula hospedera para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. El promotor contiene secuencias de control de transcripción que median la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier polinucleótido que muestre actividad transcripcional en la célula hospedera, incluidos los promotores híbridos, truncados y mutados, y se puede obtener a partir de genes que codifican polipéptidos intracelulares o extracelulares, tanto homólogos como heterólogos respecto a la célula hospedera.

[0116] Algunos ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácido nucleico de la presente invención en una célula hospedera bacteriana son los promotores obtenidos a partir del gen de la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (*amyQ*), gen de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (*amyL*), gen de la penicilinas de *Bacillus licheniformis* (*penP*), gen de la amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (*amyM*), gen de la levansacarasa de *Bacillus subtilis* (*sacB*), genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis*, gen *cryIIIA* de *Bacillus thuringiensis* (Agaisse y Lereclus, 1994, *Molecular Microbiology* 13: 97-107), operón *lac* de *E. coli*, promotor *trc* de *E. coli* (Egon *et al.*, 1988, *Gene* 69: 301-315), gen de la agarasa *Streptomyces coelicolor* (*dagA*), y gen de la betalactamasa procarionta (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3727-3731), así como el promotor *tac* (DeBoer *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 21-25). Se describen otros promotores en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Gilbert *et al.*, 1980, *Scientific American*, 242: 74-94; y en Sambrook *et al.*, 1989, mencionado anteriormente. En el documento WO 99/43835 se describen ejemplos de promotores en tándem.

[0117] Algunos ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácido nucleico de la presente invención en una célula hospedera de un hongo filamentoso son los promotores obtenidos a partir de los genes de la acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori* (*glaA*), TAKA-amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa-fosfato-isomerasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa similar a tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), amilogucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), Daria de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), Quinn de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), lipasa de *Rhizomucor miehei*, aspártico proteinasa de *Rhizomucor miehei*, beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa IV de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, así como el promotor de NA2-tpi (un promotor modificado procedente de un gen de la alfa-amilasa neutra de *Aspergillus* en el cual el líder no traducido ha sido reemplazado por un líder no traducido procedente de un gen de la triosa-fosfato-isomerasa de *Aspergillus*; los ejemplos no limitantes incluyen promotores modificados procedentes de un gen de la alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* en el cual el líder no traducido ha sido reemplazado por un líder no traducido procedente de un gen de la triosa-fosfato-

isomerasa de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae*); y promotores híbridos, truncados y mutados de estos.

- 5 [0118] En un hospedero de tipo levadura, los promotores útiles se obtienen de los genes para enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, galactocinasa (GAL1) de *Saccharomyces cerevisiae*, deshidrogenasa de alcohol/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ADH1, ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*, triosa fosfato isomerasa (TPI) de *Saccharomyces cerevisiae*, metalotioneína (CUP1) de *Saccharomyces cerevisiae* y 3-fosfoglicerato cinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células hospederas de tipo levadura se describen en Romanos *et al.*, 1992, *Yeast* 8: 423-488.
- 10 [0119] La secuencia de control también puede ser un terminador de la transcripción, el cual es reconocido por una célula hospedera para terminar la transcripción. El terminador está ligado operablemente al extremo 3' del polinucleótido que codifica el polipéptido. Cualquier terminador que es funcional en la célula hospedera puede utilizarse en la presente invención.
- 15 [0120] Los terminadores preferidos para las células hospederas bacterianas se obtienen a partir de los genes de la proteasa alcalina de *Bacillus clausii* (*aprH*), alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (*amyL*) y ARN ribosómico de *Escherichia coli* (*rrnB*).
- 20 [0121] Los terminadores preferidos para las células hospederas de tipo hongo filamentoso se obtienen a partir de los genes de la antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, la TAKA-amilasa de *Aspergillus oryzae* y la proteasa similar a la tripsina de *Fusarium oxysporum*.
- 25 [0122] Los terminadores preferidos para las células hospederas de tipo levadura se obtienen a partir de los genes de la enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, el citocromo C de *Saccharomyces cerevisiae* (CYC1) y la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para células hospederas de tipo levadura se describen en Romanos *et al.*, 1992, mencionado anteriormente.
- 30 [0123] La secuencia de control también puede ser una región estabilizadora de ARNm en dirección 3' respecto a un promotor y en dirección 5' respecto a la secuencia codificante de un gen que aumenta la expresión del gen.
- [0124] Los ejemplos de regiones estabilizadoras de ARNm adecuadas se obtienen de un gen (WO 94/25612) *Bacillus thuringiensis cryIIIA* y un gen SP82 <303 *Bacillus subtilis* (Hue *et al.*, 1995, *Journal of Bacteriology* 177: 3465-3471).
- 35 [0125] La secuencia de control también puede ser un líder, una región no traducida de un ARNm que sea importante para la traducción por parte de la célula hospedera. El líder está ligado operablemente al extremo 5' del polinucleótido que codifica el polipéptido. Se puede utilizar cualquier líder que sea funcional en la célula hospedera.
- 40 [0126] Los líderes preferidos para las células hospederas de tipo hongo filamentoso se obtienen a partir de los genes de la TAKA-amilasa de *Aspergillus oryzae* y la triosa-fosfato-isomerasa de *Aspergillus nidulans*.
- 45 [0127] Los líderes adecuados para las células hospederas de tipo levadura se obtienen a partir de los genes de la enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), 3-fosfoglicerato-cinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y alcohol-deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).
- 50 [0128] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia ligada operablemente al extremo 3' del polinucleótido y, cuando se transcribe, es reconocida por la célula hospedera como una señal para añadir residuos de poliadenosina al ARNm transcrito. Se puede utilizar cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula hospedera.
- 55 [0129] Las secuencias de poliadenilación preferidas para las células hospederas del tipo hongo filamentoso se obtienen de genes de la antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, y proteasa similar a tripsina de *Fusarium oxysporum*.
- [0130] Las secuencias de poliadenilación útiles para las células hospederas de tipo levadura se describen en Guo y Sherman, 1995, *Mol. Cellular Biol.* 15: 5983-5990.
- 60 [0131] La secuencia de control también puede ser una región que codifique un péptido señal, la cual codifica un péptido señal ligado al N-terminal de un polipéptido y dirija el polipéptido a la vía secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante del polinucleótido puede contener de manera intrínseca una secuencia que codifique un

péptido señal ligada de manera natural en el marco de lectura de la traducción al segmento de la secuencia codificante que codifica el polipéptido. De manera alternativa, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una secuencia que codifique un péptido señal que sea exógena respecto a la secuencia codificante.

5 La secuencia que codifica el péptido señal exógena puede ser necesaria cuando la secuencia codificante no contenga de manera natural ninguna secuencia que codifique un péptido señal. Como alternativa, una secuencia que codifica el péptido señal exógena puede simplemente reemplazar la secuencia que codifica el péptido señal natural para mejorar la secreción del polipéptido. Sin embargo, se puede utilizar cualquier secuencia que codifique el péptido señal que dirige el polipéptido expresado a la vía de secreción de una célula hospedera.

10 [0132] Las secuencias que codifican péptidos señal eficaces para células hospederas bacterianas son las secuencias que codifican péptidos señal obtenidas a partir de los genes de la amilasa maltogénica NCIB 11837 de *Bacillus*, la subtilisina de *Bacillus licheniformis*, la beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, las proteasas neutras de *Bacillus stearothermophilus* (*nprT*, *nprS*, *nprM*) y *prsA* de *Bacillus subtilis*. Se describen otros péptidos señal en Simonen y Palva, 1993, *Microbiological Reviews* 57: 109-137.

15 [0133] Las secuencias que codifican un péptido señal efectivas para células hospederas fúngicas filamentosas son las secuencias que codifican un péptido señal obtenidas de los genes para amilasa neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, celulasa de *Humicola insolens*, endoglucanasa V de *Humicola insolens*, lipasa de *Humicola lanuginosa* y proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*.

20 [0134] Los péptidos señal útiles para las células hospederas de tipo levadura se obtienen a partir de los genes del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y de la invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras secuencias que codifican péptidos señal útiles se describen en Romanos *et al.*, 1992, mencionado anteriormente.

25 [0135] La secuencia de control también puede ser una secuencia que codifique un propéptido, la cual codifica un propéptido situado en el N-terminal de un polipéptido. El polipéptido resultante se conoce como una proenzima o un propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Generalmente, un propolipéptido es inactivo y se puede convertir en un polipéptido activo mediante la escisión catalítica o autocatalítica del propéptido a partir del propolipéptido. La secuencia que codifica un propéptido puede obtenerse de los genes para proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* (*aprE*), proteasa neutral de *Bacillus subtilis* (*nprT*), lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836), proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei* y alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae*.

30 [0136] Cuando están presentes las secuencias del péptido de señal y del propéptido, la secuencia del propéptido se sitúa junto al N-terminal del polipéptido y la secuencia del péptido de señal se sitúa junto al N-terminal de la secuencia de propéptido.

35 [0137] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que regulen la expresión del polipéptido en relación con el cultivo de la célula hospedera. Algunos ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que provocan la expresión del gen que se ha de activar o desactivar como respuesta a un estímulo físico o químico, incluida la presencia de un compuesto regulador. Los sistemas reguladores en sistemas procariontes incluyen los sistemas operadores *lac*, *tac* y *trp*. En levaduras, se puede utilizar el sistema ADH2 o el sistema GAL1. En hongos filamentosos, se pueden utilizar el promotor de la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, el promotor de la TAKA-alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae* y el promotor de la glucoamilasa de *Aspergillus oryzae*. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación génica. En sistemas eucariotas, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de la dihidrofolato-reductasa, que se amplifica en presencia de metotrexato, y los genes de las metalotioneínas, que se amplifican con metales pesados. En estos casos, el polinucleótido que codifica el polipéptido estaría ligado operablemente a la secuencia reguladora.

#### Vectores de expresión

50 [0138] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido de la presente invención, un promotor y señales terminadoras de la transcripción y la traducción. Las diversas secuencias de nucleótidos y de control pueden unirse para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o la sustitución del polinucleótido que codifica el polipéptido en tales sitios. Como alternativa, el polinucleótido se puede expresar insertando el polinucleótido o un constructo de ácido nucleico que comprenda el polinucleótido en un vector apropiado para la expresión. Cuando se crea el vector de expresión, la secuencia codificante se sitúa en el vector de modo que la secuencia codificante esté ligada operablemente a las secuencias de control adecuadas para la expresión.

60 [0139] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (*por ejemplo*, un plásmido o virus) que puede

someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y puede provocar una expresión del polinucleótido. La elección del vector dependerá normalmente de la compatibilidad del vector con la célula hospedera en la cual se vaya a introducir el vector. El vector puede ser un plásmido lineal o circular cerrado.

5 [0140] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que exista como una entidad extracromosómica, cuya replicación sea independiente de la replicación cromosómica, p. ej., un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para garantizar la autorreplicación. Como alternativa, el vector puede ser aquel que, cuando se introduzca en la célula hospedera, se integre en el genoma y se replique junto con el o los cromosomas en los cuales se haya integrado. Además, se puede utilizar un único vector o plásmido, o se pueden utilizar dos o más vectores o plásmidos que contengan de forma conjunta el ADN total que se ha de introducir en el genoma de la célula hospedera, o se puede utilizar un transposón.

15 [0141] El vector contiene preferentemente uno o más marcadores seleccionables que permiten una selección sencilla de las células transformadas, transfectadas, transducidas o similares. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia a virus o biocidas, resistencia a metales pesados, prototrofia a los auxótrofos y similares.

20 [0142] Los ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son genes *dal* de *Bacillus licheniformis* o *Bacillus subtilis*, o marcadores que confieren resistencia a antibióticos como resistencia a la ampicilina, cloranfenicol, kanamicina, neomicina, espectinomycinina o tetraciclina. Algunos marcadores adecuados para células hospedadoras de tipo levadura incluyen, sin carácter limitante, ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Los marcadores seleccionables que se pueden utilizar en una célula hospedera de tipo hongo filamentoso incluyen, sin carácter limitante, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina-carbamoiltransferasa), *bar* (fosfotricina-acetiltransferasa), *hph* (higromicina-fosfotransferasa), *niaD* (nitrato-reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa), *sC* (sulfato-adeniltransferasa) y *trpC* (antranilato sintasa), así como también sus equivalentes. Se prefieren para su uso en una célula de *Aspergillus* los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y un gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.

30 [0143] El vector contiene preferentemente uno o más elementos que permiten la integración del vector en el genoma de la célula hospedera o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

35 [0144] La integración del vector en el genoma de la célula hospedera puede depender de la secuencia del polinucleótido que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para la integración en el genoma mediante recombinación homóloga o no homóloga. Como alternativa, el vector puede contener polinucleótidos adicionales para dirigir la integración mediante recombinación homóloga en el genoma de la célula hospedera en una o más ubicaciones concretas en el cromosoma o los cromosomas. Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación concreta, los elementos de integración deben contener un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como entre 100 y 10 000 pares de bases, entre 400 y 10 000 pares de bases y entre 800 y 10 000 pares de bases, que posean un grado de identidad secuencial elevado respecto a la secuencia diana correspondiente para aumentar la probabilidad de una recombinación homóloga. Los elementos de integración pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga con la secuencia diana en el genoma de la célula hospedera. Además, los elementos de integración pueden ser polinucleótidos codificantes o no codificantes. Por otra parte, el vector se puede integrar en el genoma de la célula hospedera mediante recombinación no homóloga.

45 [0145] Para la replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permita que el vector se replique de manera autónoma en la célula hospedera en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador plasmídico que regule la replicación autónoma que esté en funcionamiento en una célula. La expresión "origen de replicación" o "replicador plasmídico" se refiere a un polinucleótido que permite la replicación *in vivo* de un plásmido o vector.

50 [0146] Algunos ejemplos de orígenes de replicación bacterianos son los orígenes de replicación de los plásmidos pBR322, pUC19, pACYC177 y pACYC184, que permiten la replicación en *E. coli*, y pUB110, pE194, pTA1060 y pAMB1, que permiten la replicación en *Bacillus*.

55 [0147] Algunos ejemplos de orígenes de replicación que se pueden utilizar en células hospederas de tipo levadura son los orígenes de replicación de 2 micras, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6.

60 [0148] Algunos ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula de tipo hongo filamentoso son AMA1 y ANS1 (Gems *et al.*, 1991, *Gene* 98: 61-67; Cullen *et al.*, 1987, *Nucleic Acids Res.* 15: 9163-9175; WO 00/24883). El

aislamiento del gen AMA1 y la construcción de plásmidos o vectores que comprenden el gen se pueden conseguir de acuerdo con los métodos descritos en el documento WO 00/24883.

[0149] Se puede insertar más de una copia de un polinucleótido de la presente invención en una célula hospedera para incrementar la producción de un polipéptido. Se puede conseguir aumentar el número de copias del polinucleótido integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula hospedera o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con el polinucleótido, donde las células que contengan copias amplificadas del gen marcador seleccionable y, de este modo, copias adicionales del polinucleótido, se puedan seleccionar mediante el cultivo de las células en presencia del agente de selección apropiado.

[0150] Los procedimientos utilizados para ligar los elementos descritos anteriormente con el fin de construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son muy conocidos por los expertos en la técnica (remítase, p. ej., a Sambrook *et al.*, 1989, mencionado anteriormente).

#### Células hospederas

[0151] La presente invención también se refiere a células hospederas recombinantes, que es un recombinante para el polinucleótido de la presente invención, que comprenden un polinucleótido de la presente invención ligado operablemente a una o más secuencias de control que dirigen la producción de un polipéptido de la presente invención. Un constructo o vector que comprende un polinucleótido se introduce en una célula hospedera de modo que el constructo o vector se mantenga como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicante, tal como se ha descrito anteriormente. La expresión "célula hospedera" abarca cualquier progenie de una célula original que no sea idéntica a la célula original debido a mutaciones que ocurren durante la replicación. La elección de una célula hospedera dependerá en gran medida del gen que codifique el polipéptido y de su fuente.

[0152] La célula hospedera puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de un polipéptido de la presente invención, p. ej., una célula procariota o eucariota.

[0153] La célula hospedera procariota puede ser cualquier bacteria grampositiva o gramnegativa. Las bacterias grampositivas incluyen, sin carácter limitante, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Streptomyces*. Las bacterias gramnegativas incluyen, sin carácter limitante, *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Ureaplasma*.

[0154] La célula hospedera bacteriana puede ser cualquier célula de *Bacillus*, incluidas, sin carácter limitante, las células 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* y *Bacillus thuringiensis*.

[0155] La célula hospedera bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptococcus*, incluidas, sin carácter limitante, las células de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*.

[0156] La célula hospedera bacteriana también puede ser una célula de *Streptomyces* que incluye, sin carácter limitante, células de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, y *Streptomyces lividans*.

[0157] La introducción de ADN en una célula de *Bacillus* se puede efectuar mediante la transformación del protoplasto (remítase, p. ej., a Chang y Cohen, 1979, *Mol. Gen. Genet.* 168: 111-115), la transformación de células competentes (remítase, p. ej., a Young y Spizizen, 1961, *J. Bacteriol.* 81: 823-829, o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, *J. Mol. Biol.* 56: 209-221), electroporación (remítase, p. ej., a Shigekawa y Dower, 1988, *Biotechniques* 6: 742-751) o conjugación (remítase, p. ej., a Koehler y Thorne, 1987, *J. Bacteriol.* 169: 5271-5278). La introducción de ADN en una célula *E. coli* puede realizarse mediante transformación de protoplastos (ver, *por ejemplo*, Hanahan, 1983, *J. Mol. Biol.* 166: 557-580) o electroporación (remítase, p. ej., a Dower *et al.*, 1988, *Nucleic Acids Res.* 16: 6127-6145). La introducción de ADN en una célula de *Streptomyces* puede realizarse mediante transformación de protoplastos, electroporación (ver, *por ejemplo*, Gong *et al.*, 2004, *Folia Microbiol. (Praha)* 49: 399-405), conjugación (remítase, p. ej., a Mazodier *et al.*, 1989, *J. Bacteriol.* 171: 3583-3585) o transducción (remítase, p. ej., a Burke *et al.*, 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 6289-6294). La introducción de ADN en una célula de *Pseudomonas* se puede efectuar mediante electroporación (remítase, p. ej., a Choi *et al.*, 2006, *J. Microbiol. Methods* 64: 391-397) o conjugación (remítase, p. ej., a Pinedo y Smets, 2005, *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 51-57). La introducción de ADN en una célula de *Streptococcus* se puede efectuar mediante competencia natural (remítase, p. ej., a Perry y Kuramitsu, 1981, *Infect.*

*Immun.* 32: 1295-1297), transformación del protoplasto (remítase, p. ej., a Catt y Jollick, 1991, *Microbios* 68: 189-207), electroporación (remítase, p. ej., a Buckley *et al.*, 1999, *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3800-3804) o conjugación (remítase, p. ej., a Clewell, 1981, *Microbiol. Rev.* 45: 409-436). Sin embargo, se puede utilizar cualquier método conocido en la técnica para introducir ADN en una célula hospedera.

5 [0158] La célula hospedera también puede ser una célula eucariota tal como una célula fúngica, vegetal, de insectos o de mamíferos.

10 [0159] La célula hospedera puede ser una célula fúngica. El término "hongos", tal como se utiliza en la presente, incluye los filos *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* y *Zygomycota*, así como *Oomycota* y todos los hongos mitospóricos (según definen Hawksworth *et al.* en *Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi*, 8.<sup>a</sup> edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido).

15 [0160] La célula hospedera fúngica puede ser una célula de levadura. El término "levadura", tal como se utiliza en la presente, incluye levaduras que se reproducen por ascosporas (*Endomycetales*), levaduras que se reproducen por basidiosporas y levaduras que pertenecen a los hongos imperfectos (*Blastomycetes*). Debido a que la clasificación de las levaduras puede cambiar en el futuro, a efectos de esta invención, las levaduras se definirán según se describe en *Biology and Activities of Yeast* (Skinner, Passmore y Davenport, editores, *Soc. App. Bacteriol. Symposium Series N.º 9*, 1980).

20 [0161] La célula hospedera tipo levadura puede ser una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o de *Yarrowia*, como una célula de *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oviformis*, o *Yarrowia lipolytica*.

25 [0162] La célula hospedera fúngica puede ser una célula de tipo hongo filamentoso. La expresión "hongos filamentosos" incluye todas las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycota* y *Oomycota* (según definen Hawksworth *et al.*, 1995, mencionado previamente). Los hongos filamentosos se caracterizan generalmente por tener una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo tiene lugar mediante la elongación de la hifa y el catabolismo del carbono es obligatoriamente aeróbico. En cambio, el crecimiento vegetativo de levaduras, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, tiene lugar mediante la gemación de un talo unicelular y el catabolismo del carbono puede ser fermentativo.

35 [0163] La célula hospedera de tipo hongo filamentoso puede ser una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes* o *Trichoderma*.

40 [0164] Por ejemplo, la célula hospedera de tipo hongo filamentoso puede ser una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium pannicola*,  
45 *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*,  
50 *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

55 [0165] Las células fúngicas se pueden transformar mediante un proceso que implica la formación de protoplastos, la transformación de protoplastos y la regeneración de la pared celular de una manera conocida *per se*. Se describen procedimientos adecuados para la transformación de células hospederas de *Aspergillus* y *Trichoderma* en el documento EP 238023, Yelton *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1470-1474, y Christensen *et al.*, 1988, *Bio/Technology* 6: 1419-1422. Se describen métodos adecuados para transformar especies de *Fusarium* en Maladier  
60 *et al.*, 1989, *Gene* 78: 147-156 y WO 96/00787. La levadura se puede transformar utilizando los procedimientos descritos por Becker y Guarente en Abelson, J.N. y Simon, M.I., editores, *Guide to Yeast Genetics and Molecular*

*Biology, Methods in Enzymology*, Volumen 194, págs. 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito *et al.*, 1983, *J. Bacteriol.* 153: 163; y Hinnen *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1920.

#### Métodos de producción

5

[0166] La presente divulgación también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención, que comprenden (a) cultivar una célula, que en su forma natural produce el polipéptido, en condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido. En un aspecto preferido, la célula es una célula *Bacillus*. En un aspecto más preferido, la célula es una célula *Bacillus licheniformis*. En otro aspecto, la célula es una célula *Dactylosporangium*. En un aspecto más preferido, la célula es una célula *Dactylosporangium variesporum*.

10

[0167] La presente divulgación también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención, que comprenden (a) cultivar una célula hospedera recombinante de la presente invención en condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.

15

[0168] Las células hospederas se cultivan en un medio nutriente adecuado para la producción del polipéptido utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar mediante el cultivo en un matraz agitado o la fermentación a pequeña escala o gran escala (incluidas las fermentaciones continua, discontinua, por lote alimentado o de estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales, llevada a cabo en un medio adecuado y en condiciones que permitan que el polipéptido se exprese y/o se aisle. El cultivo tiene lugar en un medio nutriente adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados se pueden adquirir de proveedores comerciales o se pueden preparar de acuerdo con las composiciones publicadas (p. ej., en los catálogos de la American Type Culture Collection). Si el polipéptido se secreta en el medio nutriente, el polipéptido se puede recuperar directamente del medio. Si el polipéptido no se secreta, se puede recuperar a partir de los lisados celulares.

20

25

[0169] El polipéptido se puede detectar utilizando métodos de uso común en la técnica que son específicos para los polipéptidos. Estos métodos de detección incluyen, sin carácter limitante, el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto enzimático o la desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, se puede utilizar un ensayo enzimático para determinar la actividad del polipéptido.

