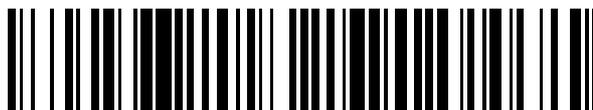


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 001**

51 Int. Cl.:

C11D 3/386 (2006.01)

C12N 9/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.03.2012 PCT/EP2012/053659**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2012 WO12119955**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2012 E 12706849 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2683808**

54 Título: **Variantes de proteasa mejoradas en cuanto al rendimiento**

30 Prioridad:
10.03.2011 DE 102011005354

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.04.2018

73 Titular/es:
**HENKEL AG & CO. KGAA (100.0%)
Henkelstrasse 67
40589 Düsseldorf, DE**

72 Inventor/es:
**WIELAND, SUSANNE;
SIEGERT, PETRA;
O'CONNELL, TIMOTHY;
MAURER, KARL-HEINZ;
MARTINEZ, RONNY;
SCHWANEBERG, ULRICH y
HELLMUTH, HENDRIK**

74 Agente/Representante:
ISERN JARA, Jorge

ES 2 666 001 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

Variantes de proteasa mejoradas en cuanto al rendimiento

5 La invención se refiere al campo de la tecnología enzimática. La invención se refiere, en particular, a proteasas así como a su preparación, cuya secuencia de aminoácidos se ha modificado en particular con respecto al empleo en agentes de lavado y de limpieza, a todas las proteasas suficientemente similares con una modificación correspondiente y a ácidos nucleicos que codifican las mismas. Además, la invención se refiere a procedimientos y a usos de estas proteasas así como a agentes que contienen las mismas, en particular a agentes de lavado y de limpieza.

10 En realidad, las proteasas pertenecen a las enzimas técnicamente más importantes. Para agentes de lavado y de limpieza son las enzimas que están establecidas desde hace más tiempo y que están contenidas en prácticamente todos los agentes de lavado y de limpieza modernos eficientes. Provocan la degradación de suciedades que contienen proteínas sobre el material de limpieza. Entre las mismas son particularmente importantes a su vez las proteasas del tipo subtilisina (subtilasas, subtilopeptidasas, EC 3.4.21.62), que a causa de los aminoácidos con actividad catalítica son serina proteasas. Actúan como endopeptidasas inespecíficas e hidrolizan cualquier tipo de enlace de amida de ácido que se encuentre en el interior de péptidos o proteínas. Su pH óptimo se encuentra la mayoría de las veces en el intervalo claramente alcalino. Una revisión acerca de esta familia se ofrece, por ejemplo, en el artículo "Subtilasas: Subtilisin-like Proteases" de R. Siezen, página 75-95 en "Subtilisin enzymes", editado por R. Bott y C. Betzel, Nueva York, 1996. Las subtilasas son formadas de forma natural por los microorganismos. Entre estas cabe mencionar en particular las subtilisinas formadas y secretadas por especies de *Bacillus* como el grupo más importante dentro de las subtilasas.

15 Son ejemplos de las proteasas empleadas con preferencia en agentes de lavado y de limpieza del tipo subtilisina las subtilisinas BPN' y Carlsberg, la proteasa PB92, las subtilisinas 147 y 309, la proteasa de *Bacillus lentus*, en particular de *Bacillus lentus* DSM 5483, la subtilisina DY y las enzimas que se pueden asignar a las subtilasas, sin embargo, en sentido más estricto ya no a las subtilisinas termitasa, proteinasa K y las proteasas TW3 y TW7, así como variantes de las proteasas mencionadas que presentan una secuencia de aminoácidos modificada con respecto a la proteasa de partida. Las proteasas se modifican de forma específica mediante procedimientos conocidos por el estado de la técnica o de manera aleatoria y se optimizan de este modo por ejemplo para el empleo en agentes de lavado y de limpieza. A esto pertenece la mutagénesis puntual, mutagénesis por delección o inserción o fusión con otras proteínas o partes de proteínas. Así, para la mayoría de las proteasas conocidas por el estado de la técnica se conocen variantes optimizadas correspondientemente.