30

[0170] El polipéptido se puede recuperar utilizando métodos de uso común en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido puede recuperarse del medio nutriente mediante procedimientos convencionales que incluyen, sin carácter limitante, recolección, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

35

[0171] El polipéptido puede purificarse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, sin carácter limitante, cromatografía (p.ej., de intercambio iónico, de afinidad, hidrófoba, cromatoenfoco, y de exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (p.ej., enfoque isoelectrico preparativo), solubilidad diferencial (p.ej., precipitación con sulfato de amonio), SDS-PAGE, o extracción (remítase a, p.ej., *Protein Purification*, Janson y Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989) para obtener polipéptidos sustancialmente puros.

40

[0172] En un aspecto alternativo, en lugar de recuperar el polipéptido, se utiliza una célula hospedera de la presente invención que expresa el polipéptido como una fuente del polipéptido.

45

#### Plantas

[0173] La presente divulgación también se relaciona con plantas aisladas, *p.ej.*, una planta transgénica, parte de una planta, o una célula vegetal, que comprende un polinucleótido de la presente invención para expresar y producir un polipéptido o dominio en cantidades recuperables. El polipéptido o dominio pueden recuperarse de la planta o parte de la planta. Alternativamente, la planta o parte de la planta que contiene el polipéptido o dominio puede utilizarse como tal para mejorar la calidad de un alimento o pienso, *p.ej.*, mejorando el valor nutricional, la palatabilidad, y las propiedades reológicas, o para destruir un factor antinutritivo.

50

[0174] La planta transgénica puede ser una dicotiledónea (una dicot) o monocotiledónea (una monocot). Algunos ejemplos de plantas monocotiledóneas son las gramíneas, tales como la espiguilla (pasto azul, *Poa*), pasto forrajero tal como *Festuca*, *Lolium*, pasto de zonas templadas, tal como *Agrostis*, y cereales, p. ej., trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo y maíz.

55

[0175] Algunos ejemplos de plantas dicotiledóneas son el tabaco, las legumbres, tales como altramuces, papa, remolacha azucarera, chicharo, frijol y soja, y las plantas crucíferas (familia *Brassicaceae*), tales como la coliflor, la colza, y el organismo modelo *Arabidopsis thaliana* estrechamente relacionado.

60

- 5 [0176] Algunos ejemplos de las partes de una planta son el tallo, callo, hojas, raíces, frutos, semillas y tubérculos, así como también los tejidos individuales que comprenden estas partes, p. ej., epidermis, mesofilo, parénquima, tejidos vasculares, meristemas. También se considera que los compartimientos celulares vegetales específicos, tales como los cloroplastos, apoplastos, mitocondria, vacuolas, peroxisomas y citoplasma, son una parte de la planta. Asimismo, se considera que cualquier célula vegetal, independientemente del origen del tejido, es una parte de la planta. Del mismo modo, las partes de una planta tales como las células y los tejidos específicos aislados para facilitar el uso de la invención también se consideran partes de una planta, p. ej., los embriones, endospermos, y las capas de aleurona y seminales.
- 10 [0177] También se incluyen dentro del alcance de la presente divulgación la progenie de tales plantas, partes de una planta y células vegetales.
- 15 [0178] La planta transgénica o la célula vegetal que expresa el polipéptido o dominio puede construirse de conformidad con los métodos conocidos en la técnica. En resumen, una planta o una célula vegetal se construye incorporando uno o más constructos de expresión que codifican el polipéptido o dominio en el genoma hospedero de la planta o el genoma del cloroplasto y propagando la planta o célula vegetal modificada resultante en una planta transgénica o una célula vegetal.
- 20 [0179] El constructo de expresión es convenientemente un constructo de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido o dominio unido operativamente con secuencias regulatorias adecuadas necesarias para la expresión del polinucleótido en la planta o parte de la planta de elección. Asimismo, el constructo de expresión puede comprender un marcador seleccionable útil para identificar las células vegetales dentro de las cuales se ha integrado el constructo de expresión y las secuencias de ADN necesarias para la introducción del constructo en la planta en cuestión (esto último depende del método de introducción de ADN a utilizar).
- 25 [0180] La elección de secuencias regulatorias, como secuencias promotoras y terminadoras y secuencias opcionalmente de señal o tránsito, se determina, por ejemplo, sobre la base de cuándo, dónde y cómo se desea que el polipéptido o dominio se exprese. Por ejemplo, la expresión del gen que codifica un polipéptido o dominio puede ser constitutivo o inducible, o puede ser de desarrollo, etapa, o específico del tejido y el producto génico puede estar dirigido a un tejido o parte de la planta específico como semillas u hojas. Se describen secuencias reguladoras, por ejemplo, en Tague *et al.*, 1988, *Plant Physiology* 86: 506.
- 30 [0181] Para la expresión constitutiva, puede utilizarse el promotor 35S-CaMV de la ubiquitina 1 de maíz o el promotor de la actina 1 de arroz (Franck *et al.*, 1980, *Cell* 21: 285-294; Christensen *et al.*, 1992, *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689; Zhang *et al.*, 1991, *Plant Cell* 3: 1155-1165). Los promotores específicos para un órgano pueden ser, por ejemplo, un promotor de tejidos sumidero de almacenamiento tales como semillas, tubérculos de papa y frutos (Edwards y Coruzzi, 1990, *Ann. Rev. Genet.* 24: 275-303), o de tejidos sumidero metabólicos tales como meristemas (Ito *et al.*, 1994, *Plant Mol. Biol.* 24: 863-878), un promotor específico para las semillas tal como el promotor de la glutelina, prolamina, globulina o albúmina del arroz (Wu *et al.*, 1998, *Plant Cell Physiol.* 39: 885-889), un promotor de *Vicia faba* de la legúmina B4 y el gen de la proteína seminal desconocido de *Vicia faba* (Conrad *et al.*, 1998, *J. Plant Physiol.* 152: 708-711), un promotor de una proteína del cuerpo graso seminal (Chen *et al.*, 1998, *Plant Cell Physiol.* 39: 935-941), el promotor de la proteína de almacenamiento *napA* de *Brassica napus* o cualquier otro promotor específico para las semillas conocido en la técnica, p. ej., como los descritos en el documento WO 91/14772. Además, el promotor puede ser un promotor específico para las hojas tal como el promotor *rbcS* del arroz o el tomate (Kyojuka *et al.*, 1993, *Plant Physiol.* 102: 991-1000), el promotor del gen de la adenina-metiltransferasa del virus de la clorela (Mitra y Higgins, 1994, *Plant Mol. Biol.* 26: 85-93), el promotor del gen *aldP* del arroz (Kagaya *et al.*, 1995, *Mol. Gen. Genet.* 248: 668-674) o un promotor inducible por lesión tal como el promotor *pin2* de la papa (Xu *et al.*, 1993, *Plant Mol. Biol.* 22: 573-588). Asimismo, el promotor puede inducirse mediante tratamientos abióticos tales como temperatura, sequía o alteraciones en salinidad o inducirse mediante sustancias aplicadas exógenamente que activan el promotor, *por ejemplo*, etanol, estrógenos, hormonas vegetales tales como etileno, ácido abscísico y ácido giberélico y metales pesados.
- 45 [0182] Un elemento mejorador del promotor puede utilizarse también para lograr una mayor expresión de un polipéptido o dominio en la planta. Por ejemplo, el elemento mejorador del promotor puede ser un intrón que se coloca entre el promotor y el polinucleótido que codifica el polipéptido o dominio. Por ejemplo, Xu *et al.*, 1993, mencionado anteriormente, describen el uso del primer intrón del gen de actina 1 del arroz para potenciar la expresión.
- 50 [0183] El gen marcador seleccionable y cualesquiera otras partes del constructo de expresión se pueden seleccionar entre las disponibles en la técnica.
- 55
- 60

[0184] El constructo de ácido nucleico se incorpora en el genoma vegetal de acuerdo con técnicas convencionales conocidas en la técnica, que incluyen la transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por virus, microinyección, bombardeo de partículas, transformación biolística y electroporación (Gasser *et al.*, 1990, *Science* 244: 1293; Potrykus, 1990, *Bio/Technology* 8: 535; Shimamoto *et al.*, 1989, *Nature* 338: 274).

[0185] La transferencia de genes mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es un método para generar dicotiledóneas transgénicas (para una reseña, remítase a Hooykas y Schilperoort, 1992, *Plant Mol. Biol.* 19: 15-38) y para transformar monocotiledóneas, aunque se pueden utilizar otros métodos de transformación para estas plantas. Un método para generar monocotiledóneas transgénicas es el bombardeo de partículas (partículas de oro o de tungsteno microscópicas recubiertas con el ADN transformante) de callos embrionarios o embriones en desarrollo (Christou, 1992, *Plant J.* 2: 275-281; Shimamoto, 1994, *Curr. Opin. Biotechnol.* 5: 158-162; Vasil *et al.*, 1992, *Bio/Technology* 10: 667-674). Un método alternativo para la transformación de monocotiledóneas se basa en la transformación de protoplastos tal como se describe en Omirulleh *et al.*, 1993, *Plant Mol. Biol.* 21: 415-428. Otros métodos de transformación incluyen aquellos descritos en las patentes de EE. UU. N.ºs 6.395.966 y 7.151.204. Tras la transformación, se seleccionan los transformantes que han incorporado el constructo de expresión y se regeneran en forma de plantas completas de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Habitualmente el procedimiento de transformación está diseñado para la eliminación selectiva de genes de selección, ya sea durante la regeneración o en las siguientes generaciones utilizando, por ejemplo, la cotransformación con dos constructos de ADN-T independientes o la escisión específica para el sitio del gen de selección mediante una recombinasa específica.

[0186] Además de la transformación directa de un genotipo vegetal particular con un constructo de la presente invención, las plantas transgénicas se pueden crear cruzando una planta que contenga el constructo con una segunda planta que carezca del constructo. Por ejemplo, se puede introducir un constructo que codifica un polipéptido o dominio en una variedad vegetal particular mediante cruce, sin necesidad de transformar directamente en todo momento una planta de la variedad. Por lo tanto, la presente invención no abarca únicamente una planta regenerada directamente a partir de células que han sido transformadas de acuerdo con la presente invención, sino también la progenie de tales plantas. El término "progenie", tal como se utiliza en la presente, se puede referir a la descendencia de cualquier generación de una planta progenitora preparada de acuerdo con la presente invención. La progenie puede incluir un constructo de ADN preparado de acuerdo con la presente invención. El cruzamiento da como resultado la introducción de un transgén en una línea vegetal por polinización cruzada de una línea inicial con una línea vegetal donante. Algunos ejemplos no limitantes de estos pasos se describen en la Patente de EE. UU. N.º 7,151,204.

[0187] Se pueden generar plantas mediante un proceso de conversión por retrocruzamiento. Por ejemplo, las plantas incluyen plantas denominadas híbridas, endogámicas, de línea o genotipo convertido por retrocruzamiento.

[0188] Se pueden utilizar marcadores genéticos para facilitar la introgresión de uno o más transgenes de la invención de un contexto genético a otro. La selección asistida por marcadores ofrece ventajas frente al cultivo selectivo convencional, ya que se puede utilizar para evitar errores debidos a las variaciones fenotípicas. Además, los marcadores genéticos pueden proporcionar datos referentes al grado relativo del germoplasma élite en la progenie individual de un cruzamiento particular. Por ejemplo, cuando una planta con un rasgo deseado, que por lo demás tiene un contexto genético no deseable desde un punto de vista agronómico, se cruza con un progenitor élite, se pueden emplear marcadores genéticos para seleccionar la progenie que no solamente posea el rasgo de interés, sino que también posea una proporción relativamente grande del germoplasma deseado. De este modo, se minimiza el número de generaciones requeridas para introgresar uno o más rasgos en un contexto genético particular.

[0189] La presente divulgación también se relaciona con métodos para producir un polipéptido o dominio de la presente invención que comprende (a) cultivar una planta transgénica o una célula vegetal que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido o dominio en condiciones tendientes a la producción del polipéptido o dominio; y (b) recuperar el polipéptido o dominio.

#### Péptido señal y propéptido

[0190] La presente divulgación también se refiere a un polinucleótido aislado que codifica un péptido señal que comprende o está constituido por los aminoácidos comprendidos entre el aminoácido -185 y el -157 de la SEQ ID NO: 2. La presente divulgación también se refiere a un polinucleótido aislado que codifica un propéptido que comprende o está constituido por los aminoácidos comprendidos entre el aminoácido -156 y el -1 de la SEQ ID NO: 2. La presente divulgación también se refiere a un polinucleótido aislado que codifica un péptido señal y un propéptido que comprende o está constituido por los aminoácidos (-185)-(-1) de la SEQ ID NO: 2. Los polinucleótidos pueden comprender además un gen que codifica una proteína, el cual está ligado operablemente al péptido señal y/o

propéptido. La proteína es preferentemente exógena respecto al péptido señal y/o propéptido. En un aspecto, el polipéptido que codifica el péptido señal está constituido por los nucleótidos comprendidos entre el nucleótido 101 y 187 de la SEQ ID NO: 1. En otro aspecto, el polipéptido que codifica el propéptido está constituido por los nucleótidos comprendidos entre el nucleótido 188 y 655 de la SEQ ID NO: 1. En otro aspecto, el polinucleótido que codifica el péptido señal y el propéptido está constituido por los nucleótidos comprendidos entre el nucleótido 101 y 655 de la SEQ ID NO: 1.

[0191] La presente divulgación también se refiere a constructos de ácidos nucleicos, vectores de expresión y células hospederas recombinantes que comprenden polinucleótidos de este tipo.

#### Composiciones detergentes

[0192] En una modalidad, la invención se dirige a composiciones detergentes que comprenden un polipéptido de la presente invención en combinación con uno o más componentes de la composición de limpieza adicional. Por lo tanto, una modalidad, la presente invención se refiere a una composición detergente que comprende un polipéptido aislado que tiene una identidad secuencial respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de 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%, que tiene actividad proteasa.

[0193] La elección de los componentes adicionales se encuentra dentro de las competencias del experto e incluye ingredientes convencionales, incluidos los componentes ilustrativos no limitantes que se exponen a continuación. La elección de los componentes puede incluir, para el cuidado de telas, tener en cuenta el tipo de tela que se ha de limpiar, el tipo y/o grado de suciedad, la temperatura a la cual va a tener lugar la limpieza y la formulación del producto detergente. Aunque los componentes que se mencionan a continuación están clasificados según un título general de acuerdo con una funcionalidad particular, esto no debe interpretarse como una limitación, ya que un componente puede comprender funcionalidades adicionales que el experto en la técnica podrá apreciar.

#### Enzima de la presente invención

[0194] En una modalidad de la presente invención, el polipéptido de la presente invención puede agregarse a una composición detergente en una cantidad que corresponde a 0.001-200 mg de proteína, tal como 0.005-100 mg de proteína, preferiblemente 0.01-50 mg de proteína, más preferiblemente 0.05-20 mg de proteína, incluso más preferible 0.1-10 mg de proteína por litro de solución de lavado.

[0195] La o las enzimas de la composición detergente de la invención pueden estabilizarse utilizando agentes de estabilización convencionales, *por ejemplo*, un poliol tal como propilenglicol o glicerol, un 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 borónico de fenilo tal como ácido 4-formilfenil borónico, y la composición puede formularse como se describe en, *por ejemplo*, los documentos WO92/19709 y WO92/19708 o los polipéptidos de acuerdo con la invención pueden estabilizarse utilizando aldehídos de péptido o cetonas tales como las descritas en los documentos WO 2005/105826 y WO 2009/118375.

[0196] Un polipéptido de la presente invención también se puede incorporar a las formulaciones detergentes descritas en el documento WO97/07202.

#### Tensioactivos

[0197] La composición detergente puede comprender uno o más tensioactivos, los cuales pueden ser aniónicos y/o catiónicos y/o no iónicos y/o semipolares y/o zwitteriónicos o una mezcla de estos. En una modalidad particular, la composición detergente incluye una mezcla de uno o más tensioactivos no iónicos y uno o más tensioactivos aniónicos. El o los tensioactivos están presentes normalmente en un nivel comprendido entre aproximadamente un 0.1% y un 60% en peso, tal como entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 40%, o entre aproximadamente un 3% y aproximadamente un 20%, o entre aproximadamente un 3% y aproximadamente un 10%. El tensioactivo o los tensioactivos se seleccionan en función de la aplicación de limpieza deseada e incluyen cualquier tensioactivo o cualesquiera tensioactivos convencionales conocidos en la técnica. Se puede utilizar cualquier tensioactivo conocido en la técnica por su uso en detergentes.

[0198] Cuando se incluya en el detergente, este contendrá normalmente entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 40% en peso, *por ejemplo*, entre aproximadamente un 5% y aproximadamente un 30%, incluido entre aproximadamente un 5% y aproximadamente un 15%, o entre aproximadamente un 20% y aproximadamente un 25% de un tensioactivo aniónico. Los ejemplos no limitantes de tensioactivos aniónicos incluyen sulfatos y

sulfonatos, en particular, alquilbencenosulfonatos lineales (LAS), isómeros de LAS, alquilbencenosulfonatos ramificados (BABS), fenilalcanosulfonatos, alfa-olefinsulfonatos (AOS), olefinsulfonatos, alquenosulfonatos, alcanos-2,3-diilbis(sulfatos), hidroxialcanosulfonatos y disulfonatos, alquilsulfatos (AS) tales como dodecilsulfato sódico (SDS), sulfatos de alcoholes grasos (FAS), sulfatos de alcoholes primarios (PAS), sulfatos de éteres de alcoholes (AES o AEOS o FES, también conocidos como etoxisulfatos de alcoholes o sulfatos de éteres de alcoholes grasos), alcanosulfonatos secundarios (SAS), sulfonatos de parafina (PS), sulfonatos de ésteres, ésteres de glicerol y ácidos grasos sulfonados, ésteres metílicos de ácidos grasos alfa-sulfonados (alfa-SFMe o SES) incluido el sulfonato de un éster metílico (MES), ácido alquil- o alqueniilsuccínico, ácido dodecenil/tetradecenilsuccínico (DTSA), derivados de tipo ácido graso de aminoácidos, diésteres y monoésteres del ácido sulfosuccínico o jabón y combinaciones de estos.

[0199] Cuando se incluya en el detergente, este contendrá normalmente entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 40% en peso de un tensioactivo catiónico. Los ejemplos no limitantes de tensioactivos catiónicos incluyen los compuestos alquildimetiletanolamina cuat (ADMEAQ), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), cloruro de dimetildistearilamonio (DSDMAC), alquilbencildimetilamonio, amonio cuaternario alquilo, amonio cuaternario alcoxlado (AQA) y combinaciones de los mismos.

[0200] Cuando se incluya en el detergente, este contendrá normalmente entre aproximadamente un 0.2% y aproximadamente un 40% en peso de un tensioactivo no iónico, por ejemplo, entre aproximadamente un 0.5% y aproximadamente un 30%, en particular entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 20%, entre aproximadamente un 3% y aproximadamente un 10%, tal como entre aproximadamente un 3% y aproximadamente un 5% o entre aproximadamente un 8% y aproximadamente un 12%. Los ejemplos no limitantes de tensioactivos no iónicos incluyen etoxilatos de alcohol (AE o AEO), propoxilatos de alcohol, alcoholes grasos propoxilados (PFA), ésteres de ácidos grasos alcoxlados, tales como ésteres de alquilo de ácidos grasos etoxilados y/o propoxilados, etoxilados de alquilfenol (APE), etoxilados de nonilfenol (NPE), alquilpoliglicósidos (APG), aminas alcoxladas, monoetanolamidas de ácidos grasos (FAM), dietanolamidas de ácidos grasos (FADA), monoetanolamidas de ácidos grasos etoxilados (EFAM), monoetanolamidas de ácidos grasos propoxilados (PFAM), amidas de ácidos grasos de polihidroxialquilo o derivados N-acilo N-alquilo de glucosamina (glucamidas, GA o glucamida de ácido graso, FAGA), así como productos disponibles con las marcas SPAN y TWEEN, y combinaciones de los mismos.

[0201] Cuando se incluya en el detergente, este contendrá normalmente entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 40% en peso de un tensioactivo semipolar. Los ejemplos no limitantes de tensioactivos semipolares incluyen óxidos de aminas (AO) tales como óxido de alquildimetilamina, óxido de *N*-(alquilo de coco)-*N,N*-dimetilamina y óxido de *N*-(alquilo de sebo)-*N,N*-bis(2-hidroxietil)amina, alcanolamidas de ácidos grasos y alcanolamidas de ácidos grasos etoxilados, y combinaciones de estos.

[0202] Cuando se incluya en el detergente, este contendrá normalmente entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 40% en peso de un tensioactivo zwitteriónico. Los ejemplos no limitantes de tensioactivos zwitteriónicos incluyen betaína, alquildimetilbetaína y sulfobetaina, y combinaciones de estas.

#### Hidrótropos

[0203] Un hidrótopo es un compuesto que solubiliza compuestos hidrófobos en soluciones acuosas (o, al contrario, sustancias polares en un entorno no polar). Típicamente, los hidrótopos tienen carácter hidrófilo e hidrófobo (las denominadas propiedades anfílicas como se conoce de los tensioactivos); sin embargo, la estructura molecular de los hidrótopos generalmente no favorece la autoagregación espontánea, remítase, por ejemplo, al artículo de revisión de Hodgdon y Kaler (2007), *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 12: 121-128. Los hidrótopos no presentan ninguna concentración crítica por encima de la cual tenga lugar la autoagregación, como se observa para los tensioactivos y lípidos que forman fases micelares, lamelares u otras mesofases bien definidas. En su lugar, muchos hidrótopos presentan un proceso de agregación de tipo continuo, en el cual los tamaños de los agregados crecen a medida que se incrementa la concentración. Sin embargo, muchos hidrótopos modifican el comportamiento fásico, la estabilidad y las propiedades coloidales de los sistemas que contienen sustancias de carácter polar y no polar, incluidas las mezclas de agua, aceite, tensioactivos y polímeros. Los hidrótopos se han utilizado clásicamente en diferentes industrias, desde la farmacéutica, de cuidado personal y alimentaria hasta las aplicaciones técnicas. El uso de hidrótopos en composiciones detergentes permite obtener, por ejemplo, formulaciones más concentradas de tensioactivos (como en el proceso de compactación de detergentes líquidos eliminando el agua) sin inducir fenómenos no deseados tales como la separación de fases o una viscosidad elevada.

[0204] El detergente puede contener un 0-5% en peso, tal como entre aproximadamente un 0.5% y aproximadamente un 5%, o entre aproximadamente un 3% y aproximadamente un 5%, de un hidrótopo. Se puede utilizar cualquier hidrótopo conocido en la técnica por su uso en detergentes. Los ejemplos no limitantes de

hidrótrópos incluyen sulfonato de benceno de sodio, sulfonato de p-tolueno de sodio (STS), sulfonato de xileno de sodio (SXS), sulfonato de cumeno de sodio (SCS), sulfonato de cimeno de sodio, óxidos de amina, alcoholes y poliglicoléteres, hidroxinaftoato de sodio, sulfonato de hidroxinaftaleno de sodio, sulfato de etilhexilo de sodio y combinaciones de los mismos.

5

#### Adyuvantes y coadyuvantes

[0205] La composición detergente puede contener aproximadamente un 0-65% en peso, por ejemplo, entre aproximadamente un 5% y aproximadamente un 50% de un adyuvante o coadyuvante para detergentes, o una mezcla de estos. En un detergente para lavar la vajilla, el nivel de adyuvante es normalmente de un 40-65%, concretamente de un 50-65%. Concretamente, el adyuvante y/o coadyuvante puede ser un agente quelante que forme complejos hidrosolubles con Ca y Mg. Se puede utilizar cualquier adyuvante y/o coadyuvante conocido en la técnica por su uso en detergentes para lavar la ropa. Los ejemplos no limitantes de adyuvantes incluyen zeolitas, difosfatos (pirofosfatos), trifosfatos tales como trifosfato sódico (STP o STPP), carbonatos tales como carbonato sódico, silicatos solubles tales como metasilicato sódico, silicatos estratificados (p. ej., SKS-6 de Hoechst), etanolaminas tales como 2-aminoetan-1-ol (MEA), dietanolamina (DEA, también conocida como iminodietanol), trietanolamina (TEA, también conocida como 2,2',2"-nitrilotrietanol) y carboximetilululina (CMI), y combinaciones de estos.

[0206] La composición detergente también puede contener un 0-65% en peso, tal como entre aproximadamente un 5% y aproximadamente un 40% de un coadyuvante para detergentes, o una mezcla de estos. La composición detergente puede incluir un coadyuvante solo o combinado con un adyuvante, por ejemplo, un adyuvante de tipo zeolita. Los ejemplos no limitantes de coadyuvantes incluyen homopolímeros de poliácridatos o copolímeros de estos, tales como el ácido poliacrílico (PAA) o el copolímero del ácido acrílico y el ácido maleico (PAA/PMA). Otros ejemplos no limitantes incluyen el citrato, agentes quelantes tales como aminocarboxilatos, aminopolicarboxilatos y fosfonatos, y ácido alquil- o alqueniilsuccínico. Los ejemplos específicos adicionales incluyen 2,2',2"-ácido nitrilotriacético (NTA), ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA), ácido iminodisuccínico (IDS), ácido etilendiamina-*N,N'*-disuccínico (EDDS), ácido metilglicinadiacético (MGDA), ácido glutámico-*N,N'*-ácido diacético (GLDA), ácido etilenodiaminatetra(metilenfosfónico) (HEDP), ácido etilenodiaminatetra(metilenfosfónico) (EDTMPA), ácido dietilenotriaminopenta(metilen-fosfónico) (DTPMPA), ácido *N*-(2-hidroxietyl)iminodiacético (EDG), ácido aspártico-*N*-ácido monoacético (ASMA), ácido aspártico-*N,N'*-ácido diacético (ASDA), ácido aspártico-*N*-ácido monopropiónico (ASMP), ácido iminodisuccínico (IDA), ácido *N*-(2-sulfometil)aspártico (SMAS), ácido *N*-(2-sulfoetil)aspártico (SEAS), ácido *N*-(2-sulfometil)glutámico (SMGL), ácido *N*-(2-sulfoetil)glutámico (SEGL), ácido *N*-metiliminodiacético (MIDA),  $\alpha$ -alanina-*N,N'*-ácido diacético ( $\alpha$ -ALDA), serina-*N,N'*-ácido diacético (SEDA), isoserina-*N,N'*-ácido diacético (ISDA), fenilalanina-*N,N'*-ácido diacético (PHDA), ácido antranílico-*N,N'*-ácido diacético (ANDA), ácido sulfanílico-*N,N'*-ácido diacético (SLDA), taurina-*N,N'*-ácido diacético (TUDA) y sulfometilo-*N,N'*-ácido diacético (SMDA), *N*-(2-hidroxietyl)-etilendiamina-*N,N'*-*N'*-triacetato (HEDTA), dietanoglicina (DEG), ácido dietilentriamina penta(metilenfosfónico) (DTPMP), ácido aminotris(metilenfosfónico)(ATMP), y combinaciones y sales de los mismos. Se describen adyuvantes y/o coadyuvantes ilustrativos adicionales, p. ej., en WO 09/102854 y US 5977053.

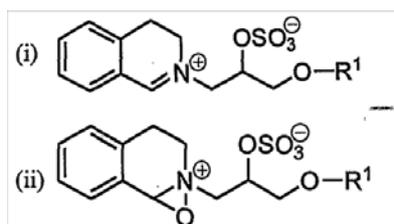
40

#### Sistemas decolorantes

[0207] El detergente puede contener un 0-10% en peso, tal como entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 5% de un sistema decolorante. Se puede utilizar cualquier sistema decolorante conocido en la técnica por su uso en detergentes para lavar la ropa. Los componentes de los sistemas decolorantes adecuados incluyen catalizadores de la decoloración, fotodecolorantes, activadores de la decoloración, fuentes de peróxido de hidrógeno tales como percarbonato sódico y perboratos sódicos, perácidos preformados y mezclas de estos. Los perácidos preformados adecuados incluyen, sin carácter limitante, ácidos y sales peroxycarboxílicos, ácidos y sales percarbónicos, ácidos y sales perimidicos, ácidos y sales peroximonosulfúricos, por ejemplo, Oxone (R) y mezclas de estos. Los ejemplos no limitantes de sistemas decolorantes incluyen sistemas decolorantes a base de peróxidos, los cuales pueden comprender, por ejemplo, una sal inorgánica, incluidas las sales de metales alcalinos tales como las sales sódicas de un perborato (normalmente mono- o tetrahidratado), sales de percarbonatos, persulfatos, perfosfatos, persilicatos, combinadas con un activador de la decoloración que forma perácidos. La expresión activador de la decoloración se refiere en la presente a un compuesto que reacciona con decolorante de peróxido de hidrógeno como el peróxido de hidrógeno para formar un perácido. El perácido formado de esta manera constituye el agente decolorante activado. Los activadores del blanqueo adecuados para ser utilizados en la presente incluyen aquellos que pertenecen a la clase de ésteres amidas, imidas o anhídridos. Los ejemplos adecuados son tetraacetiletlenodiamina (TAED), sulfonato 4-[(3,5,5-trimethylhexanoil)oxi]benceno de sodio (ISONOBS), ácido dodecanoico de diperoxi, 4-(dodecanoiloxi)benzenosulfonato (LOBS), 4-(decanoiloxi)benzenosulfonato, 4-(decanoiloxi)benzoato (DOBS), 4-(nonanoiloxi)benzenosulfonato (NOBS) y/o aquellos descritos en el documento WO98/17767. En el documento EP624154 se ha descrito una familia particular de activadores de la decoloración de interés y en esa familia se

60

5 prefiere particularmente el acetilcitrato de trietilo (ACT). El ACT o un triglicérido de cadena corta como la triacina presenta la ventaja de que es ecológico, ya que en última instancia se degrada en ácido cítrico y alcohol. Además, el acetilcitrato de trietilo y la triacetina presentan una buena estabilidad hidrolítica en el producto cuando se almacenan y son unos activadores de la decoloración eficaces. Finalmente, el ATC proporciona una buena capacidad adyuvante al aditivo para lavar la ropa. Como alternativa, el sistema decolorante puede comprender peroxiácidos, por ejemplo, de tipo amida, imida o sulfona. El sistema de decoloración también puede comprender perácidos tales como el ácido 6-(ftalimido)peroxihexanoico (PAP). El sistema decolorante también puede incluir un catalizador de la decoloración. En algunas modalidades, el componente decolorante puede ser un catalizador orgánico seleccionado a partir del grupo constituido por catalizadores orgánicos que tienen las siguientes fórmulas:



15 (iii) y mezclas de estos; donde cada  $R^1$  es independientemente un grupo alquilo ramificado que contiene entre 9 y 24 átomos de carbono o un grupo alquilo lineal que contiene entre 11 y 24 átomos de carbono, preferentemente cada  $R^1$  es independientemente un grupo alquilo ramificado que contiene entre 9 y 18 átomos de carbono o un grupo alquilo lineal que contiene entre 11 y 18 átomos de carbono, más preferentemente cada  $R^1$  se selecciona independientemente del grupo constituido por 2-propilheptilo, 2-butilooctilo, 2-pentilnonilo, 2-hexildecilo, *n*-dodecilo, *n*-tetradecilo, *n*-hexadecilo, *n*-octadecilo, isononilo, isodecilo, isotridecilo e isopentadecilo. Se describen otros sistemas decolorantes ilustrativos, p. ej., en WO2007/087258, WO2007/087244, WO2007/087259 y WO2007/087242. Un fotodecolorante adecuado puede ser, por ejemplo, la ftalocianina de zinc sulfonada.

#### Polímeros

25 [0208] El detergente puede contener un 0-10% en peso, tal como un 0.5-5%, 2-5%, 0.5-2% o 0.2-1% de un polímero. Se puede utilizar cualquier polímero conocido en la técnica por su uso en detergentes. El polímero puede actuar como un coadyuvante según se ha mencionado anteriormente, o puede proporcionar un efecto contra la redeposición, de protección de las fibras, desprendimiento de la suciedad, inhibición de la transferencia de tinte, limpieza de la grasa y/o propiedades antiespumantes. Algunos polímeros pueden poseer más de una de las propiedades mencionadas anteriormente y/o más de uno de los motivos que se mencionan a continuación. Los polímeros ilustrativos incluyen (carboximetil)celulosa (CMC), alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), polietilenglicol o poli(óxido de etileno) (PEG), polietilenimina etoxilada, carboximetilululina (CMI) y policarboxilatos tales como PAA, PAA/PMA, ácido poliaspártico y copolímeros de metacrilato de laurilo/ácido acrílico, CMC modificada hidrófobamente (HM-CMC) y siliconas, copolímeros de ácido tereftálico y glicoles oligoméricos, copolímeros de poli(tereftalato de etileno) y poli(tereftalato de oxieteno) (PET-POET), PVP, polivinilimidazol (PVI), poli(*N*-óxido de vinilpiridina) (PVPO o PVPNO) y polivinilpirrolidona-vinilimidazol (PVPVI). Algunos polímeros ilustrativos adicionales incluyen policarboxilatos sulfonados, óxido de polietileno y óxido de polipropileno (PEO-PPO) y etoxisulfato de dicuaternio. Se describen otros polímeros ilustrativos, p. ej., en WO 2006/130575. También se contemplan las sales de los polímeros mencionados anteriormente.

#### Agentes que modifican la tonalidad de las telas

45 [0209] Las composiciones detergentes de la presente invención también pueden incluir agentes colorantes de la tela, tales como tintes o pigmentos, los cuales, cuando se formulan en las composiciones detergentes, se pueden depositar sobre una tela cuando la tela se pone en contacto con una solución de lavado que comprenda las composiciones detergentes y de este modo alterar el color de la tela mediante la absorción/reflexión de la luz visible. Los agentes blanqueadores fluorescentes emiten al menos cierta cantidad de luz visible. En cambio, los agentes que modifican la tonalidad de las telas alteran el color de una superficie, ya que absorben al menos una porción del espectro de la luz visible. Los agentes que modifican la tonalidad de las telas adecuados incluyen tintes y conjugados de tinte-arcilla, y también pueden incluir pigmentos. Los tintes adecuados incluyen tintes que son moléculas de bajo peso molecular y tintes poliméricos. Los tintes que son moléculas de bajo peso molecular adecuados incluyen tintes que son moléculas de bajo peso molecular seleccionados a partir del grupo constituido por los tintes incluidos en las clasificaciones del Índice de Color (C.I. , por sus siglas en inglés) de Azul directo, Rojo directo, Violeta directo, Azul ácido, Rojo ácido, Violeta ácido, Azul básico, Rojo básico y Violeta básico, o mezclas de estos, por ejemplo, según se

describe en los documentos WO2005/03274, WO2005/03275, WO2005/03276 y EP1876226. La composición detergente comprende preferentemente entre aproximadamente un 0.00003% en peso y aproximadamente un 0.2% en peso, entre aproximadamente un 0.00008% en peso y aproximadamente un 0.05% en peso, o incluso entre aproximadamente un 0.0001% en peso y aproximadamente un 0.04% en peso del agente que modifica la tonalidad de las telas. La composición puede comprender entre un 0.0001% en peso y un 0.2% en peso de un agente que modifica la tonalidad de las telas, esto puede preferirse especialmente cuando la composición esté en forma de bolsitas de dosis unitaria. También se describen agentes colorantes adecuados, p. ej., en WO 2007/087257 y WO2007/087243.

#### 10 Enzimas (adicionales)

[0210] El aditivo para detergentes así como la composición detergente puede comprender una o más enzimas [adicionales] tales como una proteasa, lipasa, cutinasa, amilasa, carbohidrasa, celulasa, pectinasa, manasa, arabinasa, galactanasa, xilanasa, oxidasa, p. ej., lacasa, y/o peroxidasa.

[0211] En general, las propiedades de la o las enzimas seleccionadas deberían ser compatibles con el detergente seleccionado, (es decir, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, etc.) y la o las enzimas deberían estar presentes en cantidades eficaces.

[0212] Celulasas: Las celulasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes modificados químicamente o con proteínas manipuladas. Las celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, p. ej., las celulasas fúngicas producidas por *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* que se describen en US 4,435,307, US 5,648,263, US 5,691,178, US 5,776,757 y WO 89/09259.

[0213] Son celulasas especialmente adecuadas las celulasas alcalinas o neutras que presentan beneficios en cuanto al cuidado del color. Algunos ejemplos de tales celulasas son las celulasas que se describen en EP 0 495 257, EP 0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397 y WO 98/08940. Otros ejemplos son las variantes de celulasa tales como las que se describen en WO 94/07998, EP 0 531 315, US 5,457,046, US 5,686,593, US 5,763,254, WO 95/24471, WO 98/12307 y PCT/DK98/00299.

[0214] Las celulasas comercializadas incluyen Celluzyme™ y Carezyme™ (Novozymes A/S), Clazinase™ y Puradax HA™ (Genencor International Inc.) y KAC-500(B)™ (Kao Corporation).

[0215] Proteasas: Las proteasas adecuadas para utilizar con la proteasa de la invención incluyen aquellas de origen bacteriano, fúngico, de planta, viral o animal, por ejemplo, origen vegetal o microbiano. Se prefiere el origen microbiano. Se incluyen los mutantes modificados químicamente o con proteínas manipuladas. 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 la tripsina, o de la familia S8 tal como la subtilisina. Una proteasa de tipo metaloproteasa puede ser, por ejemplo, una termolisina de, p. ej., la familia M4 u otra metaloproteasa tal como las de las familias M5, M7 o M8.

[0216] El término "subtilasas" se refiere a un subgrupo de serina proteasas 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 caracterizadas por tener una serina en el sitio activo, que forman un aducto covalente con el sustrato. Las subtilasas se pueden dividir en 6 subdivisiones, es decir, la familia de la subtilisina, la familia de la termitasa, la familia de la proteinasa K, la familia de la lantibiótico-peptidasa, la familia de la kexina y la familia de la pirolisina.

[0217] Algunos ejemplos de subtilasas son aquellas derivadas de *Bacillus* tales como *Bacillus lentus*, *B. alkalophilus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus gibsonii* descritas en los documentos US7262042 y WO09/021867, y *subtilisin lentus*, *subtilisin Novo*, *subtilisin Carlsberg*, *Bacillus licheniformis*, *subtilisin BPN'*, *subtilisin 309*, *subtilisin 147* and *subtilisin 168* descritas en los documentos WO89/06279 y la proteasa PD138 descrita en el documento (WO93/18140). Otras proteasas útiles pueden ser aquellas descritas en los documentos WO92/175177, WO01/016285, WO02/026024 y WO02/016547. Algunos ejemplos de proteasas similares a la tripsina son la tripsina (p. ej., de origen porcino o bovino) y la proteasa de *Fusarium* descrita en los documentos WO89/06270, WO94/25583 y WO05/040372 y las proteasas de tipo quimotripsina derivadas de *Cellulomonas* descritas en los documentos WO05/052161 y WO05/052146.

[0218] Otra proteasa preferida es la proteasa alcalina de *Bacillus lentus* DSM 5483, tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO 95/23221, y variantes de esta, las cuales se describen en los documentos WO 92/21760, WO 95/23221, EP 1921147 y EP 1921148.

[0219] Algunos ejemplos de metaloproteasas son las metaloproteasas neutras tal como se describen en el documento WO07/044993 (Genencor Int.) tal como aquellas derivadas de *Bacillus amyloliquefaciens*.

5 [0220] Algunos ejemplos de proteasas útiles son las variantes descritas en: los documentos WO92/19729, WO96/034946, WO98/20115, WO98/20116, WO99/011768, WO01/44452, WO03/006602, WO04/03186, WO04/041979, WO07/006305, WO11/036263, WO11/036264, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 3, 4, 9, 15, 27, 36, 57, 61, 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, 206, 217, 218, 222, 224, 232, 235, 236, 245, 248, 252 y 274 utilizando la numeración BPN'. De manera más preferida, las variantes de subtilasa pueden comprender las siguientes mutaciones: S3T, V4I, S9R, A15T, K27R, \*36D, G61E,D, 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').

15 [0221] Enzimas proteasas comercialmente disponibles adecuadas incluyen aquellas vendidas por las marcas Alcalase®, Duralase™, Durazym™, Relase®, Relase® Ultra, Savinase®, Savinase® Ultra, Primase®, Polarzyme®, Kannase®, Liqunase®, Liqunase® Ultra, Ovozyme®, Coronase®, Coronase® Ultra, Neutrase®, Everlase® and Esperase® (Novozymes A/S), aquellas vendidas por las marcas Maxatase®, Maxacal®, Maxapem®, Purafect®, Purafect Prime®, Purafect MA®, Purafect Ox®, Purafect OxP®, Puramax®, Properase®, FN2®, FN3®, FN4®, Excellase®, Ultimase®, Opticlean® y Optimase® (Danisco/DuPont), Axapem™ (Gist-Brocades N.V.), BLAP (secuencia que se muestra en la Figura 29 de US5352604) y variantes de los mismos (Henkel AG) y KAP (subtilisina de *Bacillus alkalophilus*) de Kao.

25 [0222] Lipasas y Cutinasas: Las lipasas y cutinasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen las enzimas mutantes modificadas químicamente o con proteínas manipuladas. Los ejemplos incluyen una lipasa de *Thermomyces*, p. ej., de *T. lanuginosus* (denominada previamente *Humicola lanuginosa*) tal como se describe en los documentos EP258068 y EP305216, cutinasa de *Humicola*, p. ej., *H. insolens* (WO96/13580), lipasa de las cepas de *Pseudomonas* (algunas de estas ahora se denominan *Burkholderia*), p. ej., *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes* (EP218272), *P. cepacia* (EP331376), *P. sp.* cepa SD705 (WO95/06720 y WO96/27002), *P. wisconsinensis* (WO96/12012), lipasas de *Streptomyces* de tipo GDSL (WO10/065455), cutinasa de *Magnaporthe grisea* (WO10/107560), cutinasa de *Pseudomonas mendocina* (US5.389.536), lipasa de *Thermobifida fusca* (WO11/084412, WO13/033318), lipasa de *Geobacillus stearothermophilus* (WO11/084417), lipasa de *Bacillus subtilis* (WO11/084599) y lipasa de *Streptomyces griseus* (WO11/150157) y *S. pristinaespiralis* (WO12/137147).

35 [0223] Otros ejemplos son variantes de lipasa tales como aquellas descritas en los documentos EP407225, WO92/05249, WO94/01541, WO94/25578, WO95/14783, WO95/30744, WO95/35381, WO95/22615, WO96/00292, WO97/04079, WO97/07202, WO00/34450, WO00/60063, WO01/92502, WO07/87508 y WO09/109500.

40 [0224] Los productos de tipo lipasa comercializados preferidos incluyen Lipolase™, Lipex™, Lipolex™ y Lipoclean™ (Novozymes A/S), Lumafast (originalmente de Genencor) y Lipomax (originalmente de Gist-Brocades).

45 [0225] Otros ejemplos adicionales son las lipasas a veces denominadas acil transferasas o perhidrolasas, por ejemplo aciltransferasas con homología a lipasa A de *Candida antarctica* (WO10/111143), aciltransferasa de *Mycobacterium smegmatis* (WO05/56782), perhidrolasas de la familia CE 7 (WO09/67279), y variantes de la perhidrolasa *M. smegmatis* en particular la variante S54V utilizada en el producto comercial Gentle Power Bleach de Huntsman Textile Effects Pte Ltd (WO10/100028).

50 [0226] Amilasas: Las amilasas adecuadas que se pueden utilizar junto con la proteasa de la invención pueden ser una alfa-amilasa o una glucoamilasa y pueden ser de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes modificados químicamente o con proteínas manipuladas. Las amilasas incluyen, por ejemplo, alfa-amilasas obtenidas de *Bacillus*, p. ej., una cepa especial de *Bacillus licheniformis*, descrita con más detalle en GB 1,296,839.

55 [0227] Las amilasas adecuadas incluyen las amilasas que tienen la SEQ ID NO: 2 de WO 95/10603 o variantes que tienen una identidad secuencial de un 90% respecto a la SEQ ID NO: 3 de estas. Las variantes preferidas se describen en los documentos WO 94/02597, WO 94/18314, WO 97/43424 y la SEQ ID NO: 4 del documento WO 99/019467, tales como las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 178, 179, 181, 188, 190, 197, 201, 202, 207, 208, 209, 211, 243, 264, 304, 305, 391, 408 y 444.

60 [0228] Otras amilasas adecuadas incluyen las amilasas que tienen la SEQ ID NO: 6 del documento WO 02/010355 o

variantes de estas que tienen una identidad secuencial de un 90% respecto a la SEQ ID NO: 6. Las variantes preferidas de la SEQ ID NO: 6 son aquellas que tienen una supresión en las posiciones 181 y 182 y una sustitución en la posición 193.

5 [0229] Otras amilasas que son adecuadas son una alfa-amilasa híbrida que comprende los residuos 1-33 de la alfa-amilasa derivada de *B. amyloliquefaciens* que se muestra en la SEQ ID NO: 6 del documento WO 2006/066594 y los residuos 36-483 de la alfa-amilasa de *B. licheniformis* que se muestra en la SEQ ID NO: 4 del documento WO 2006/066594 o variantes que tienen una identidad secuencial de un 90% con esta. Las variantes preferidas de esta alfa-amilasa híbrida son aquellas que tienen una sustitución, una supresión o una inserción en una o más de las  
10 siguientes posiciones: G48, T49, G107, H156, A181, N190, M197, I201, A209 y Q264. Las variantes más preferidas de la alfa-amilasa híbrida que comprende los residuos 1-33 de la alfa-amilasa derivada de *B. amyloliquefaciens* que se muestra en la SEQ ID NO: 6 del documento WO 2006/066594 y los residuos 36-483 de la SEQ ID NO: 4 son aquellas que tienen las siguientes sustituciones:

15 M197T;  
H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S; o  
G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S.

[0230] Otras amilasas que son adecuadas son las amilasas que presentan la SEQ ID NO: 6 del documento WO 99/019467 o variantes de estas que tienen una identidad secuencial de un 90% respecto a la SEQ ID NO: 6. Las variantes preferidas de la SEQ ID NO: 6 son aquellas que tienen una sustitución, una supresión o una inserción en una o más de las siguientes posiciones: R181, G182, H183, G184, N195, I206, E212, E216 y K269. Las amilasas particularmente preferidas son aquellas que tienen una supresión en las posiciones R181 y G182, o en las posiciones H183 y G184.  
20

25 [0231] Otras amilasas que se pueden utilizar son aquellas que presentan la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 7 del documento WO 96/023873 o variantes de estas que tienen una identidad secuencial de un 90% respecto a la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 7. Las variantes preferidas de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 7 son aquellas que tienen una sustitución, una supresión o una inserción en una o más de las siguientes posiciones: 140, 181, 182, 183, 184, 195, 206, 212, 243, 260, 269, 304 y 476, utilizando la SEQ ID 2 de WO 96/023873 para la numeración. Las variantes más preferidas son aquellas que tienen una supresión en dos posiciones seleccionadas de 181, 182, 183 y 184, tal como 181 y 182, 182 y 183, o posiciones 183 y 184. Las variantes de amilasa más preferidas de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 7 son aquellas que tienen una supresión en las posiciones 183 y 184 y una sustitución en una o más de las  
30 35 posiciones 140, 195, 206, 243, 260, 304 y 476.

[0232] Otras amilasas que se pueden utilizar son las amilasas que tienen la SEQ ID NO: 2 del documento WO 08/153815, la SEQ ID NO: 10 del documento WO 01/66712 o variantes de estas que tienen una identidad secuencial de un 90% respecto a la SEQ ID NO: 2 del documento WO 08/153815 o una identidad secuencial de un 90% respecto a la SEQ ID NO: 10 en el documento WO 01/66712. Las variantes preferidas de la SEQ ID NO: 10 del documento WO 01/66712 son aquellas que tienen una sustitución, una supresión o una inserción en una o más de las siguientes posiciones: 176, 177, 178, 179, 190, 201, 207, 211 y 264.  
40

[0233] Otras amilasas adecuadas son las amilasas que tienen la SEQ ID NO: 2 del documento WO 09/061380 o variantes de esta que tienen una identidad secuencial de un 90% respecto a la SEQ ID NO: 2 de estas. Las variantes preferidas de la SEQ ID NO: 2 son aquellas que tienen un truncamiento del C-terminal y/o una sustitución, una supresión o una inserción en una o más de las siguientes posiciones: Q87, Q98, S125, N128, T131, T165, K178, R180, S181, T182, G183, M201, F202, N225, S243, N272, N282, Y305, R309, D319, Q320, Q359, K444 y G475. Las variantes más preferidas de la SEQ ID NO: 2 son aquellas que tienen la sustitución en una o más de las siguientes  
45 50 posiciones: Q87E,R, Q98R, S125A, N128C, T131I, T165I, K178L, T182G, M201L, F202Y, N225E,R, N272E,R, S243Q,A,E,D, Y305R, R309A, Q320R, Q359E, K444E y G475K y/o una supresión en la posición R180 y/o S181 o T182 y/o G183. Las variantes de amilasa más preferidas de la SEQ ID NO: 2 son aquellas que tienen las siguientes sustituciones:

55 N128C+K178L+T182G+Y305R+G475K;  
N128C+K178L+T182G+F202Y+Y305R+D319T+G475K;  
S125A+N128C+K178L+T182G+Y305R+G475K; o  
S125A+N128C+T131I+T165I+K178L+T182G+Y305R+G475K, donde las variantes están truncadas en el C-terminal y opcionalmente comprenden además una sustitución en la posición 243 y/o una supresión en la  
60 posición 180 y/o la posición 181.

5 [0234] Otras amilasas adecuadas son la alfa-amilasa que tiene la SEQ ID NO: 12 en el documento WO01/66712 o una variante que tiene al menos 90% de identidad secuencial con la SEQ ID NO: 12. Las variantes de amilasa preferidas son aquellas que tienen una sustitución, una supresión o una inserción en una o más de las siguientes posiciones de la SEQ ID NO: 12 del documento WO01/66712: R28, R118, N174; R181, G182, D183, G184, G186, W189, N195, M202, Y298, N299, K302, S303, N306, R310, N314; R320, H324, E345, Y396, R400, W439, R444, N445, K446, Q449, R458, N471, N484. Las amilasas preferidas particulares incluyen variantes que tienen una supresión de D183 y G184 y que tienen las sustituciones R118K, N195F, R320K y R458K, y una variante que tiene adicionalmente sustituciones en una o más posiciones seleccionadas a partir del siguiente grupo: M9, G149, G182, G186, M202, T257, Y295, N299, M323, E345 y A339, la más preferida es una variante que tiene adicionalmente sustituciones en todas estas posiciones.

15 [0235] Otros ejemplos son variantes de amilasa tales como aquellas descritas en los documentos WO2011/098531, WO2013/001078 y WO2013/001087.

[0236] Las amilasas comercialmente disponibles son Duramyl™, Termamyl™, Fungamyl™, Stainzyme™, Stainzyme Plus™, Natalase™, Liquozyme X y BAN™ (de Novozymes A/S), y Rapidase™, Purastar™/Effectenz™, Powerase y Preferenz S100 (de Genencor International Inc./DuPont).

20 [0237] Peroxidasas/oxidadas: Las peroxidasas/oxidadas adecuadas incluyen las de origen vegetal, bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes modificados químicamente o con proteínas manipuladas. Los ejemplos de peroxidasas útiles incluyen peroxidasas de *Coprinus*, p. ej., de *C. cinereus* y variantes de estas tales como las que se describen en WO 93/24618, WO 95/10602 y WO 98/15257.

25 [0238] Las peroxidasas comercializadas incluyen Guardzyme™ (Novozymes A/S).

[0239] La enzima o las enzimas detergentes se pueden incluir en una composición detergente añadiendo aditivos independientes que contengan una o más enzimas, o añadiendo un aditivo combinado que comprenda todas estas enzimas. Un aditivo para detergentes de la invención, es decir, un aditivo independiente o un aditivo combinado, se puede formular, por ejemplo, como un granulado, líquido, suspensión espesa, etc. Las formulaciones de aditivos para detergentes preferidas son los granulados, en particular los granulados que no generan polvo, líquidos, en particular líquidos estabilizados, o suspensiones.

35 [0240] Los granulados que no se dispersan pueden producirse, *por ejemplo*, como se describe en los documentos US 4,106,991 y 4,661,452 y pueden recubrirse opcionalmente mediante métodos conocidos en la técnica. Algunos ejemplos de materiales de recubrimiento céreos son los productos de tipo poli(óxido de etileno) (polietilenglicol, PEG) con pesos molares medios comprendidos entre 1000 y 20 000; nonilfenoles etoxilados que contienen entre 16 y 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos etoxilados en los cuales el alcohol contiene entre 12 y 20 átomos de carbono y los cuales contienen entre 15 y 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y mono-, di- y triglicéridos de ácidos grasos. En el documento GB 1483591 se proporcionan ejemplos de materiales de recubrimiento pelculígenos adecuados para la aplicación mediante técnicas de lecho fluido. Los preparados enzimáticos líquidos se pueden estabilizar, por ejemplo, añadiendo un poliol tal como propilenglicol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico o ácido bórico de acuerdo con métodos establecidos. Se pueden preparar enzimas protegidas de acuerdo con el método descrito en el documento EP 238,216.

45 **Materiales adjuntos**

[0241] También se pueden utilizar cualesquiera componentes detergentes conocidos en la técnica por su uso en detergentes para lavar la ropa. Otros componentes de detergentes opcionales incluyen agentes anticorrosivos, agentes antiencogimiento, agentes contra la redeposición de la suciedad, agentes antiarrugas, bactericidas, aglutinantes, inhibidores de la corrosión, agentes desintegrantes/de desintegración, tintes, estabilizantes enzimáticos (incluidos el ácido bórico, boratos, CMC y/o polioles tales como propilenglicol), acondicionadores de telas que incluyen arcillas, rellenos/auxiliares de procesamiento, agentes de blanqueo fluorescentes/abrillantadores ópticos, potenciadores de la espuma, reguladores de la espuma (espuma de jabones), perfumes, agentes de suspensión de la suciedad, suavizantes, supresores de la espuma de jabones, inhibidores del deslustrado y agentes absorbentes, tanto solos como combinados. Se puede utilizar cualquier ingrediente conocido en la técnica por su uso en detergentes para lavar la ropa. La elección de tales ingredientes se encuentra dentro de las competencias del experto.

60 [0242] Dispersantes - Las composiciones detergentes de la presente invención también pueden contener dispersantes. En particular, los detergentes en polvo pueden comprender dispersantes. Los materiales orgánicos

hidrosolubles adecuados incluyen los ácidos homo- o copoliméricos o sus sales, en los cuales el ácido policarboxílico comprende al menos dos radicales carboxilo separados entre sí por no más de dos átomos de carbono. Los dispersantes adecuados se describen, por ejemplo, en Powdered Detergents, Surfactant science series, volumen 71, Marcel Dekker, Inc.

5 [0243] Los agentes inhibidores de la transferencia de tintes - Las composiciones detergentes de la presente invención también pueden incluir uno o más agentes inhibidores de la transferencia de tintes. Los agentes inhibidores de la transferencia de tintes poliméricos adecuados incluyen, sin carácter limitante, polímeros de polivinilpirrolidona, polímeros de *N*-óxido de poliamina, copolímeros de *N*-vinilpirrolidona y *N*-vinilimidazol, poliviniloxazolidonas y polivinilimidazoles o mezclas de estos. Cuando están presentes en una composición en cuestión, los agentes inhibidores de la transferencia de tintes pueden estar presentes en niveles de aproximadamente un 0.0001 % a aproximadamente un 10%, de aproximadamente un 0.01% a aproximadamente un 5% o incluso de aproximadamente un 0.1% a aproximadamente un 3% en peso de la composición.

15 [0244] Agente de blanqueo fluorescente - Las composiciones detergentes de la presente invención también contendrán preferiblemente componentes adicionales que pueden teñir artículos que se han de lavar, tales como un agente de blanqueo fluorescente o abrillantadores ópticos. Cuando el abrillantador está presente, está preferentemente en un nivel de entre aproximadamente un 0.01% y aproximadamente un 0.5%. En la composición de la presente invención se puede utilizar cualquier agente blanqueador fluorescente adecuado para su uso en una composición detergente para lavar la ropa. Los agentes de blanqueo fluorescentes más comúnmente utilizados son aquellos que pertenecen a las clases de derivados de ácido sulfónico de diaminoestilbeno, derivados de diarilpirazolina y derivados de bisfenil-distirilo. Los ejemplos del tipo de derivado de ácido sulfónico de diaminoestilbeno de agentes de blanqueo fluorescentes incluyen las sales de sodio de: 4,4'-bis-(2-dietanolamino-4-anilino-*s*-triazin-6-ilamino) estilbeno-2,2'-disulfonato; 4,4'-bis-(2,4-dianilino-*s*-triazin-6-ilamino) estilbeno-2,2'-disulfonato; 4,4'-bis-(2-anilino-4-(*N*-metil-*N*-2-hidroxi-etilamino)-*s*-triazin-6-ilamino) estilbeno-2,2'-disulfonato, 4,4'-bis-(4-fenil-2,1,3-triazol-2-il)estilbeno-2,2'-disulfonato; 4,4'-bis-(2-anilino-4(1-metil-2-hidroxi-etilamino)-*s*-triazin-6-ilamino) estilbeno-2,2'-disulfonato y sodio 5-(2*H*-nafto[1,2-*d*][1,2,3]triazol-2-il)-2-[(*E*)-2-fenilvinil]bencenosulfonato. Los agentes de blanqueo fluorescentes preferidos son Tinopal DMS y Tinopal CBS, que se pueden adquirir de Ciba-Geigy AG, Basilea, Suiza. Tinopal DMS es la sal disódica de disulfonato 4,4'-bis-(2-morfolino-4-anilino-*s*-triazin-6-ilamino) estilbeno. Tinopal CBS es la sal disódica de 2,2'-bis-(fenil-stiril)-disulfonato. También es un agente blanqueador fluorescente preferido el producto comercializado Parawhite KX, suministrado por Paramount Minerals and Chemicals, Bombay, India. Otros agentes fluorescentes adecuados para su uso en la invención incluyen las 1,3-diarilpirazolininas y las 7-alkilaminocumarinas.

35 [0245] Los niveles de abrillantadores fluorescentes adecuados incluyen niveles inferiores de aproximadamente un 0.01, de un 0.05, de aproximadamente un 0.1 o incluso de aproximadamente un 0.2% en peso y niveles superiores de un 0.5 o incluso un 0.75% en peso.

40 [0246] Polímeros que liberan la suciedad - Las composiciones detergentes de la presente invención también pueden incluir uno o más polímeros que liberan la suciedad que ayudan con la eliminación de suciedad de telas tales como telas en base a algodón y poliéster, en particular la eliminación de suciedad hidrófoba de telas en base a poliéster. Los polímeros que liberan la suciedad pueden ser, por ejemplo, polímeros basados en tereftalato aniónicos o no iónicos, polivinilcaprolactama y copolímeros relacionados, copolímeros vinílicos de injerto, poliéster poliamidas, remitase, por ejemplo, al Capítulo 7 en Powdered Detergents, Surfactant science series, volumen 71, Marcel Dekker, Inc. Otro tipo de polímeros para liberar la suciedad son los polímeros que limpian la grasa alcoxilados anfífilicos, los cuales comprenden una estructura central y una pluralidad de grupos alcoxilato unidos a esa estructura nuclear. La estructura central puede comprender una estructura de tipo polialquilenimina o una estructura de tipo polialcanolamina, según se describe detalladamente en el documento WO 2009/087523. Además, los copolímeros de injerto aleatorio son polímeros para liberar la suciedad adecuados. En los documentos WO 2007/138054, WO 2006/108856 y WO 2006/113314 se describen detalladamente copolímeros de injerto adecuados. Otros polímeros para liberar la suciedad son estructuras de polisacáridos sustituidos, especialmente estructuras celulósicas sustituidas tales como derivados de celulosa modificados tales como los que se describen en los documentos EP 1867808 o WO 2003/040279. Los polímeros celulósicos adecuados incluyen celulosa, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, amidas de celulosa y mezclas de estos. Los polímeros celulósicos adecuados incluyen celulosa modificada aniónicamente, celulosa modificada no iónicamente, celulosa modificada catiónicamente, celulosa modificada zwitteriónicamente y mezclas de estas. Los polímeros celulósicos adecuados incluyen metilcelulosa, carboximetilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxilpropilmetilcelulosa, éster de carboximetilcelulosa y mezclas de estas.

60 [0247] Agentes contra la redeposición - Las composiciones detergentes de la presente invención también pueden incluir uno o más agentes contra la redeposición tales como carboximetilcelulosa (CMC), alcohol polivinílico (PVA),

polivinilpirrolidona (PVP), polioxietileno y/o polietilenglicol (PEG), homopolímeros de ácido acrílico, copolímeros de ácido acrílico y ácido maleico, y polietileniminas etoxiladas. Los polímeros de base celulósica descritos en los polímeros para liberar la suciedad anteriores también pueden actuar como agentes contra la redeposición.

5 [0248] Otros materiales adjuntos adecuados incluyen, a modo no taxativo, agentes anti-encogimiento, agentes anti-arrugas, bactericidas, aglutinantes, portadores, tintes, estabilizantes enzimáticos, suavizantes, rellenos, reguladores de espuma, hidrótrofos, perfumes, pigmentos, supresores de la espuma de jabones, disolventes, estructurantes para detergentes líquidos y/o agentes elastizantes de estructura.

10 Formulación de productos detergentes

[0249] La composición detergente de la invención puede adoptar cualquier forma conveniente, p. ej., una pastilla, un comprimido homogéneo, un comprimido con una o más capas, un polvo compacto o regular, un gránulo, una pasta, un gel o un líquido concentrado, compacto o regular.

15 [0250] Formas de formulaciones detergentes: en capas (fases iguales o diferentes), bolsitas, frente a formas para una unidad de dosificación para máquinas.

20 [0251] Las bolsitas se pueden configurar con un único compartimento o con múltiples compartimentos. Pueden tener cualquier forma, figura y material que sea adecuado para guardar la composición, p. ej., que no permita que se libere la composición de la bolsita antes de que entre en contacto con el agua. La bolsita está hecha de una película hidrosoluble que encierra un volumen interno. El volumen interno puede dividirse en compartimentos de la bolsita. Las películas preferidas son materiales polímeros, preferentemente cuales polímeros se forman en una hoja o película. Los polímeros, copolímeros o derivados de los mismos preferidos son poliacrilatos seleccionados y  
25 copolímeros de acrilato hidrosolubles, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, dextrina de sodio, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, malto dextrina, polimetacrilatos, más preferiblemente copolímeros de alcohol polivinílico e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Preferiblemente, el nivel de polímero en la película por ejemplo PVA es al menos aproximadamente 60%. El peso molecular promedio preferido generalmente estará comprendido entre aproximadamente 20 000 y aproximadamente 150 000. Las películas también pueden ser de  
30 composiciones mezcladas que comprenden mezclas de polímeros hidrosolubles e hidrolíticamente degradables tales como poliláctido y alcohol polivinílico (conocidas con la referencia comercial M8630, tal como la comercializa MonoSol LLC, Indiana, EE.UU.) más plastificantes como glicerol, etilenglicerol, propilenglicol, sorbitol y mezclas de estos. Las bolsitas pueden comprender una composición o componentes parciales de limpieza para la ropa sólidos y/o una composición o componentes parciales de limpieza líquidos separados por la película hidrosoluble. El  
35 compartimento para los componentes líquidos puede tener una composición diferente que los compartimentos que contienen los sólidos. Ref: (US2009/0011970 A1).

40 [0252] Los ingredientes del detergente se pueden separar físicamente unos de otros mediante compartimentos en bolsitas que se disuelven en agua o en diferentes capas de comprimidos. De este modo, pueden evitarse interacciones negativas entre los componentes durante el almacenamiento. Los diferentes perfiles de disolución de cada uno de los compartimentos también pueden dar lugar a una disolución más tardía de los componentes seleccionados en la solución de lavado.

45 Definición/características de las formas:

[0253] Un detergente líquido o en gel, el cual no se dosifica de manera unitaria, puede ser acuoso, y contendrá normalmente al menos un 20% en peso y hasta un 95% de agua, tal como, hasta aproximadamente un 70% de agua, hasta aproximadamente un 65% de agua, hasta aproximadamente un 55% de agua, hasta aproximadamente un 45% de agua, hasta aproximadamente un 35% de agua. Se pueden incluir otros tipos de líquidos, que incluyen, sin  
50 carácter limitante, alcoholes, aminas, dioles, éteres y polioles, en un líquido o gel acuoso. Un detergente en gel o líquido acuoso puede contener un 0-30% de disolvente orgánico.

[0254] Un detergente en gel o líquido puede ser no acuoso.

55 Barras de jabón para lavar ropa

[0255] Los polipéptidos de la invención pueden agregarse a barras de jabón para lavar ropa y utilizarse para lavado de ropa, telas y/o textiles a mano. La expresión "barra de jabón para lavar la ropa" incluye barras para lavar la ropa, barras de jabón, barras combo, barras Syndet y barras detergentes. Normalmente, los tipos de barra difieren en el  
60 tipo de tensioactivo que contienen, y la expresión "barra de jabón para lavar la ropa" incluye aquellas que contienen jabones de ácidos grasos y/o jabones sintéticos. La barra de jabón para lavar la ropa tiene una forma física que es

sólida y no es un líquido, gel ni polvo a temperatura ambiente. El término "sólido" se define como una forma física que no cambia significativamente con el transcurso del tiempo, es decir, si un objeto sólido (p. ej., una barra de jabón para lavar la ropa) se coloca en un recipiente, el objeto sólido no cambia para llenar el recipiente en el que se coloca. La barra es un sólido normalmente en forma de barra pero puede adoptar otras formas sólidas tales como redonda u ovalada.

[0256] La barra de jabón para lavar la ropa puede contener una o más enzimas adicionales, inhibidores de proteasas tales como aldehídos peptídicos (o un aducto de tipo hidrosulfito o un aducto de tipo hemiacetal), ácido bórico, borato, bórax y/o derivados del ácido fenilborónico tales como el ácido 4-formilfenilborónico, uno o más jabones o tensioactivos sintéticos, polioles tales como la glicerina, compuestos que regulan el pH tales como ácidos grasos, ácido cítrico, ácido acético y/o ácido fórmico, y/o una sal de un catión monovalente y un anión orgánico donde el catión monovalente puede ser, por ejemplo, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> o NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y el anión orgánico puede ser, por ejemplo, formiato, acetato, citrato o lactato de modo que la sal de un catión monovalente y un anión orgánico puede ser, por ejemplo, formiato de sodio.

[0257] La barra de jabón para lavar la ropa también puede contener agentes de complejación como EDTA y HEDP, perfumes y/o diferentes tipos de rellenos, tensioactivos, p. ej., tensioactivos sintéticos aniónicos, adyuvantes, agentes poliméricos para liberar la suciedad, quelantes detergentes, agentes estabilizantes, rellenos, tintes, colorantes, inhibidores de la transferencia de tintes, policarbonatos alcoxilados, supresores de la espuma de jabones, estructurantes, aglutinantes, agentes de lixiviación, agentes activadores de la decoloración, agentes que eliminan la suciedad de arcillas, agentes contra la redeposición, agentes dispersantes poliméricos, abrillantadores, suavizantes para telas, perfumes y/u otros compuestos conocidos en la técnica.

[0258] La barra de jabón para lavar la ropa se puede procesar en un equipo convencional de producción de barras de jabón para lavar la ropa tal como, sin carácter limitante: mezcladoras, compresoras, p. ej., una compresora de vacío de dos etapas, extrusoras, cortadoras, estampadoras de logos, túneles de enfriamiento y empaquetadoras. La invención no se limita a preparar las barras de jabón para lavar la ropa mediante un único método cualquiera. La premezcla de la invención se puede añadir al jabón en diferentes etapas del proceso. Por ejemplo, se puede preparar una premezcla que contenga jabón, una enzima, opcionalmente una o más enzimas adicionales, un inhibidor de proteasas y una sal de un catión monovalente y un anión orgánico, y a continuación la mezcla se comprime. La enzima y las enzimas adicionales opcionales se pueden añadir simultáneamente con el inhibidor de proteasas, por ejemplo, en forma líquida. Además de la etapa de mezclar y la etapa de comprimir, el proceso puede comprender además las etapas de moler, extrudir, cortar, estampar, enfriar y/o envolver.

#### 35 Formulaciones detergentes granuladas

[0259] Un detergente granulado se puede formular según se describe en los documentos WO09/092699, EP1705241, EP1382668, WO07/001262, US6472364, WO04/074419 o WO09/102854. Otras formulaciones detergentes útiles se describen en WO09/124162, WO09/124163, WO09/117340, WO09/117341, WO09/117342, WO09/072069, WO09/063355, WO09/132870, WO09/121757, WO09/112296, WO09/112298, WO09/103822, WO09/087033, WO09/050026, WO09/047125, WO09/047126, WO09/047127, WO09/047128, WO09/021784, WO09/010375, WO09/000605, WO09/122125, WO09/095645, WO09/040544, WO09/040545, WO09/024780, WO09/004295, WO09/004294, WO09/121725, WO09/115391, WO09/115392, WO09/074398, WO09/074403, WO09/068501, WO09/065770, WO09/021813, WO09/030632, y WO09/015951.

WO2011025615, WO2011016958, WO2011005803, WO2011005623, WO2011005730, WO2011005844,  
 WO2011005904, WO2011005630, WO2011005830, WO2011005912, WO2011005905, WO2011005910,  
 WO2011005813, WO2010135238, WO2010120863, WO2010108002, WO2010111365, WO2010108000,  
 WO2010107635, WO2010090915, WO2010033976, WO2010033746, WO2010033747, WO2010033897,  
 WO2010033979, WO2010030540, WO2010030541, WO2010030539, WO2010024467, WO2010024469,  
 WO2010024470, WO2010025161, WO2010014395, WO2010044905, WO2010145887, WO2010142503,  
 WO2010122051, WO2010102861, WO2010099997, WO2010084039, WO2010076292, WO2010069742,  
 WO2010069718, WO2010069957, WO2010057784, WO2010054986, WO2010018043, WO2010003783,  
 WO2010003792, WO2011023716, WO2010142539, WO2010118959, WO2010115813, WO2010105942,  
 WO2010105961, WO2010105962, WO2010094356, WO2010084203, WO2010078979, WO2010072456,  
 WO2010069905, WO2010076165, WO2010072603, WO2010066486, WO2010066631, WO2010066632,  
 WO2010063689, WO2010060821, WO2010049187, WO2010031607, WO2010000636,

#### 60 Usos

[0260] La presente invención también trata sobre métodos para utilizar proteasa de acuerdo con la invención o

composiciones de esta en el lavado de textiles y telas, tal como el lavado doméstico de ropa y el lavado industrial de ropa, así como también en alimentos para animales.

5 [0261] La invención también trata sobre métodos para utilizar las composiciones de esta en la limpieza de superficies duras tal como el Lavavajillas Automático (ADW, por sus siglas en inglés), lavado de coches y limpieza de superficies industriales. Por lo tanto, en una modalidad, la presente invención se refiere al uso en la limpieza, tal como el lavado de ropa o el lavado de la vajilla, de una proteasa de acuerdo con la invención o una composición detergente que comprende una proteasa de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, en una modalidad, la presente invención se refiere al uso de un polipéptido aislado que tiene una identidad secuencial con respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de 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% que tiene actividad proteasa en un detergente, un proceso de limpieza y/o un proceso de lavado de ropa.

10 [0262] Uso en detergentes. Los polipéptidos de la presente invención se pueden añadir a una composición detergente y convertirse, de esta manera, en un componente de la composición detergente.

15 [0263] La composición detergente de la presente invención se puede formular, por ejemplo, como una composición detergente para lavar la ropa a mano o a máquina que incluye una composición aditiva para lavar la ropa adecuada para el pretratamiento de telas manchadas y una composición suavizante de telas añadida en el aclarado, o se puede formular como una composición detergente para su uso en operaciones de limpieza de superficies duras domésticas en general, o se puede formular para operaciones de lavado de platos a mano o a máquina.

20 [0264] En un aspecto específico, la presente invención proporciona un aditivo del detergente que comprende un polipéptido de la presente invención según se ha descrito en la presente.

25 Uso de proteasas de la invención en detergentes

30 [0265] La suciedad y las manchas que son importantes para los fabricantes de detergentes están compuestas de muchas sustancias diferentes, y se ha desarrollado una gama de diferentes enzimas, todas con especificidades de sustratos diferentes para su uso en detergentes tanto en relación con el lavado de la ropa como con la limpieza de superficies duras, tal como el lavado de la vajilla. Se considera que estas enzimas proporcionan un beneficio de detergencia enzimática, ya que mejoran específicamente la eliminación de manchas en el proceso de limpieza en el que se aplican en comparación con el mismo proceso sin enzimas. Las enzimas que eliminan manchas conocidas en la técnica incluyen enzimas tales como carbohidrasas, amilasas, proteasas, lipasas, celulasas, hemicelulasas, xilanasas, cutinasas y pectinasas.

35 [0266] En un aspecto, la presente invención se refiere al uso de un polipéptido aislado que tiene una identidad secuencial con respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de 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% en composiciones detergentes y procesos de limpieza, tal como el lavado de ropa y la limpieza de superficies duras. Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención demuestra el efecto detergente de un conjunto de proteasas ilustrativas de la invención sobre diferentes manchas y en diferentes condiciones. En un aspecto particular de la invención, la composición detergente y el uso en procesos de limpieza se refieren al uso de una proteasa de la invención junto con al menos una de las enzimas que eliminan manchas mencionadas anteriormente.

40 [0267] En un aspecto preferido de la presente invención, la proteasa de la invención útil de acuerdo con la invención puede combinarse con al menos dos enzimas. Estas enzimas adicionales se describen en detalle en la sección "otras enzimas", más preferentemente al menos tres, cuatro o cinco enzimas. Preferentemente, las enzimas tienen una especificidad de sustrato diferente, p. ej., actividad carbolítica, actividad proteolítica, actividad amilolítica, actividad lipolítica, actividad hemicelulítica o actividad pectolítica. La combinación de enzimas puede ser, por ejemplo, una proteasa de la invención con otra enzima que elimina manchas, p. ej., una proteasa de la invención y una amilasa, una proteasa de la invención y una celulasa, una proteasa de la invención y una hemicelulasa, una proteasa de la invención y una lipasa, una proteasa de la invención y una cutinasa, una proteasa de la invención y una pectinasa o una proteasa de la invención y un enzima anti-redepósito. Más preferentemente, la proteasa de la invención se combina con al menos otras dos enzimas que eliminan manchas, p. ej., una proteasa de la invención, una lipasa y una amilasa; o una proteasa de la invención, una amilasa y una pectinasa; o una proteasa de la invención, una amilasa y una cutinasa; o una proteasa de la invención, una amilasa y una celulasa; o una proteasa de la invención, una amilasa y una hemicelulasa; o una proteasa de la invención, una lipasa y una pectinasa; o una proteasa de la invención, una lipasa y una cutinasa; o una proteasa de la invención, una lipasa y una celulasa; o una proteasa de la invención, una lipasa y una hemicelulasa. Aún más preferentemente, una proteasa de la invención se puede combinar con al menos otras tres enzimas que eliminan manchas, p. ej., una proteasa de la invención, una amilasa,

una lipasa y una pectinasa; o una proteasa de la invención, una amilasa, una lipasa y una cutinasa; o una proteasa de la invención, una amilasa, una lipasa y una celulasa; o una proteasa de la invención, una amilasa, una lipasa y una hemicelulasa. Una proteasa de la invención se puede combinar con cualquiera de las enzimas seleccionadas a partir de la lista no exhaustiva que comprende: carbohidrasas, tales como una amilasa, una hemicelulasa, una pectinasa, una celulasa, una xantanasa o una pululanasa, una peptidasa, otras proteasas o una lipasa.

[0268] En otra modalidad de la presente invención, una proteasa de la invención se puede combinar con una o más metaloproteasas, tales como una metaloproteasa M4, incluidas la Neutrase™ o termolisina. Tales combinaciones pueden comprender además combinaciones de otras enzimas detergentes según se ha expuesto anteriormente.

[0269] El proceso de limpieza o el proceso de cuidado de artículos textiles puede ser, por ejemplo, un proceso para lavar la ropa, un proceso para lavar la vajilla o para limpiar superficies duras tales como azulejos de baño, suelos, superficies de mesas, desagües, fregaderos o lavabos. Los procesos para lavar la ropa pueden ser, por ejemplo, de lavado doméstico pero pueden ser también de lavado industrial. Además, la invención se refiere a un proceso para lavar telas y/o prendas donde el proceso comprende tratar las telas con una solución de lavado que contiene una composición detergente y al menos una proteasa de la invención. El proceso de limpieza o un proceso de cuidado de artículos textiles se puede llevar a cabo, por ejemplo, en un proceso de lavado a máquina o en un proceso de lavado a mano. La solución de lavado puede ser, por ejemplo, una solución de lavado acuosa que contiene una composición detergente.

[0270] Las telas y/o prendas sujetas a un proceso de lavado, de limpieza o de cuidado de artículos textiles de la presente invención pueden ser ropa que se pueda lavar de manera convencional, por ejemplo, ropa doméstica. Preferentemente, la mayor parte de la ropa está constituida por prendas y telas, que incluyen artículos de punto, tejidos, vaqueros, no tejidos, fieltros, hilos y toallas. Las telas pueden tener una base celulósica, tal como materiales celulósicos naturales, que incluyen algodón, fibra de lino, tejido de lino, yute, ramio, sisal o fibra de coco, o materiales celulósicos hechos por el hombre (p. ej., que se han originado a partir de pulpa de madera), que incluyen viscosa/rayón, ramio, fibras de acetato de celulosa (tricell), lyocell o mezclas de estos. Las telas también pueden tener una base no celulósica tal como poliamidas naturales, que incluyen lana, camello, cachemir, angora, conejo y seda, o un polímero sintético tal como nailon, aramida, poliéster, acrílico, polipropileno y spandex/elastano o mezclas de estos, así como también una mezcla de fibras de base celulósica y de base no celulósica. Algunos ejemplos de mezclas son mezclas de algodón y/o rayón/viscosa con uno o más materiales que los acompañan, tales como lana, fibras sintéticas (p. ej., fibras de poliamida, fibras acrílicas, fibras de poliéster, fibras de alcohol polivinílico, fibras de cloruro polivinílico, fibras de poliuretano, fibras de poliurea, fibras de aramida) y fibras que contienen celulosa (p. ej., rayón/viscosa, ramio, fibra de lino, tejido de lino, yute, fibras de acetato de celulosa, lyocell).

[0271] En los últimos años se ha generado un interés cada vez mayor por reemplazar componentes en los detergentes que derivan de productos petroquímicos con componentes biológicos renovables tales como enzimas y polipéptidos, sin que se comprometa el rendimiento de lavado. Cuando los componentes de las composiciones detergentes cambian, se necesitan nuevas actividades enzimáticas o nuevas enzimas que tengan propiedades alternativas y/o mejoradas en comparación con las enzimas detergentes utilizadas normalmente, tales como proteasas, lipasas y amilasas, para conseguir un rendimiento de lavado similar o mejorado en comparación con las composiciones detergentes tradicionales.

[0272] La invención además se refiere al uso de proteasas de la invención, un proceso de eliminación de manchas proteínicas. Las manchas proteínicas pueden ser manchas tales como manchas de comida, p. ej., comida para bebés, sebo, cacao, huevo, sangre, leche, tinta, césped o una combinación de estos.

[0273] 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 cual permite que la mancha que se está limpiando se separe y disperse y a continuación sea eliminada, otros componentes como los sistemas de decoloración eliminan la coloración a menudo por oxidación y muchos decolorantes también tienen potentes propiedades bactericidas, y se utilizan para desinfectar y esterilizar. Sin embargo, otros componentes como los adyuvantes y quelantes ablandan el agua de lavado, p. ej., eliminando iones metálicos del líquido.

[0274] En una modalidad particular, la invención se refiere al uso de una composición que comprende una proteasa de la invención, donde la composición enzimática comprende además al menos uno o más de los siguientes elementos: un tensioactivo, un adyuvante, un quelante o un agente quelante, un sistema decolorante o componente decolorante, para lavar la ropa o lavar la vajilla.

[0275] En una modalidad preferida de la invención, la cantidad de tensioactivo, adyuvante, quelante o agente

quelante, sistema decolorante y/o componente decolorante se reduce en comparación con la cantidad de tensioactivo, adyuvante, quelante o agente quelante, sistema decolorante y/o componente decolorante utilizada sin la proteasa añadida de la invención. Preferentemente, el o los componentes que son un tensioactivo, un adyuvante, un quelante o agente quelante, un sistema de decoloración y/o un componente de decoloración, están presentes en una cantidad que es un 1% inferior, tal como un 2% inferior, tal como un 3% inferior, tal como un 4% inferior, tal como un 5% inferior, tal como un 6% inferior, tal como un 7% inferior, tal como un 8% inferior, tal como un 9% inferior, tal como un 10% inferior, tal como un 15% inferior, tal como un 20% inferior, tal como un 25% inferior, tal como un 30% inferior, tal como un 35% inferior, tal como un 40% inferior, tal como un 45% inferior, tal como un 50% inferior a la cantidad del componente en el sistema sin la adición de la proteasa de la invención, tal como una cantidad convencional del componente. En un aspecto, la proteasa de la invención se utiliza en composiciones detergentes en donde la composición está libre de al menos un componente que es un tensioactivo, un adyuvante, un quelante o agente quelante, sistema de blanqueo o componente de blanqueo y/o polímero.

#### Método de lavado

[0276] Las composiciones detergentes que comprenden una proteasa de la presente invención son adecuadas idealmente para su uso en aplicaciones de lavandería. Por consiguiente, la presente invención incluye un método para lavar una tela. El método comprende los pasos de poner en contacto la tela que se ha de lavar con una solución de limpieza de la ropa que comprende la composición detergente de acuerdo con la invención. La tela puede comprender cualquier tela que se pueda lavar en condiciones de uso normales para el usuario. La solución tiene preferentemente un pH de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 9. Las composiciones se pueden emplear con concentraciones de aproximadamente 100 ppm, preferentemente de 500 ppm a aproximadamente 15 000 ppm en solución. La temperatura del agua estará comprendida normalmente en el intervalo de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 90 °C, incluidos 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 relación del agua respecto a la tela está comprendida normalmente entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 30:1.

[0277] En modalidades particulares, el método de lavado se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 11.5, o en modalidades alternativas incluso de aproximadamente 6 a aproximadamente 10.5, tal como de aproximadamente 5 a aproximadamente 11, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 11, de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 10, de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 9, de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 8, de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 7, de aproximadamente 6 a aproximadamente 11, de aproximadamente 6 a aproximadamente 10, de aproximadamente 6 a aproximadamente 9, de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, de aproximadamente 6 a aproximadamente 7, de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 11, de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 10, de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 9, de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 8, de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 7, de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 6.5 a aproximadamente 7, de aproximadamente 7 a aproximadamente 11, de aproximadamente 7 a aproximadamente 10, de aproximadamente 7 a aproximadamente 9 o de aproximadamente 7 a aproximadamente 8, preferentemente de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 9 y más preferentemente e aproximadamente 6 a aproximadamente 8.

[0278] En modalidades particulares, el método de lavado se lleva a cabo con un grado de dureza de aproximadamente 0 °dH a aproximadamente 30 °dH, tal como de 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, 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 y aproximadamente 30 °dH. En condiciones de lavado europeas típicas, el grado de dureza es de aproximadamente 15 °dH, en condiciones de lavado de EE. UU. típicas, de aproximadamente 6 °dH y en condiciones de lavado asiáticas típicas, de aproximadamente 3 °dH.

[0279] La presente invención se refiere a un método para limpiar una tela, vajilla o una superficie dura con una composición detergente que comprende una proteasa de la invención.

[0280] Una modalidad preferida se refiere a un método de limpieza, donde el método comprende los siguientes pasos: poner en contacto un objeto con una composición de limpieza que comprende una proteasa de la invención en condiciones adecuadas para limpiar el objeto. En una modalidad preferida, la composición de limpieza es una composición detergente y el proceso es un proceso para lavar la ropa o lavar la vajilla.

5 [0281] Otra modalidad más se refiere a un método para eliminar manchas de una tela que comprende poner en contacto la tela con una composición que comprende una proteasa de la invención en condiciones adecuadas para limpiar el objeto.

10 [0282] En una modalidad preferida, las composiciones para su uso en los métodos anteriores además comprenden al menos una enzima adicional tal como se establece en la sección "otras enzimas" precedente, tal como una enzima seleccionada del grupo que consiste en carbohidrasas, peptidasas, proteasas, lipasas, celulasa, xilanasas o cutinasas o una combinación de las mismas. En otra modalidad preferida más, las composiciones comprenden una cantidad reducida de al menos uno o más de los siguientes componentes: un tensioactivo, un adyuvante, un quelante o agente quelante, un sistema decolorante o componente decolorante o un polímero.

15 [0283] También se consideran composiciones y métodos para tratar telas (p. ej., para desaprestar un artículo textil) utilizando una o más proteasas de la invención. La proteasa se puede utilizar en cualquier método de tratamiento de telas que sea de uso común en la técnica (remítase, p. ej., a la patente de los EE. UU. N.º 6,077,316. Por ejemplo, en un aspecto, el tacto y apariencia de una tela se mejoran mediante un método que comprende poner en contacto la tela con una proteasa en una solución. En un aspecto, la tela se trata con la solución a presión.

20 [0284] En una modalidad, se aplica la proteasa durante o después del tejido de los artículos textiles, o durante la etapa de desaprestado, o uno o más pasos de procesamiento de la tela. Durante el tejido de los artículos textiles, las fibras se exponen a un estrés mecánico considerable. Antes del tejido en telares mecánicos, los hilos de urdimbre se recubren a menudo con almidón o derivados de almidón de apresto con el fin de aumentar su resistencia a la tracción y prevenir la rotura. Se puede aplicar la proteasa para eliminar estas proteínas o derivados de proteínas de apresto. Después de que se hayan tejido los artículos textiles, la tela se puede someter a una etapa de desaprestado. Después de esto se pueden llevar a cabo uno o más pasos adicionales de procesamiento de la tela. El desaprestado es el acto de eliminar el apresto de los artículos textiles. Después del tejido, el recubrimiento de apresto debe eliminarse antes de procesar adicionalmente la tela con el fin de garantizar un resultado homogéneo y a prueba de lavados. También se proporciona un método de desaprestado que comprende una hidrólisis enzimática del apresto mediante la acción de una enzima.

25 Usos a temperatura baja

[0285] Una modalidad de la invención trata sobre un método de realizar lavandería, lavado de vajilla o limpieza industrial que comprende poner en contacto una superficie a ser limpiada con una proteasa de la invención, y en donde la lavandería, lavado de vajilla y limpieza industrial o institucional se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 40°C o inferior. Una modalidad de la invención se refiere al uso de una proteasa de la invención en un proceso para lavar la ropa, lavar la vajilla o de limpieza, donde la temperatura al lavar la ropa, lavar la vajilla o la limpieza industrial es de aproximadamente 40 °C o inferior.

30 [0286] En otra modalidad, la invención se refiere al uso de una proteasa de la invención en un proceso para eliminar proteínas, donde la temperatura en el proceso para eliminar proteínas es de aproximadamente 40 °C o inferior.

[0287] Por lo tanto, un aspecto de la invención se refiere al uso de un polipéptido que tiene una identidad secuencial con respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de 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% que tiene actividad proteasa en un proceso de lavandería, de lavado de vajilla o de limpieza, donde la temperatura en el lavado de ropa, lavado de vajilla, limpieza industrial es aproximadamente 40 °C o inferior.

35 [0288] La presente invención también se relaciona con el uso de procesos de lavandería, lavado de vajilla o limpieza industrial de una proteasa de la invención que tiene al menos una propiedad mejorada en comparación con una proteasa subtilisina 309 con (SEQ ID NO 4) y en donde la temperatura en el proceso de lavandería, lavado de vajilla o limpieza industrial se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 40°C o inferior.

40 [0289] En cada uno de los métodos y usos identificados anteriormente, la temperatura de lavado es de aproximadamente 40 °C o inferior, tal como aproximadamente 39 °C o inferior, tal como aproximadamente 38 °C o inferior, tal como aproximadamente 37 °C o inferior, tal como aproximadamente 36 °C o inferior, tal como aproximadamente 35 °C o inferior, tal como aproximadamente 34 °C o inferior, tal como aproximadamente 33 °C o inferior.

inferior, tal como aproximadamente 32 °C o inferior, tal como aproximadamente 31 °C o inferior, tal como aproximadamente 30 °C o inferior, tal como aproximadamente 29 °C o inferior, tal como aproximadamente 28 °C o inferior, tal como aproximadamente 27 °C o inferior, tal como aproximadamente 26 °C o inferior, tal como aproximadamente 25 °C o inferior, tal como aproximadamente 24 °C o inferior, tal como aproximadamente 23 °C o inferior, tal como aproximadamente 22 °C o inferior, tal como aproximadamente 21 °C o inferior, tal como aproximadamente 20 °C o inferior, tal como aproximadamente 19 °C o inferior, tal como aproximadamente 18 °C o inferior, tal como aproximadamente 17 °C o inferior, tal como aproximadamente 16 °C o inferior, tal como aproximadamente 15 °C o inferior, tal como aproximadamente 14 °C o inferior, tal como aproximadamente 13 °C o inferior, tal como aproximadamente 12 °C o inferior, tal como aproximadamente 11 °C o inferior, tal como aproximadamente 10 °C o inferior, tal como aproximadamente 9 °C o inferior, tal como aproximadamente 8 °C o inferior, tal como aproximadamente 7 °C o inferior, tal como aproximadamente 6 °C o inferior, tal como aproximadamente 5 °C o inferior, tal como aproximadamente 4 °C o inferior, tal como aproximadamente 3 °C o inferior, tal como aproximadamente 2 °C o inferior o tal como aproximadamente 1 °C o inferior.

[0290] En otra modalidad preferida, la temperatura de lavado está comprendida en el intervalo de aproximadamente 5-40 °C, tal como aproximadamente 5-30 °C, aproximadamente 5-20 °C, aproximadamente 5-10 °C, aproximadamente 10-40 °C, aproximadamente 10-30 °C, aproximadamente 10-20 °C, aproximadamente 15-40 °C, aproximadamente 15-30 °C, aproximadamente 15-20 °C, aproximadamente 20-40 °C, aproximadamente 20-30 °C, aproximadamente 25-40 °C, aproximadamente 25-30 °C o aproximadamente 30-40 °C. En una modalidad particularmente preferida, la temperatura de lavado es de aproximadamente 30 °C.

[0291] En modalidades particulares, el método de lavado a baja temperatura se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 11.5, o en modalidades alternativas incluso de aproximadamente 6 a aproximadamente 10.5, tal como de aproximadamente 5 a aproximadamente 11, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 11, de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 10, de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 9, de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 8, de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 7, de aproximadamente 6 a aproximadamente 11, de aproximadamente 6 a aproximadamente 10, de aproximadamente 6 a aproximadamente 9, de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, de aproximadamente 6 a aproximadamente 7, de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 11, de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 10, de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 9, de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 8, de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 7, de aproximadamente 7 a aproximadamente 11, de aproximadamente 7 a aproximadamente 10, de aproximadamente 7 a aproximadamente 9 o de aproximadamente 7 a aproximadamente 8, preferentemente de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 9 y más preferentemente de aproximadamente 6 a aproximadamente 9.

[0292] En modalidades particulares, el método de lavado a baja temperatura se lleva a cabo con un grado de dureza de aproximadamente 0 °dH a aproximadamente 30 °dH, tal como de 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, 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 y aproximadamente 30 °dH. En condiciones de lavado europeas típicas, el grado de dureza es de aproximadamente 15 °dH, en condiciones de lavado de EE. UU. típicas, de aproximadamente 6 °dH y en condiciones de lavado asiáticas típicas, de aproximadamente 3 °dH.

50 Alimentos para animales

[0293] La presente invención también se dirige a composiciones alimenticias y aditivos alimenticios que comprenden las proteasas de la invención.

[0294] Por lo tanto en una modalidad, la presente invención se refiere a una composición alimenticia o un aditivo alimenticio que comprende un polipéptido aislado que tiene una identidad secuencial con respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de 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%, que tiene actividad proteasa.

[0295] Otro aspecto de la divulgación se refiere a un método para el tratamiento de proteínas que comprende el paso de agregar al menos una proteasa de acuerdo con la invención a al menos una proteína o fuente de proteína, tal

como soja. Por lo tanto, un aspecto se refiere a un método para el tratamiento de proteínas que comprende el paso de agregar al menos un polipéptido aislado que tiene una identidad de secuencia con respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de al menos 60%, al menos 61%, al menos 62%, al menos 63%, al menos 64%, al menos 65%, al menos 66%, al menos 67%, al menos 68%, al menos 69%, al menos 70%, al menos 71%, al menos 72%, al menos 73%, al menos 74%, al menos 75%, al menos 76%, al menos 77%, al menos 78%, al menos 79%, al menos 80%, al menos 81%, al menos 82%, al menos 83%, al menos 84%, al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, 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% que tienen actividad proteasa a al menos una proteína o fuente de proteína tal como soja.

[0296] El término "animal" incluye todos los animales. Algunos ejemplos de animales son los rumiantes y los no rumiantes. Los animales rumiantes incluyen, por ejemplo, animales tales como ovejas, cabras, ganado, p. ej., ganado vacuno, vacas y terneros, venado, yak, camello, llama y canguro. En una modalidad particular, el animal es un animal que no es rumiante. Los animales no rumiantes incluyen animales monogástricos, por ejemplo cerdos o suidos (incluidos, a modo no taxativo, los lechones, los cerdos de engorde, y las cerdas); las aves de corral tales como pavos, patos y gallinas (incluidos, a modo no taxativo los pollos y las gallinas ponedoras); los caballos (incluidos, a modo no taxativo los de sangre caliente, los de sangre fría y los de sangre tibia), los terneros; los peces (incluidos, a modo no taxativo coronado, arapaima, barbo, lubina, anjova, bocachico, brema, cavilat, cachama, carpa, bagre, catla, sabalote, salvelino, cíclidos, cobia, bacalao, mojarra, dorada, corvina de agua dulce, anguila, gobio, pez dorado, gourami, mero, guapote, halibut, java, labeo, lai, locha payaso, verdel, sabalote, mojarra, sardina, lisa, paco, crómido verde, pejerrey, perca, lucio europeo, pompano, rutilo, salmón, sampa, sauger, lubina, dorada, sardinilla, guavina, pez cabeza de serpiente, pargo, róbalo común, lenguado, pie de espina, esturión, pez sol, pez migratorio, tenca, terror, tilapia, trucha, atún, rodaballo, corégono de Lochmaben, lucioperca y pez blanco); y los crustáceos (incluidos a modo no taxativo los camarones y las gambas).

[0297] El término "alimento" o "composición alimenticia" se refiere a cualquier composición, mezcla, preparado o compuesto adecuado para ser consumido por un animal o destinado a serlo.

[0298] En el uso de acuerdo con la invención, la proteasa se puede administrar al animal antes, después o a la vez que la dieta. Se prefiere este último caso.

[0299] En una modalidad particular, la proteasa, en la forma en la que se añade al alimento, o cuando se incluye en un aditivo alimentario, está bien definida. La expresión "bien definida/o" quiere decir que el preparado de proteasa tiene una pureza de al menos un 50% según se determina mediante cromatografía de exclusión por tamaño (remítase al Ejemplo 12 del documento WO 01/58275). En otras modalidades particulares, el preparado de proteasa tiene una pureza de al menos un 60, 70, 80, 85, 88, 90, 92, 94 o al menos un 95% según se determina mediante este método.

[0300] Un preparado de proteasa bien definido es conveniente. Por ejemplo, es mucho más fácil incluir en el alimento una dosis correcta de una proteasa que esté esencialmente exenta de otras proteasas interferentes o contaminantes. La expresión "dosis correcta" se refiere en particular al objetivo de obtener resultados constantes y coherentes, y a la capacidad de optimizar la dosis en función del efecto deseado.

[0301] Sin embargo, para el uso en alimentos para animales, la proteasa no necesita ser tan pura; puede incluir, p. ej., otras enzimas, en cuyo caso se podría denominar preparado de proteasa.

[0302] El preparado de proteasa se puede (a) añadir directamente al alimento (o utilizar directamente en un proceso de tratamiento de proteínas), o (b) se puede utilizar en la producción de una o más composiciones intermedias, tales como premezclas o aditivos alimentarios, que se añaden posteriormente al alimento (o se utilizan en un proceso de tratamiento). El grado de pureza descrito anteriormente se refiere a la pureza del preparado de proteasa original, independientemente de que se utilice de acuerdo con el apartado (a) o (b) anteriores.

[0303] Los preparados de proteasa con purezas de este orden de magnitud se pueden obtener en particular utilizando métodos de producción recombinantes, mientras que no se obtienen tan fácilmente y además están supeditados a una variación de lote a lote mucho mayor cuando la proteasa se produce mediante métodos de fermentación tradicionales.

[0304] Naturalmente, estos preparados de proteasas se pueden mezclar con otras enzimas.

[0305] La proteína puede ser una proteína de origen animal, tal como harina de huesos y carne, harina de plumas y/o harina de pescado; o puede ser una proteína vegetal.

- 5 [0306] La expresión "proteínas vegetales", tal como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier compuesto, composición, preparado o mezcla que incluya al menos una proteína derivada de una hortaliza u originada a partir de esta, incluidas las proteínas modificadas y los derivados proteicos. En modalidades particulares, el contenido proteico de las proteínas vegetales es de al menos un 10, 20, 30, 40, 50 o un 60% (p/p).
- 10 [0307] Las proteínas vegetales se pueden derivar de fuentes de proteínas vegetales, tales como legumbres y cereales, por ejemplo, materiales procedentes de plantas de las familias *Fabaceae* (*Leguminosae*), *Cruciferaeae*, *Chenopodiaceae* y *Poaceae*, tales como la harina de soja, harina de altramuz y harina de colza.
- 15 [0308] En una modalidad particular, la fuente de proteínas vegetales es material de una o más plantas de la familia *Fabaceae*, por ejemplo, soja, altramuz, chícharo o frijol.
- [0309] En otra modalidad particular, la fuente de proteínas vegetales es un material procedente de una o más plantas de la familia *Chenopodiaceae*, p. ej., remolacha, remolacha azucarera, espinaca o quinoa.
- 20 [0310] Otros ejemplos de fuentes de proteínas vegetales son la colza, la semilla de girasol, la semilla de algodón y la col.
- [0311] La soja es una fuente de proteínas vegetales preferida.
- [0312] Otros ejemplos de fuentes de proteínas vegetales son los cereales tales como la cebada, trigo, centeno, avena, maíz, arroz, triticale y sorgo.
- 25 [0313] En una modalidad particular de un proceso de tratamiento, la o las proteasas en cuestión están afectando (o están actuando o ejerciendo su influencia solubilizadora en) las proteínas, tales como proteínas o fuentes de proteínas vegetales. Para conseguir esto, la proteína o la fuente de la proteína normalmente se suspende en un disolvente, p. ej., un disolvente acuoso tal como el agua, y se ajustan los valores del pH y la temperatura teniendo en cuenta las características de la enzima en cuestión. Por ejemplo, el tratamiento puede tener lugar a un valor de pH al cual la actividad de la presente proteasa sea de al menos un 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o al menos un 90%. Asimismo, por ejemplo, el tratamiento puede tener lugar a una temperatura a la cual la actividad de la presente proteasa sea de al menos un 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o al menos un 90%. Las indicaciones de actividad porcentual anteriores son relativas a las actividades máximas. La reacción enzimática continúa hasta obtener el resultado deseado, después de lo cual se puede detener o no mediante la inactivación de la enzima, p. ej., mediante un paso de tratamiento con calor.
- 30 [0314] En otra modalidad particular de un proceso de tratamiento de la invención, la acción de la proteasa se mantiene, lo cual quiere decir que, p. ej., la proteasa se añade a las proteínas, pero su influencia hidrolizante no se enciende, por así decirlo, hasta más tarde cuando se desee, una vez que se hayan establecido las condiciones hidrolizantes adecuadas o una vez que se hayan inactivado los posibles inhibidores enzimáticos o cualesquiera otros medios que se hayan podido aplicar para posponer la acción de la enzima.
- 35 [0315] En una modalidad, el tratamiento es un pretratamiento de alimentos para animales o proteínas que se pueden utilizar en alimentos para animales, es decir, las proteínas se hidrolizan antes de su consumo.
- 40 [0316] La expresión mejorar el valor nutricional de un alimento para animales significa mejorar la disponibilidad de las proteínas, conduciendo así a una mayor extracción de proteínas, mayores rendimientos de proteínas y/o mejor uso de las proteínas. Por lo tanto, aumenta el valor nutricional del alimento y también aumenta la digestibilidad de proteínas y aminoácidos y/o la tasa de crecimiento y/o el aumento de peso y/o la conversión del alimento (es decir, el peso el peso del alimento digerido con relación al aumento de peso) del animal también mejoran.
- 45 [0317] La proteasa puede añadirse a los alimentos en cualquier forma, ya sea como una proteasa relativamente pura o mezclada con otros componentes para la adición a los alimentos para animales, es decir, en forma de aditivos alimentarios para animales, tales como las denominadas premezclas para alimentos para animales.
- 50 [0318] En otro aspecto, la presente invención se refiere a composiciones que se pueden utilizar en alimentos para animales, tales como alimentos para animales y aditivos para alimentos para animales, p. ej., premezclas.
- 55 [0319] Aparte de la proteasa de la invención, los aditivos para alimentos para animales de la invención contienen al menos una vitamina liposoluble, y/o al menos una vitamina hidrosoluble, y/o al menos un mineral traza, y/o al menos un macromineral y/o al menos un aminoácido. Ejemplos de aminoácidos que se utilizan en el alimento para animales
- 60

son lisina, alanina, beta-alanina, treonina, metionina y triptófano.

5 [0320] Además, algunos ingredientes opcionales de los aditivos para alimentos son agentes colorantes, por ejemplo, carotenoides tales como el beta-caroteno, astaxantina y luteína; estabilizantes; aditivos que mejoran el crecimiento y aromatizantes/saborizantes, p. ej., creosol, anetol, deca-, undeca- y/o dodecalactonas, iononas, irona, gingerol, piperidina, ftálica de propilideno, ftálica de butilideno, capsaicina y/o tanino; péptidos antimicrobianos; ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés); especies que generan oxígeno reactivas; además, se puede utilizar un soporte que contenga, por ejemplo, un 40-50% en peso de fibras de madera, un 8-10% en peso de estearina, un 4-5% en peso de cúrcuma en polvo, un 4-58% en peso de romero en polvo, un 22-28% en peso de caliza, un 1-3% en peso de una goma, tal como goma arábiga, un 5-50% en peso de azúcar y/o almidón, y un 5-15% en peso de agua.

15 [0321] Un alimento o aditivo para alimento de la invención también puede comprender al menos otra enzima seleccionada del grupo que consiste en fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); xilanasas (EC 3.2.1.8); galactanasas (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasa (EC 3.2.1.22); otra proteasa (EC 3.4); fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32); fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5); fosfolipasa C (3.1.4.3); fosfolipasa D (EC 3.1.4.4); amilasa tal como, por ejemplo, alfa-amilasa (EC 3.2.1.1); lisozima (EC 3.2.1.1); y beta-glucanasa (EC 3.2.1.4 o EC 3.2.1.6) o cualquier mezcla de las mismas.

20 [0322] En una modalidad particular, el alimento o aditivo alimentario de la invención también comprende una fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26).

25 [0323] En una modalidad particular, el alimento o aditivo alimentario de la invención también comprende una xilanasas (EC 3.2.1.8).

30 [0324] Un alimento o aditivo para alimento de la invención también puede comprender al menos un probiótico o microbiano de alimentación directa (DFM) opcionalmente junto con una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); xilanasas (EC 3.2.1.8); galactanasas (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasa (EC 3.2.1.22); otra proteasa (EC 3.4); fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32); fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5); fosfolipasa C (3.1.4.3); fosfolipasa D (EC 3.1.4.4); amilasa tal como, por ejemplo, alfa-amilasa (EC 3.2.1.1); y beta-glucanasa (EC 3.2.1.4 o EC 3.2.1.6) o cualquier mezcla de las mismas.

35 [0325] El agente microbiano de administración directa puede ser una bacteria de uno o más de los siguientes géneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* y *Megasphaera* o cualquier combinación de las mismas, preferiblemente de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus spp*, y *Pediococcus spp*, *Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Propionibacterium thoenii*, *Lactobacillus farciminus*, *lactobacillus rhamnosus*, *Clostridium butyricum*, *Bifidobacterium animalis ssp. animalis*, *Lactobacillus reuteri*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus salivarius ssp. salivarius*, *Megasphaera elsdenii*, *Propionibacteria sp* y más preferiblemente de *Bacillus subtilis* cepas 3A-P4 (PTA-6506); 15A-P4 (PTA-6507); 22C-P1 (PTA-6508); 2084 (NRRL B-500130); LSSA01 (NRRL-B-50104); BS27 (NRRL B-501 05); BS 18 (NRRL B-50633); y BS 278 (NRRL B-50634).

45 [0326] En una modalidad particular, estas enzimas diferentes están bien definidas (conforme con la definición anterior para los preparados de proteasa).

50 [0327] Algunos ejemplos de péptidos antimicrobianos (AMP, por sus siglas en inglés) son CAP18, Leucocina A, Tiritricina, Protegrina-1, Tanatina, Defensina, Lactoferrina, Lactoferricina y Ovispirina, tal como Novispirina (Robert Lehrer, 2000), Plectasinas y Estatinas, incluidos los compuestos y los polipéptidos descritos en los documentos WO 03/044049 y WO 03/048148, así como también las variantes o los fragmentos de los péptidos anteriores que retienen la actividad antimicrobiana.

55 [0328] En los documentos WO 94/01459 y WO 02/090384 se describen ejemplos de polipéptidos antifúngicos (AFP, por sus siglas en inglés) que son los péptidos de *Aspergillus giganteus* y *Aspergillus niger*, así como también variantes y fragmentos de estos que retienen la actividad antifúngica.

[0329] Algunos ejemplos de ácidos grasos poliinsaturados son los ácidos grasos poliinsaturados C18, C20 y C22 tales como el ácido araquidónico, ácido docosohexanoico, ácido eicosapentaenoico y ácido gamma-linoleico.

60 [0330] Los ejemplos de especies que generan oxígeno reactivas incluyen agentes químicos tales como el perborato, persulfato o percarbonato; y enzimas tales como una oxidasa, una oxigenasa o una sintetasa.

5 [0331] Normalmente las vitaminas lipo- e hidrosolubles, así como también los minerales traza forman parte de la denominada premezcla destinada a ser añadida al alimento, mientras que los macrominerales se suelen añadir por separado al alimento. Cualquiera de estos tipos de composiciones, cuando están enriquecidos en una proteasa de la invención, son un aditivo alimentario para animales de la invención.

10 [0332] En una modalidad particular, el aditivo alimentario para animales de la invención está destinado a ser incluido (o se prescribe para que sea incluido) en dietas o alimentos para animales en niveles comprendidos entre un 0.01 y un 10.0%; más particularmente entre un 0.05 y un 5.0%; o entre un 0.2 y un 1.0% (el % se refiere a los g de aditivo por 100 g de alimento). Esto es así en particular para las premezclas.

[0333] Las siguientes son listas no exclusivas de ejemplos de estos componentes:

15 Algunos ejemplos de vitaminas liposolubles son la vitamina A, vitamina D3, vitamina E y vitamina K, p. ej., la vitamina K3.

[0334] Algunos ejemplos de vitaminas hidrosolubles son la vitamina B12, biotina y colina, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, niacina, ácido fólico y pantotenato, p. ej., Ca-D-pantotenato.

20 [0335] Los ejemplos de minerales traza incluyen el manganeso, zinc, hierro, cobre, yodo, selenio y cobalto.

[0336] Los ejemplos de macrominerales incluyen calcio, fósforo y sodio.

25 [0337] Los requisitos nutricionales de estos componentes (ejemplificados con aves de corral y lechones/cerdos) se enumeran en la Tabla A del documento WO 01/58275. La expresión "requisito nutricional" quiere decir que estos componentes se deben proporcionar en la dieta en las concentraciones indicadas.

30 [0338] Como alternativa, el aditivo alimentario para animales de la invención comprende al menos uno de los componentes individuales especificados en la Tabla A del documento WO 01/58275. La expresión "al menos uno" se refiere a uno o más, uno o dos o tres o cuatro y así sucesivamente hasta un total de trece o hasta un total de quince componentes individuales. Más específicamente, este componente o componentes individuales se incluyen en el aditivo de la invención en una cantidad tal que proporcione una concentración en el alimento comprendida en el intervalo indicado en la columna cuatro o la columna cinco o la columna seis de la Tabla A.

35 [0339] En otra modalidad adicional, el aditivo para alimentos para animales de la invención comprende al menos una de las siguientes vitaminas, preferiblemente para proporcionar una concentración en el alimento comprendida en los intervalos especificados en la tabla a continuación (para dietas para lechones y dietas para pollos, respectivamente).

Tabla 1: Recomendaciones típicas de vitaminas

Vitamina	Dieta para lechones	Dieta para pollos de engorde
Vitamina A	10,000-15,000 IU/kg de alimento	8-12 500 IU/kg de alimento
Vitamina D3	1800-2000 IU/kg de alimento	3000-5000 IU/kg de alimento
Vitamina E	60-100 mg/kg de alimento	150-240 mg/kg de alimento
Vitamina K3	2-4 mg/kg de alimento	2-4 mg/kg de alimento
Vitamina B1	2-4 mg/kg de alimento	2-3 mg/kg de alimento
Vitamina B2	6-10 mg/kg de alimento	7-9 mg/kg de alimento
Vitamina B6	4-8 mg/kg de alimento	3-6 mg/kg de alimento
Vitamina B12	0.03-0.05 mg/kg de alimento	0.015-0.04 mg/kg de alimento
Niacina (Vitamina B3)	30-50 mg/kg de alimento	50-80 mg/kg de alimento
Ácido pantoténico	20-40 mg/kg de alimento	10-18 mg/kg de alimento
Ácido fólico	1-2 mg/kg de alimento	1-2 mg/kg de alimento
Biotina	0.15-0.4 mg/kg de alimento	0.15-0.3 mg/kg de alimento
Cloruro de colina	200-400 mg/kg de alimento	300-600 mg/kg de alimento

40 [0340] La presente invención también se refiere a composiciones alimenticias para animales. Las composiciones alimenticias o dietas para animales tienen un contenido relativamente alto de proteína. Las dietas para aves de corral y cerdos se pueden caracterizar tal como se indica en la Tabla B del documento WO 01/58275, columnas 2-3. Las dietas para peces se pueden caracterizar tal como se indica en la columna 4 de esta Tabla B. Además, estas dietas para peces normalmente tienen un contenido de grasa cruda de al menos 200-310 g/kg.

45

- [0341] El documento WO 01/58275 se corresponde con el documento US 09/779334. Una composición alimenticia para animales de acuerdo con la invención tiene un contenido de proteína cruda de 50-800 g/kg y comprende además al menos una proteasa como la reivindicada en la presente.
- 5 [0342] Además, o como alternativa (al contenido de proteína cruda indicado anteriormente), la composición alimenticia para animales de la invención tiene un contenido de energía metabolizable de 10-30 MJ/kg; y/o un contenido de calcio de 0.1-200 g/kg; y/o un contenido de fósforo disponible de 0.1-200 g/kg; y/o un contenido de metionina de 0.1-100 g/kg; y/o un contenido de metionina junto con cisteína de 0.1-150 g/kg; y/o un contenido de lisina de 0.5-50 g/kg.
- 10 [0343] En modalidades particulares, el contenido de energía metabolizable, proteína cruda, calcio, fósforo, metionina, metionina junto con cisteína y/o lisina está comprendido dentro de cualquiera de los intervalos 2, 3, 4 o 5 de la Tabla B del documento WO 01/58275 (R. 2-5).
- 15 [0344] La proteína cruda se calcula como el nitrógeno (N) multiplicado por un factor de 6.25, es decir, proteína cruda (g/kg) = N (g/kg) x 6.25. El contenido de nitrógeno se determina por el método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1984, Official Methods of Analysis 14.<sup>a</sup> ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C.).
- 20 [0345] La energía metabolizable se puede calcular en función de los requisitos sobre nutrientes en suidos de la publicación del NRC, novena edición revisada de 1988, subcomité sobre la nutrición de suidos, comité sobre la nutrición de animales, consejo de agricultura y consejo nacional de investigación. National Academy Press, Washington, D.C., págs. 2-6, y la tabla europea de valores de energía para los alimentos para aves de corral, centro Spelderholt de investigación y extensión sobre aves de corral, 7361 DA Beekbergen, Países Bajos. Grafisch bedrijf Ponsen & looijen bv, Wageningen. ISBN 90-71463-12-5.
- 25 [0346] El contenido dietético de calcio, fósforo disponible y aminoácidos en las dietas completas para animales se calcula en función de tablas alimenticias tales como Veevoedertabel 1997, gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg 6, 8219 pk Lelystad. ISBN 90-72839-13-7.
- 30 [0347] En una modalidad particular, la composición alimenticia para animales de la invención contiene al menos una proteína vegetal tal como se ha definido anteriormente.
- 35 [0348] La composición alimenticia para animales de la invención también contiene proteína de origen animal, tal como harina de huesos y carne, harina de plumas y/o harina de pescado, normalmente en una cantidad comprendida entre un 0 y un 25%. La composición alimenticia para animales de la invención también puede comprender granos secos de destilería con solubles (DDGS, por sus siglas en inglés), normalmente en cantidades comprendidas entre un 0 y un 30%.
- 40 [0349] En otras modalidades particulares adicionales, la composición alimenticia para animales de la invención contiene un 0-80% de maíz; y/o un 0-80% de sorgo; y/o un 0-70% de trigo; y/o un 0-70% de cebada; y/o un 0-30% de avena; y/o un 0-40% de harina de soja; y/o un 0-25% de harina de pescado; y/o un 0-25% de harina de huesos y carne; y/o un 0-20% de suero lácteo.
- 45 [0350] Las dietas para animales se pueden fabricar, p. ej., como un alimento en forma de harina (no granulado) o alimento granulado. Normalmente, los alimentos molidos se mezclan y se añaden cantidades suficientes de vitaminas y minerales esenciales de acuerdo con las especificaciones para las especies en cuestión. Se pueden añadir enzimas como formulaciones enzimáticas líquidas o sólidas. Por ejemplo, para los alimentos en forma de afrecho se puede añadir una formulación enzimática líquida o sólida antes o durante el paso de mezcla de los ingredientes. Para los alimentos en microesferas, el preparado de proteasa/enzima (líquido o sólido) también se puede añadir antes o durante el paso de los ingredientes del alimento. Normalmente, el preparado de proteasa/enzima líquido se añade después del paso de formación de microesferas. La enzima también se puede incorporar en una premezcla o aditivo alimentario.
- 50 [0351] La enzima puede agregarse a la mezcla de alimento como un gránulo, que está opcionalmente extruido o granulado. El gránulo típicamente comprende una partícula núcleo y uno o más recubrimientos, que son típicamente recubrimientos de sal y/o cera. La partícula núcleo puede ser una mezcla homogénea de un compuesto activo opcionalmente junto con sales (por ejemplo, sal de zinc o calcio orgánica o inorgánica) o una partícula inerte con un compuesto activo aplicado a la misma. El compuesto activo es la proteasa de la invención opcionalmente combinada con una o más enzimas adicionales. La partícula inerte puede ser soluble en agua o insoluble en agua, por ejemplo, almidón, un azúcar (tal como sacarosa o
- 60

lactosa) o una sal (tal como NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). El recubrimiento de sal tiene típicamente un espesor de al menos 1 µm y puede ser una sal particular o una mezcla de sales, tal como Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> y/o citrato de sodio. Otros ejemplos son aquellos descritos en, por ejemplo, los documentos WO 2008/017659, WO 2006/034710, WO 1997/05245, WO 1998/54980, WO 1998/55599, WO 2000/70034 o recubrimiento de polímero tal como se describe en el documento WO 2001/00042.

[0352] Alternativamente, la proteasa puede prepararse mediante el congelamiento de una mezcla de solución enzimática líquida con un agente de carga tal como harina de soja molida y luego se liofiliza la mezcla.

[0353] La concentración de enzima final en la dieta está comprendida dentro del intervalo de 0.01-200 mg de proteína enzimática por kg de dieta, por ejemplo, en el intervalo de 0.5-25 mg de proteína enzimática por kg de dieta para animales.

[0354] Naturalmente, la proteasa se debe aplicar en una cantidad eficaz, es decir, en una cantidad adecuada para mejorar la hidrólisis, digestibilidad y/o mejorar el valor nutricional del alimento. En la actualidad, se contempla que la enzima se administre en una o más de las siguientes cantidades (intervalos de dosis): 0.01-200; 0.01-100; 0.5-100; 1-50; 5-100; 10-100; 0.05-50; o 0.10-10 – siendo todos estos intervalos en mg de proteína proteasa por kg de alimento (ppm).

[0355] Para determinar los mg de proteína de tipo proteasa por kg de alimento, la proteasa se purifica a partir de la composición alimenticia y la actividad específica de la proteasa purificada se determina utilizando un ensayo relevante (remítase a la sección de la actividad proteasa, los sustratos y los ensayos). La actividad proteasa de la composición alimenticia como tal también se determina utilizando el mismo ensayo y, sobre la base de estas dos determinaciones, se calcula la dosis en mg de proteína proteasa por kg de alimento.

[0356] Los mismos principios se aplican para determinar los mg de proteína de tipo proteasa en aditivos alimenticios. Naturalmente, si se dispone de una muestra de la proteasa empleada para preparar el aditivo alimentario o el alimento, la actividad específica se determina a partir de esta muestra (sin necesidad de purificar la proteasa de la composición alimenticia o el aditivo alimentario).

[0357] La presente invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben considerarse limitantes del alcance de la invención.

## Materiales y métodos

### Ensayos de lavado

#### Ensayo de estrés mecánico automático (AMSA) para lavar la ropa

[0358] Con el fin de evaluar el rendimiento de lavado en el lavado de la ropa, se llevaron a cabo experimentos utilizando el ensayo de estrés mecánico automático (AMSA, por sus siglas en inglés). Con el AMSA, se puede examinar el rendimiento de lavado de una gran cantidad de soluciones detergentes enzimáticas de volumen pequeño. La placa AMSA tiene una serie de ranuras para las soluciones de ensayo y una tapa que aprieta con firmeza la muestra de ropa, el artículo textil que se ha de lavar, contra todos los orificios de las ranuras. Durante el tiempo de lavado, la placa, las soluciones de ensayo, el artículo textil y la tapa se agitaron enérgicamente para que la solución de ensayo entrara en contacto con el artículo textil y para aplicar un estrés mecánico de modo regular, periódico y oscilante. Para consultar una descripción más detallada, remítase al documento WO02/42740, especialmente al párrafo "Special method embodiments" en las páginas 23-24.

[0359] El rendimiento de lavado se midió como el brillo del color del artículo textil lavado. El brillo también se puede expresar como la intensidad de la luz reflejada por la muestra cuando se ilumina con luz blanca. Cuando la muestra está manchada, la intensidad de la luz reflejada es menor que la de la muestra limpia. Por lo tanto, la intensidad de la luz reflejada se puede utilizar para medir el rendimiento de lavado.

[0360] Las medidas del color se realizaron con un escáner de superficie plana profesional (Kodak iQsmart, Kodak, Midtager 29, DK-2605 Brøndby, Dinamarca), el cual se utiliza para captura una imagen del textil lavado.

[0361] Con el fin de extraer un valor para la intensidad de la luz a partir de las imágenes escaneadas, los valores en píxeles de 24 bits de la imagen se convirtieron en valores para rojo, verde y azul (RBG, por sus siglas en inglés). El valor de la intensidad (Int) se calculó añadiendo los valores RBG juntos como vectores y tomando a continuación la longitud del vector resultante:

5

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

Tabla 1: Composición de los detergentes modelo y materiales de ensayo

Detergente modelo en polvo para lavar la ropa A	Citrato de sodio dihidratado, 32.3% Sodio-LAS 24.2% Laurilsulfato de sodio, 32.2% Neodol 25-7 (alcohol etoxilado), 6.4% Sulfato de sodio, 4.9%
Detergente modelo líquido para lavar la ropa B	Agua 30.63% Hidróxido de sodio, 2.95% 11.52% de ácido dodecibencenosulfónico Ácidos grasos (soja), 5.50% 5.05% de propano-1,2-diol (MPG) Agua 17.38% Alcohol C13 etoxilado, 10.50% Dietilentriaminopentakis(ácido metileno-fosfónico) (DTMPA), 3.08% Trietanolamina (TEA), 2.22% Ácidos grasos (coco), 4.50% Citrato de sodio monohidratado, 1.00% Etanol 4.63% Syntran 5909 (opacificador), 0.30% Perfume 0.35%
Material de prueba	PC-03 (Leche-chocolate/tinta sobre algodón/poliéster) C-10 (Aceite/leche/pigmento sobre algodón) PC-05 (Sangre/leche/tinta sobre algodón/poliéster)

10

[0362] Los materiales de ensayo se obtuvieron del Center For Testmaterials BV, P.O. Box 120, 3133 KT Vlaardingen, Países Bajos.

Ensayos de proteasas

15

1) Ensayo de Suc-AAPF-pNA:

[0363]

20 Sustrato de pNA: Suc-AAPF-pNA (Bachem L-1400).  
Temperatura: Temperatura ambiente (25°C)  
Amortiguadores de ensayo: ácido succínico 100 mM, HEPES 100 mM, CHES 100 mM, CABS 100 mM, CaCl<sub>2</sub>, 1 mM, KCl 150 mM, un 0.01% de Tritón X-100 ajustados a valores de pH de 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.

25

[0364] Se mezclaron 20 µL de proteasa (diluidos en Tritón X-100 al 0.01%) con 100 µL de amortiguador de ensayo. Se inició el ensayo añadiendo 100 µL de sustrato pNA (50 mg disueltos en 1.0 mL de DMSO y diluidos adicionalmente 45x con 0.01% Triton X-100). El incremento en la DO<sub>405</sub> se monitorizó como una medición de la actividad proteasa.

30 2) Ensayo de Protazyme AK:

[0365]

35 Sustrato: comprimido de Protazyme AK (caseína teñida y reticulada, de Megazyme)  
Temperatura: controlada (temperatura del ensayo).  
Amortiguadores de ensayo: ácido succínico 100 mM, HEPES 100 mM, CHES 100 mM, CABS 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, KCl 150 mM, 0.01% de Tritón X-100, pH 7.0.

[0366] Se suspendió un comprimido de Protazyme AK en 2.0 mL de Tritón X-100 al 0.01% mezclando suavemente. Se dispensaron 500  $\mu$ L de esta suspensión y 500  $\mu$ L del amortiguador de ensayo en un tubo Eppendorf y se colocaron en hielo. Se añadieron 20  $\mu$ L de la muestra de proteasa (diluida en Tritón X-100 al 0.01%). El ensayo se inició transfiriendo el tubo Eppendorf a un termomezclador Eppendorf, el cual se fijó a la temperatura de ensayo. El tubo se incubó durante 15 minutos en el termomezclador Eppendorf a la mayor velocidad de agitación (1400 rpm). La incubación se detuvo transfiriendo el tubo de nuevo al baño de hielo. A continuación, el tubo se centrifugó en una centrífuga enfriada con hielo durante unos pocos minutos y se transfirieron 200  $\mu$ L del sobrenadante a una placa de microvaloración. Se leyó la  $DO_{650}$  como una medición de la actividad proteasa. Se incluyó un amortiguador como control negativo en el ensayo (en lugar de la enzima).

### 3) Ensayo de Suc-AAPX-pNA:

15 [0367]

Sustratos pNA : Suc-AAPA-pNA (Bachem L-1775)  
 Suc-AAPR-pNA (Bachem L-1720)  
 Suc-AAPD-pNA (Bachem L-1835)  
 Suc-AAPI-pNA (Bachem L-1790)  
 Suc-AAPM-pNA (Bachem L-1395)  
 Suc-AAPV-pNA (Bachem L-1770)  
 Suc-AAPL-pNA (Bachem L-1390)  
 Suc-AAPE-pNA (Bachem L-1710)  
 Suc-AAPK-pNA (Bachem L-1725)  
 Suc-AAPF-pNA (Bachem L-1400)  
 Temperatura: Temperatura ambiente (25°C)  
 Amortiguador de ensayo: ácido succínico 100 mM, HEPES 100 mM, CHES 100 mM, CABS 100 mM,  $CaCl_2$  1 mM, KCl 150 mM, 0.01% de Tritón X-100, pH 9.0.

30 [0368] Se mezclaron 20  $\mu$ L de proteasa (diluidos en Tritón X-100 al 0.01%) con 100  $\mu$ L de amortiguador de ensayo. El ensayo se inició añadiendo 100  $\mu$ L de sustrato pNA (50 mg disueltos en 1.0 mL de DMSO y diluidos adicionalmente 45x con Tritón X-100 al 0.01%). El incremento en la  $DO_{405}$  se monitorizó como una medición de la actividad proteasa.

35 Ensayo de harina de soja-maíz (Ensayo SMM, por sus siglas en inglés)

Actividad proteasa en harina de soja-maíz a pH 3, 4, 5, 6 y 7

40 [0369] Se empleó un ensayo de punto final utilizando harina de soja-maíz como sustrato para obtener el perfil de actividad de las proteasas a pH 3-7.

45 [0370] Amortiguadores de ensayo: ácido succínico 100 mM, HEPES 100 mM, CHES 100 mM, CAPS 100 mM,  $CaCl_2$  1 mM, KCl 150 mM, 0.01% Triton X-100 ajustado usando HCl o NaOH para proporcionar valores de pH de 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 y 11.0 cuando se mezclan 10 ml de amortiguador de ensayo con 1 g de harina de soja-maíz (relación 30:70).

50 [0371] Se mezclan 2 mL de harina de soja-maíz durante 30 min antes de la adición de proteasa y la incubación durante 3 horas a 40 °C (500 rpm). Se añade proteasa a través de 100  $\mu$ L de amortiguador de acetato de sodio 100 mM (NaAc) (9.565 g/L de NaAc, 1.75 g/L de ácido acético,  $CaCl_2$  5 mM, BSA al 0.01%, Tween20 al 0.01%, pH 6.0). Se recolectan los sobrenadantes después de la centrifugación (10 min, 4000 rpm, 0°C) y se determina la actividad proteica usando un ensayo colorimétrico basado en el método de o-ftatdialdehído (OPA) básicamente de acuerdo con Nielsen et al. (Nielsen, PM, Petersen, D, Dampmann, C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *J Food Sci*, 2001, 66: 642-646). Este ensayo detecta los grupos  $\alpha$ -amino libres y, por lo tanto, se puede medir la actividad proteasa como un incremento de la absorbancia. En primer lugar, se filtran 500  $\mu$ L de cada sobrenadante a través de un filtro Microcon de 100 kDa por centrifugación (60 min, 11,000 rpm, 5 °C). Las muestras se diluyen 10x en agua desionizada y se añaden 25  $\mu$ L de cada muestra a una placa de microvaloración de 96 pocillos (5 réplicas). Por último, se dispensan 200  $\mu$ L del reactivo OPA en todos los pocillos, la placa se agita (10 s, 750 rpm) y se mide la absorbancia a 340 nm. El nivel de actividad proteasa se calcula como la diferencia entre la absorbancia en la muestra tratada con enzima y la muestra en blanco y expresado como 'Abs x factor de dilución'.

**Ejemplos**

Cepas

5

[0372] *Dactylosporangium variesporum* DSM 43911.

Medios y soluciones

**Ejemplo 1:** Preparación de ADN y secuenciación del genoma *Dactylosporangium variesporum*

[0373] Se aisló *Dactylosporangium variesporum* de ADN cromosómico (reclasificado en 2011 como *Saccharothrix variisporae*) mediante el kit "QIAamp DNA Blood Mini Kit" (Qiagen, Hilden, Alemania) Se enviaron 5 ug de ADN cromosómico a FASTERIS SA, Suiza, para secuenciar los genomas. El genoma se secuenció mediante secuenciación Illumina. La secuencia genómica se analizó para determinar las proteasas S1 secretadas y una proteasa S1 (SEQ ID: 1 /SEQ ID:2) se seleccionó para la expresión.

15

**Ejemplo 2:** Expresión de la proteasa S1 1 de *Dactylosporangium variesporum*

[0374] Se utilizó un sistema de vectores de integración lineal para la clonación de expresión de la proteasa S1A 1 de *Dactylosporangium variesporum* (SEQ ID NO: 2). El constructo de integración lineal fue un producto de fusión por PCR creado mediante la fusión del gen entre dos regiones cromosómicas homólogas de *Bacillus subtilis* junto con un promotor fuerte y un marcador de la resistencia a cloranfenicol. La fusión se realizó mediante SOE PCR (Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K. y Pease, L.R. (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes, gene splicing by overlap extension Gene 77: 61-68). El método SOE PCR también se describe en la solicitud de patente WO 2003/095658. El gen se expresó bajo el control de un sistema de promotor triple (tal como se describe en el documento WO 99/43835) constituido por los promotores del gen de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (amyL), del gen de la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (amyQ) y el promotor cryIIIA de *Bacillus thuringiensis* que incluye la secuencia estabilizante. La codificación genética para acetil-transferasa de cloranfenicol se utilizó como marcador (descrita en por ejemplo Diderichsen, B.; Poulsen, G.B.; Joergensen, S.T.; A useful cloning vector for *Bacillus subtilis*. Plasmid 30:312 (1993)). Los constructos génicos finales se integraron en el cromosoma de *Bacillus* mediante recombinación homóloga en el locus de la pectato-liasa.

20

25

30

La codificación genética de la proteasa S1 1 de *Dactylosporangium variesporum* se amplificó de ADN cromosómico de la cepa *Dactylosporangium variesporum* con cebadores específicos del gen que contienen saliente a los dos fragmentos de flaqueo. Los fragmentos flanqueantes anterior y posterior se amplificaron a partir de ADN genómico de la cepa iMB1361 (descrita en la solicitud de patente WO 2003095658). La proteasa S1 1 se expresó con una señal de secreción de *Bacillus clausii* (con la siguiente secuencia de aminoácidos: MKKPLGKIVASTALLISVAFSSSIASA (SEQ ID NO 6)) que reemplaza la señal de secreción nativa.

35

40

45

[0375] Los dos fragmentos vectoriales y el fragmento génico se sometieron a empalme mediante una extensión de la superposición (SOE, por sus siglas en inglés) por PCR para acoplar los tres fragmentos en un constructo vectorial lineal. Una alícuota del producto PCR se transformó en un hospedador *Bacillus subtilis* eliminado por una proteasa. Se seleccionaron los transformantes en placas LB suplementadas con 6 µg de cloranfenicol por mL. Se cultivó un clon de *Bacillus subtilis* recombinante que contenía el constructo de expresión integrado en un cultivo líquido. Se recogió el sobrenadante que contenía la enzima y la enzima se purificó tal como se describe en el Ejemplo 3.

**Ejemplo 3:** Purificación de la proteasa S1 1 de *Dactylosporangium variesporum*

50

[0376] Se centrifugó el caldo de cultivo (20 000 x g, 20 min) y se decantó cuidadosamente el sobrenadante del precipitado. El sobrenadante se filtró a través de una unidad de filtración Nalgene de 0.2 µm para retirar los restos de células hospederas de *Bacillus*. El filtrado de 0.2µm se transfirió a 10mM CH<sub>3</sub>COOH/NaOH, 1mM CaCl<sub>2</sub>, pH 4.5 en una columna G25 sephadex (de GE Healthcare). El filtrado transferido a G25 sephadex se aplicó a una columna de SP-sefarosa FF (de GE Healthcare) equilibrada en 20mM CH<sub>3</sub>COOH/NaOH, 1mM CaCl<sub>2</sub>, pH 4.5. Después de lavar la columna con el amortiguador de equilibrio, se eluyó la proteasa con un gradiente lineal de NaCl (0 --> 0.5 M) en el mismo amortiguador durante cinco volúmenes de columna. Las fracciones de la columna se analizaron para determinar la actividad proteasa (utilizando el ensayo de Suc-AAPF-pNA a pH 9) y se combinaron las fracciones correspondientes al máximo. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sólido se agregó a la agrupación de la columna SP-sepharose FF a una concentración de 1.0M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> final y la agrupación ajustada de sal se aplicó a una columna Phenyl-Toyopearl (de TosoHaas) equilibrada en 100mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 10mM MES, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 6.0. Después de lavar la

55

60

columna con el amortiguador de equilibrio, se eluyó la proteasa con un gradiente lineal de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1.0 --> 0M) en el mismo amortiguador durante tres volúmenes de columna. Se analizaron las fracciones de la columna para determinar la actividad proteasa (utilizando el ensayo de Suc-AAPF-pNA a pH 9) y las fracciones activas se analizaron mediante SDS-PAGE. Las fracciones en las que solamente se vio una banda en el gel SDS-PAGE teñido con coomassie se agruparon y transfirieron a 100mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 10mM MES, 1mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 6.0 en una columna G25 sephadex (de GE Healthcare). La enzima transferida con sephadex G25 constituyó la preparación purificada y se utilizó para una caracterización adicional.

**Ejemplo 4:** Caracterización de la proteasa S1 1 de *Dactylosporangium variesporum*

[0377] Se utilizó el ensayo de Suc-AAPF-pNA para obtener el perfil de pH-actividad y el perfil de pH-estabilidad (actividad residual después de 2 horas para los valores de pH indicados). Para el perfil pH-estabilidad se diluyó la proteasa 10x en los distintos amortiguadores de ensayo hasta alcanzar los valores de pH de estos amortiguadores y a continuación se incubó durante 2 horas a 37 °C. Tras la incubación, el pH de las incubaciones de la proteasa se ajustó al mismo valor de pH diluyendo en el amortiguador de ensayo de pH 9.0. Se midieron las actividades residuales relativas a pH 9.0 respecto a una muestra, la cual se mantuvo en condiciones estables (5 °C, pH 9.0). Se utilizó el ensayo con Protazyme AK para obtener el perfil temperatura-actividad a un pH de 7.0. Se utilizó el ensayo con Suc-AAPX-pNA y diez sustratos Suc-AAPX-pNA diferentes para obtener la especificidad para P1 de las enzimas a pH 9.0. Los resultados se muestran en las tablas 2-5 y las Figuras 1-4.

Tabla 2: perfil de ph-estabilidad a 37 °C

pH	proteasa S1 de <i>Dactylosporangium variesporum</i>
2	0.00
3	0.00
4	0.02
5	0.14
6	0.44
7	0.78
8	0.97
9	0.98
10	1.00
11	0.96
Nota: las actividades son actividades relativas al pH óptimo de la enzima.	

Tabla 3: perfil de pH-estabilidad (actividad residual después de 2 horas a 37 °C)

pH	proteasa S1 1 de <i>Dactylosporangium variesporum</i>
2	0.01
3	0.75
4	0.97
5	0.97
6	0.97
7	0.96
8	0.94
9	0.93
10	0.96
11	0.87
Tras 2 horas a 5 °C	1.00 (a pH 9)

Nota: las actividades son actividades residuales relativas a una muestra, la cual se mantuvo en condiciones estables (5 °C, pH 9.0).

Tabla 4: Perfil temperatura-actividad a pH 7.0

Temp (°C)	proteasa S1 1 de <i>Dactylosporangium variesporum</i>
15	0.14
25	0.10
37	0.27
50	0.64
60	1.00
70	0.71
80	0.22

Nota: las actividades son actividades respecto a la temperatura óptima de la enzima

Tabla 5: Especificidad para P1 en 10 sustratos Suc-AAPX-pNA a pH 9.0 (25°C)

Suc-AAPX-pNA	proteasa S1 1 de <i>Dactylosporangium variesporum</i>
Suc-AAPA-pNA	0.08
Suc-AAPR-pNA	0.07
Suc-AAPD-pNA	0.00
Suc-AAPI-pNA	0.00
Suc-AAPM-pNA	0.43
Suc-AAPV-pNA	0.01
Suc-AAPL-pNA	0.14
Suc-AAPE-pNA	0.00
Suc-AAPK-pNA	0.07
Suc-AAPF-pNA	1.00
Nota: las actividades son actividades relativas al mejor sustrato (Suc-AAPF-pNA) para la enzima.	

Otras características para la proteasa S1 1 de *Dactylosporangium variesporum*

5 [0378]

Inhibidores: PMSF y CI-2A.

La determinación de la secuencia del N-terminal mediante la degradación de EDMAN fue: IDVIGGN.

10 El peso molecular relativo según se determina por SDS-PAGE fue de aproximadamente  $M_r = 20$  kDa. El peso molecular determinado mediante análisis del peso molecular intacto fue de 18553.9Da. La secuencia madura (de datos MS, datos de degradación EDMAN y secuencia de ADN):

15 IDVIGGNAYYMGGGGRCSVGFVNGGFVTAGHCGTSGQSTTQPTGTGTFAGSSFPNGDYAWVRVAAGNTPRGLVNRY  
PGTVPVAGSTEAPVGASVCRSGSTTGWHCGTIQQRNTSVTYPQGTVSGVVRTNACAEPGDSGGSWISGDQAQGV  
SGGSGNCSSGGTTYFQPVNEILQAYGLQLVTSGGTPT (SEQ ID NO 3)

El peso molecular calculado a partir de esta secuencia madura fue de 18554.1Da.

20 **Ejemplo 5:** Lavado del AMSA utilizando la proteasa S1 1 de *Dactylosporangium variesporum*

[0379] El rendimiento del lavado de la proteasa S1 1 de *Dactylosporangium variesporum* se evaluó usando un detergente líquido y un detergente en polvo a 2 temperaturas de lavado diferentes en 3 manchas técnicas diferentes usando el ensayo de estrés mecánico automático.

25 Los experimentos se llevaron a cabo como se describe en el AMSA para un método de lavado de ropa utilizando un procedimiento de lavado de un único ciclo con la composición detergente y las muestras descritas en la Tabla 1 y las condiciones experimentales que se especifican en la Tabla 6 a continuación.

30

Tabla 6: Condiciones experimentales para experimentos de lavado de ropa

Dosis del detergente	detergente modelo en polvo A 2.5 g/L, detergente modelo líquido B 8 g/L
Volumen de la solución de ensayo	160 µL
pH	Como tal
Tiempo de lavado	20 minutos
Temperatura	20°C o 40°C
Dureza del agua	15°dH
Concentración de la proteasa	30 nM
Muestra	PC-05, PC-03, C-10

La dureza del agua se ajustó a 15 °dH añadiendo CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> y NaHCO<sub>3</sub> (Ca<sup>2+</sup>:Mg<sup>2+</sup>:CO<sub>3</sub><sup>-</sup> = 4:1:7.5) al sistema de prueba. Tras el lavado, los artículos textiles se enjuagaron con agua del grifo y se secaron.

5

Tabla 7: Valor de intensidad delta del detergente que contiene proteasa S1 1 de *Dactylosporangium variesporum* en comparación con detergente sin proteasa a 20°C.

Muestra	Detergente A (2.5 g/L) a 20°C	Detergente B (8 g/L) a 20 °C
PC-03	19	12
C-10	11	8
PC-05	59	46

[0380] Los resultados muestran que el detergente que contiene proteasa S1 1 de *Dactylosporangium variesporum* es más efectivo para eliminar manchas en comparación con detergente sin proteasa. La proteasa S1 1 de *Dactylosporangium variesporum* es efectiva para eliminar manchas de chocolate/leche, sangre/leche, y aceite/leche a 20 °C.

10

Tabla 8: Valor de intensidad delta del detergente que contiene proteasa S1 de *Dactylosporangium variesporum* en comparación con detergente sin proteasa a 40 °C.

Muestra	Detergente A (2.5 g/L) a 40°C	Detergente B (8 g/L) a 40°C
PC-03	42	36
C-10	27	20
PC-05	82	61

15

[0381] Los resultados muestran que el detergente que contiene proteasa S1 1 de *Dactylosporangium variesporum* es más efectivo para eliminar manchas en comparación con detergente sin proteasa. La proteasa S1 1 de *Dactylosporangium variesporum* es efectiva para eliminar manchas de chocolate/leche, sangre/leche, y aceite/leche a 40 °C.

5

Tabla 9: Rendimiento de lavado relativo del detergente que contiene proteasa S1 1 de *Dactylosporangium variesporum* en comparación con detergente 10R proteasa a 20 °C.

Muestra	Detergente A (2.5 g/L) a 20°C	Detergente B (8 g/L) a 20°C
PC-03	2.2	1.7
C-10	1.5	1.8
PC-05	1.3	1.3

[0382] Los resultados muestran que el detergente que contiene proteasa S1 1 de *Dactylosporangium variesporum* tiene rendimiento de lavado mejorado en comparación con detergente 10R proteasa (SEQ ID NO 5) en manchas de chocolate/leche, sangre/leche, y aceite/leche a 20°C.

10

Tabla 10: Rendimiento de lavado relativo del detergente que contiene proteasa S1 1 de *Dactylosporangium variesporum* en comparación con detergente con 10R proteasa a 40 °C.

Muestra	Detergente A (2.5 g/L) a 40°C	Detergente B (8 g/L) a 40°C
PC-03	1.4	1.3
C-10	1.0	0.9
PC-05	1.0	0.9

15

[0383] Los resultados muestran que el detergente que contiene proteasa S1 1 de *Dactylosporangium variesporum* tiene rendimiento de lavado mejorado en comparación con detergente 10R proteasa (SEQ ID NO 5) en manchas de chocolate/leche, y se desempeña tan bien como el detergente 10R proteasa en manchas de sangre/leche, y de aceite/leche a 40 °C.

20

**Ejemplo 6:** Actividad proteasa en ensayo de harina de soja-maíz

[0384] Los resultados de la aplicación del Ensayo de harina de soja-maíz anterior se muestran en la Tabla 11 a continuación. La actividad proteolítica de la proteasa S1 1 *Dactylosporangium variesporum* en harina de soja-maíz aumenta con pH creciente de pH 3 a pH 6 y luego disminuye. La actividad a pH 6 es mayor que para la proteasa Nocardiosis 10R (SEQ ID NO 5) lo que indica que la proteasa S1 1 *Dactylosporangium variesporum* puede tener potencial para ser más eficiente en hidrólisis de proteínas en aves de corral de cultivo.

25

30

Tabla 11: Actividad proteasa en harina de soja-maíz a pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 y 7.0

pH	Proteasa S1 1 de <i>Dactylosporangium variesporum</i>		Proteasa 10R	
	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
3.0	0.28	0.05	0.22	0.06
4.0	0.34	0.02	0.30	0.10
5.0	0.62	0.11	0.71	0.01
6.0	2.06	0.06	1.81	0.14
7.0	1.54	0.13	2.92	0.11

[0385] La Figura 5 muestra la actividad en harina de soja-maíz de la proteasa S1 1 de *Dactylosporangium variesporum* en comparación con la proteasa 10R (SEQ ID NO 5).

35

# ES 2 655 032 T3

Listado de secuencias

[0386]

<110> Novozymes A/S Benie, Astrid

5 <120> Polipéptidos que poseen actividad proteasa y polinucleótidos que los codifican

<130> 12451

<160> 6

10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1499

15

<212> DNA

<213> Dactylosporangium variesporum

<220>

20

<221> sig\_peptide

<222> (101)..(187)

<220>

25

<221> CDS

<222> (101)..(1399)

<220>

30

<221> mat\_peptide

<222> (656)..(1216)

<400> 1

35

tgttatgaca gaactggcat atccgccgag ccgcccagcc ggctagcgtc gagagcacgg 60

35 ccccgcatcc cgtgtcacca ccctgcaag gagacagcgg atg act cga cgc atc 115  
Met Thr Arg Arg Ile  
-185

40 gcc gcc gcc gtc gcc gcg acg gtc ctg agc gct gcc ggt gtc gca 160  
Ala Ala Ala Val Ala Ala Thr Val Leu Ser Ala Ala Gly Val Ala  
-180 -175 -170

45 gcg gtc ttg acc agc agc gcg atc gcc ggc ccg cca cca gca ccg 205  
Ala Val Leu Thr Ser Ser Ala Ile Ala Gly Pro Pro Pro Ala Pro  
-165 -160 -155

50 gaa ggc gac ctg gtc gcc gcc ctg tcg cgc gac ctc ggc ctg acc 250  
Glu Gly Asp Leu Val Ala Ala Leu Ser Arg Asp Leu Gly Leu Thr  
-150 -145 -140

55 cct gac cag gcc cgc acg cgg ctc gcc cgc gaa gcg cga gcg acc 295  
Pro Asp Gln Ala Arg Thr Arg Leu Ala Arg Glu Ala Arg Ala Thr  
-135 -130 -125

60 cgc gtg gac cac gat ctc aag gca cgg ctc ggc gcc acc tac gcc 340  
Arg Val Asp His Asp Leu Lys Ala Arg Leu Gly Ala Thr Tyr Ala  
-120 -115 -110

60 ggc tcg tgg ctc gac aag gac gcc gcg ctg acc gtc gcc gtc acc aac 388  
Gly Ser Trp Leu Asp Lys Asp Ala Ala Leu Thr Val Ala Val Thr Asn  
-105 -100 -95 -90



# ES 2 655 032 T3

	Gly	Gly	Ser	Gly	Asn	Cys	Ser	Ser	Gly	Gly	Thr	Thr	Tyr	Phe	Gln	Pro		
				155					160					165				
5	gtg	aac	gag	atc	ctc	cag	gcc	tac	ggc	ctc	cag	ctg	gtc	acc	agc	ggt	1204	
	Val	Asn	Glu	Ile	Leu	Gln	Ala	Tyr	Gly	Leu	Gln	Leu	Val	Thr	Ser	Gly		
			170					175					180					
10	ggg	acg	ccg	acg	aca	ccg	acg	tcg	ccg	acc	acc	tcg	acc	agc	aac	ccg	1252	
	Gly	Thr	Pro	Thr	Thr	Pro	Thr	Ser	Pro	Thr	Thr	Ser	Thr	Ser	Asn	Pro		
		185					190					195						



# ES 2 655 032 T3

Ala Trp Tyr Val Asp Leu Pro Ser Asn Ser Val Val Leu Leu Ala Arg  
 -45 -40 -35

5 Asp Leu Gly Asn Ala Lys Ala Phe Ala Lys Ala Ser Gly Leu Asp Glu  
 -30 -25 -20

10 Ala Asp Val Arg Ile Glu Ala Ser Thr Glu Asp Pro Arg Pro Leu Ile  
 -15 -10 -5 -1 1

15 Asp Val Ile Gly Gly Asn Ala Tyr Tyr Met Gly Gly Gly Gly Arg Cys  
 5 10 15

20 Ser Val Gly Phe Ser Val Asn Gly Gly Phe Val Thr Ala Gly His Cys  
 20 25 30

Gly Thr Ser Gly Gln Ser Thr Thr Gln Pro Thr Gly Thr Phe Ala Gly  
 35 40 45

25 Ser Ser Phe Pro Gly Asn Asp Tyr Ala Trp Val Arg Val Ala Ala Gly  
 50 55 60 65

30 Asn Thr Pro Arg Gly Leu Val Asn Arg Tyr Pro Gly Thr Val Pro Val  
 70 75 80

35 Ala Gly Ser Thr Glu Ala Pro Val Gly Ala Ser Val Cys Arg Ser Gly  
 85 90 95

40 Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly Thr Ile Gln Gln Arg Asn Thr Ser  
 100 105 110

45 Val Thr Tyr Pro Gln Gly Thr Val Ser Gly Val Val Arg Thr Asn Ala  
 115 120 125

50 Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser Trp Ile Ser Gly Asp Gln  
 130 135 140 145

55 Ala Gln Gly Val Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn Cys Ser Ser Gly Gly  
 150 155 160

Thr Thr Tyr Phe Gln Pro Val Asn Glu Ile Leu Gln Ala Tyr Gly Leu  
 165 170 175

60 Gln Leu Val Thr Ser Gly Gly Thr Pro Thr Thr Pro Thr Ser Pro Thr  
 180 185 190

Thr Ser Thr Ser Asn Pro Gly Gln Thr Thr Trp Gln Pro Gly Ala Thr  
 195 200 205

ES 2 655 032 T3

Tyr Ala Ile Gly Ser Leu Val Thr Tyr Asp Gly Val Gly Tyr Arg Cys  
 210 215 220 225  
 5  
 Leu Gln Gly His Thr Ser Gln Thr Gly Trp Glu Pro Pro Asn Val Pro  
 230 235 240  
 10  
 Ala Leu Trp Glu Arg Val Gly  
 245  
 15  
 <210> 3  
 <211> 187  
 <212> PRT  
 <213> *Dactylosporangium variesporum*  
 20  
 <400> 3  
 Ile Asp Val Ile Gly Gly Asn Ala Tyr Tyr Met Gly Gly Gly Gly Arg  
 1 5 10 15  
 25  
 Cys Ser Val Gly Phe Ser Val Asn Gly Gly Phe Val Thr Ala Gly His  
 20 25 30  
 30  
 Cys Gly Thr Ser Gly Gln Ser Thr Thr Gln Pro Thr Gly Thr Phe Ala  
 35 40 45  
 35  
 Gly Ser Ser Phe Pro Gly Asn Asp Tyr Ala Trp Val Arg Val Ala Ala  
 50 55 60  
 40  
 Gly Asn Thr Pro Arg Gly Leu Val Asn Arg Tyr Pro Gly Thr Val Pro  
 65 70 75 80  
 45  
 Val Ala Gly Ser Thr Glu Ala Pro Val Gly Ala Ser Val Cys Arg Ser  
 85 90 95  
 50  
 Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly Thr Ile Gln Gln Arg Asn Thr  
 100 105 110  
 55  
 Ser Val Thr Tyr Pro Gln Gly Thr Val Ser Gly Val Val Arg Thr Asn  
 115 120 125  
 60  
 Ala Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser Trp Ile Ser Gly Asp  
 130 135 140  
 Gln Ala Gln Gly Val Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn Cys Ser Ser Gly  
 145 150 155 160

# ES 2 655 032 T3

Gly Thr Thr Tyr Phe Gln Pro Val Asn Glu Ile Leu Gln Ala Tyr Gly  
                   165                                  170                                  175

5 Leu Gln Leu Val Thr Ser Gly Gly Thr Pro Thr  
                   180                                  185

<210> 4  
 10 <211> 269  
     <212> PRT  
     <213> *Bacillus lentus*

<400> 4  
 15 Ala Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala  
     1                  5                                  10                                  15

20 His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp  
                   20                                  25                                  30

25 Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser  
                   35                                  40                                  45

30 Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr  
                   50                                  55                                  60

35 His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu  
     65                  70                                  75                                  80

40 Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala  
                   85                                  90                                  95

45 Ser Gly Ser Gly Ser Val Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala  
                   100                                  105                                  110

50 Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser  
                   115                                  120                                  125

55 Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly  
                   130                                  135                                  140

60 Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Gly Ser Ile Ser  
     145                  150                                  155                                  160

65 Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln  
                   165                                  170                                  175

70 Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile  
                   180                                  185                                  190

# ES 2 655 032 T3

Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr  
 195 200 205

5

Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala  
 210 215 220

10

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

15

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

20

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

25

<210> 5  
 <211> 188  
 <212> PRT  
 <213> Nocardiosis  
 <400> 5

30

Ala Asp Ile Ile Gly Gly Leu Ala Tyr Thr Met Gly Gly Arg Cys Ser  
 1 5 10 15

35

Val Gly Phe Ala Ala Thr Asn Ala Ala Gly Gln Pro Gly Phe Val Thr  
 20 25 30

40

Ala Gly His Cys Gly Arg Val Gly Thr Gln Val Thr Ile Gly Asn Gly  
 35 40 45

45

Arg Gly Val Phe Glu Gln Ser Val Phe Pro Gly Asn Asp Ala Ala Phe  
 50 55 60

50

Val Arg Gly Thr Ser Asn Phe Thr Leu Thr Asn Leu Val Ser Arg Tyr  
 65 70 75 80

55

Asn Thr Gly Gly Tyr Ala Thr Val Ala Gly His Asn Gln Ala Pro Ile  
 85 90 95

60

Gly Ser Ser Val Cys Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly  
 100 105 110

65

Thr Ile Gln Ala Arg Gly Gln Ser Val Ser Tyr Pro Glu Gly Thr Val  
 115 120 125

70

Thr Asn Met Thr Arg Thr Thr Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly  
 130 135 140

# ES 2 655 032 T3

5 Gly Ser Tyr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Gln Gly Val Thr Ser Gly Gly  
145 150 155 160

Ser Gly Asn Cys Arg Thr Gly Gly Thr Thr Phe Tyr Gln Glu Val Thr  
165 170 175

10 Pro Met Val Asn Ser Trp Gly Val Arg Leu Arg Thr  
180 185

15 <210> 6  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> artificial

20 <220>  
<223> una señal de secreción de Bacillus lentus  
  
<400> 6

25 Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ile  
1 5 10 15

30 Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala  
20 25

**REIVINDICACIONES**

1. Polipéptido aislado con actividad proteasa, seleccionado del grupo constituido por:
- 5 (a) un polipéptido que posee 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 secuencial respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2; y
- 10 (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que posee 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 secuencial respecto a la secuencia que codifica un polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1;
2. Polipéptido de la reivindicación 1, que comprende o está constituido por la SEQ ID NO: 2 o el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.
- 15 3. Polipéptido de la reivindicación 2, donde el polipéptido maduro es aminoácidos comprendidos entre el 1 y el 187 de la SEQ ID NO: 2.
4. Composición que comprende el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la composición es una composición detergente para el lavado de vajilla automático o de ropa.
- 20 5. Composición de la reivindicación 4, que comprende además una o más enzimas adicionales seleccionadas entre proteasas, amilasas, lipasas, cutinasas, celulasas, endoglucanasas, xiloglucanasas, pectinasas, pectino-lisas, xantanasas, peroxidadas, haloperoxigenasas, catalasas, mananasas o cualquier mezcla de estas.
- 25 6. Composición de la reivindicación 5 o 6, que comprende uno o más componentes seleccionados entre: tensioactivos y adyuvantes.
7. Polinucleótido aislado que codifica el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 30 8. Constructo de ácido nucleico o vector de expresión que comprende el polinucleótido de la reivindicación 7, ligado operablemente a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un hospedador de expresión.
- 35 9. Célula hospedera recombinante que es recombinante para el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 7, que comprende el polinucleótido de la reivindicación 7, ligado operablemente a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido.
- 40 10. Método para mejorar el valor nutricional de un alimento para animales, donde al menos una proteasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 se agrega al alimento.
11. Aditivo para alimento para animales que comprende al menos una proteasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-3; y al menos un aditivo adicional seleccionado del grupo consistente en una vitamina liposoluble, una vitamina hidrosoluble, un mineral traza, y una enzima seleccionada del grupo consistente en amilasa; fitasa; xilanas; galactanas; alfa-galactosidas; proteasa, fosfolipasa; y/o beta-glucanasa.
- 45 12. Uso de al menos una proteasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en detergentes o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 en un proceso de lavado.
- 50 13. Composición de alimento para animales que comprende el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
14. Composición de alimento para animales de la reivindicación 13, que comprende además una o más amilasas; fitasas; xilanas; galactanas; alfa-galactosidas; proteasas, fosfolipasas, beta-glucanasas o cualquier mezcla de las mismas.
- 55

Figura 1

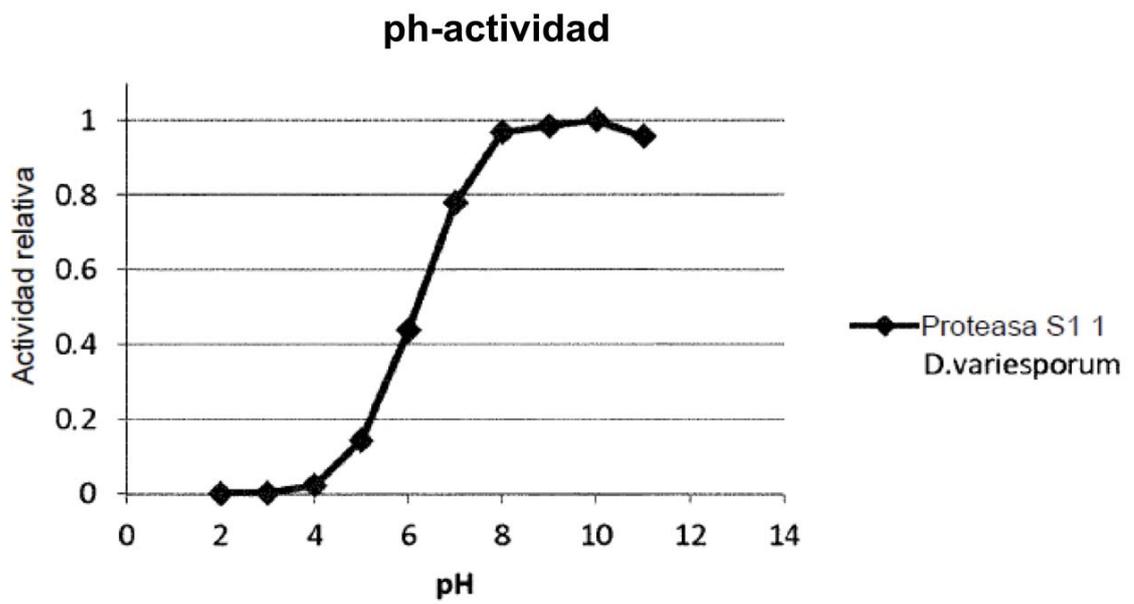


Figura 1. pH-actividad en Suc-AAPF-pNA.

Figura 2

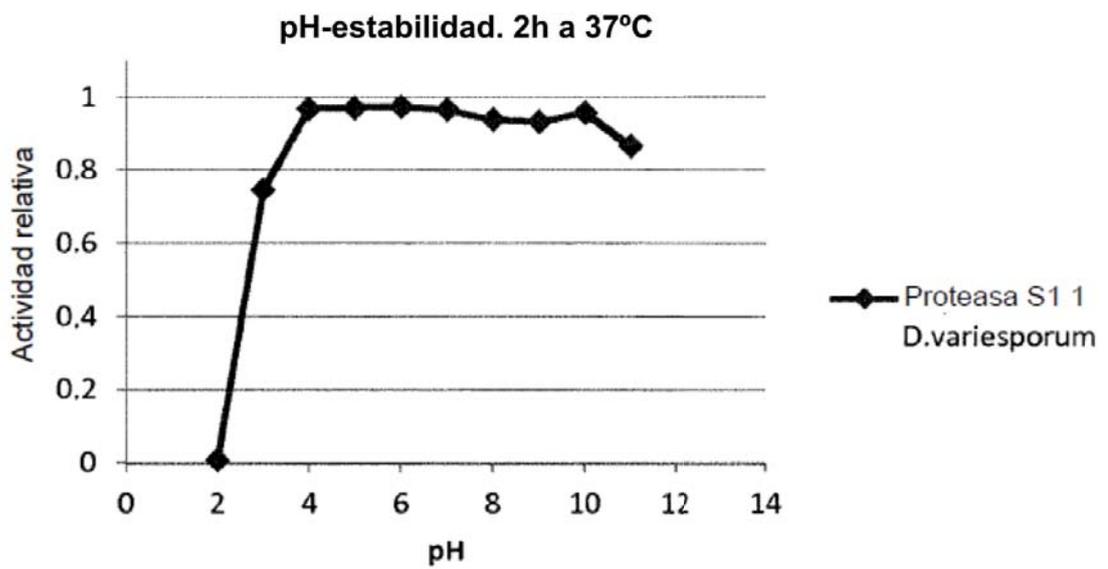


Figura 2. pH-estabilidad (actividad residual después de 2 horas a 37°C)

Figura 3

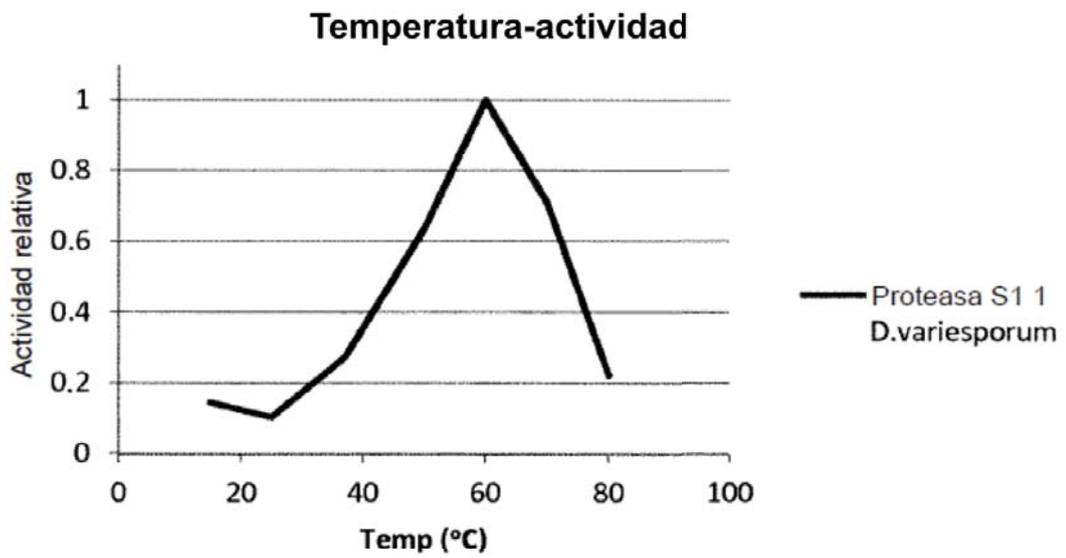


Figura 3. Temperatura-actividad en sustrato de Protazyme AK

Figura 4

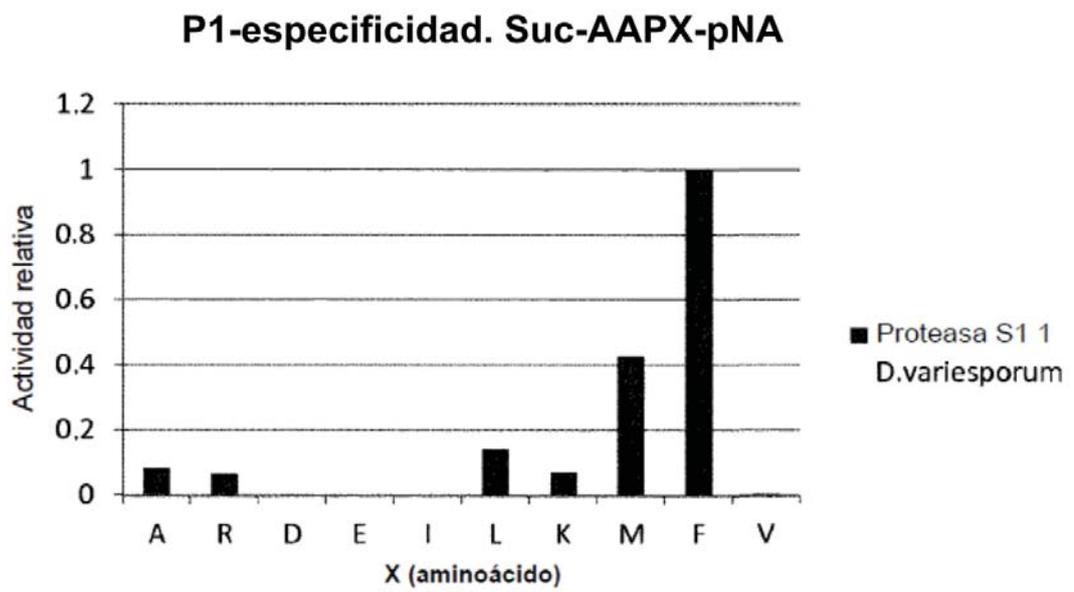
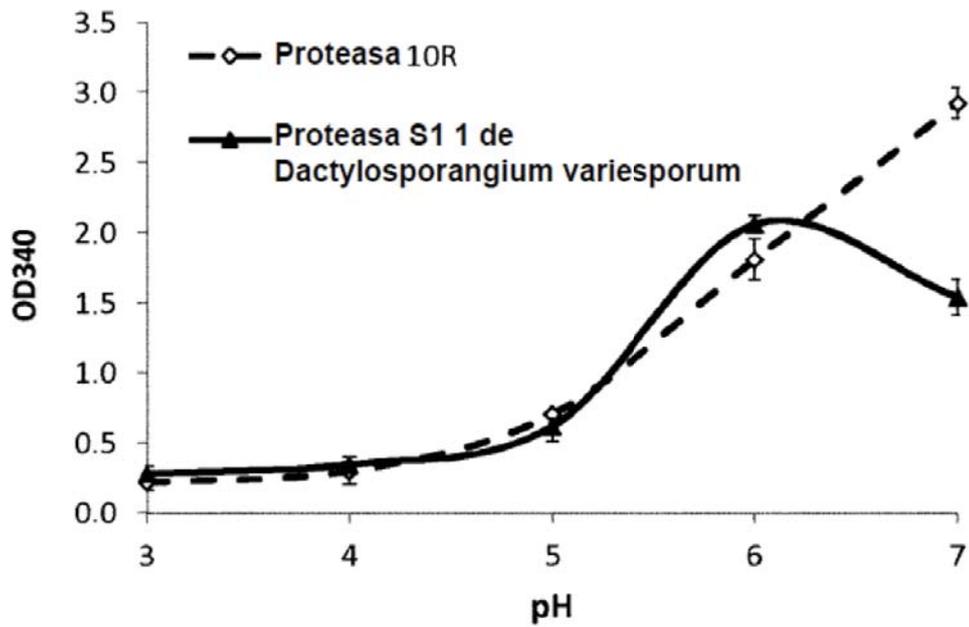


Figura 4. Especificidad en sustratos Suc-AAPX-pNA a pH 9.0.

Figura 5



La Figura 5 muestra la actividad (OD<sub>340</sub> x factor dilución) en harina de soja-maíz de la proteasa S1 1 de *Dactylosporangium variesporum* en comparación con la proteasa 10R.