20 En la solicitud de patente internacional WO 03/054185 se desvela una proteasa alcalina de *Bacillus gibsonii* (DSM 14391), también para su empleo en agentes de lavado o de limpieza. Esta cepa se ha depositado el 01.03.2001 de acuerdo con el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos del 28 de abril de 1977 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig (<http://www.dsmz.de>) con la denominación ID 01-192 y el número de entrada DSM 14391. Con respecto a las proteasas que se han mencionado anteriormente, esta proteasa presenta considerables diferencias en la secuencia de aminoácidos, de tal manera que una comparación de la identidad de las secuencias de aminoácidos arroja valores de identidad que se encuentran por debajo de una identidad del 80 %. Para la proteasa alcalina de *Bacillus gibsonii* (DSM 14391) hasta la fecha se han conocido en el estado de la técnica solo unas pocas variantes de proteasa optimizadas para el empleo en agentes de lavado y de limpieza.

25 El objetivo de la presente invención es perfeccionar una proteasa del tipo de la proteasa alcalina de *Bacillus gibsonii* DSM 14391 o una proteasa suficientemente similar a la misma (en relación con la identidad de secuencia) y obtener variantes de proteasa que sean adecuadas para su empleo en agentes de lavado o de limpieza y que ventajosamente estén mejoradas.

30 El objeto de la invención es una proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 1 a lo largo de toda su longitud una identidad de al menos el 91,5 % y que en la enumeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 presenta la sustitución aminoacídica I21V en combinación con al menos otra sustitución aminoacídica, estando seleccionada la otra sustitución aminoacídica del grupo compuesto por Q12L, M122L, N177V, A222S, V228I y T247N.

35 Otro objeto de la invención es un procedimiento para la producción de una proteasa que comprende la introducción de una sustitución aminoacídica I21V en combinación con al menos otra sustitución aminoacídica, estando seleccionada la otra sustitución aminoacídica del grupo compuesto por Q12L, M122L, N177V, A222S, V228I y T247N, en la enumeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 en una proteasa de partida que tiene una identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 1 a lo largo de toda su longitud de al menos el 91,5 %.

40 Una proteasa en el sentido de la presente solicitud de patente comprende, por tanto, la proteasa como tal así como una proteasa producida con un procedimiento de acuerdo con la invención. Todas las explicaciones con respecto a

la proteasa se refieren por tanto a la proteasa como sustancia así como a los correspondientes procedimientos, en particular a los procedimientos de producción de la proteasa.

5 Como otros objetos de la invención están asociados a las proteasas de acuerdo con la invención o los procedimientos de producción para proteasas de acuerdo con la invención ácidos nucleicos que codifican estas proteasas, células hospedadoras no humanas que contienen proteasas de acuerdo con la invención o ácidos nucleicos así como agentes que comprenden proteasas de acuerdo con la invención, en particular agentes de lavado y de limpieza, procedimientos de lavado y de limpieza y usos definidos a través de proteasas de acuerdo con la invención.

10 Sorprendentemente se ha comprobado que una modificación de acuerdo con la invención de la posición 21 junto con una modificación en al menos una de las posiciones 12, 122, 177, 222, 228 y 247 en una proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos el 70 % con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 1, causa un rendimiento mejorado de esta proteasa modificada en agentes de lavado y de limpieza en comparación con una proteasa correspondiente que no presenta estas modificaciones. Esto es sorprendente en particular debido a que la proteasa modificada de acuerdo con la invención se diferencia claramente de otras subtilisinas establecidas en el estado de la técnica, tales como por ejemplo subtilisina 309, PB92, la proteasa alcalina de *Bacillus lentus* DSM 5483 o BPN', etc. Por ejemplo, una proteasa que presenta la SEQ ID NO. 1 tiene una identidad con la subtilisina 309 del 78,4 %, con PB92 del 78,1 %, con la proteasa alcalina de *Bacillus lentus* DSM 5483 del 77,7 % y con BPN' con el 55,3 %, desvelando la SEQ ID NO. 1 la secuencia de la proteasa madura de *Bacillus gibsonii* (DSM 14391). De este modo no era de esperar en ningún caso que se fuesen a obtener para proteasas del tipo proteasa alcalina de *Bacillus gibsonii* (DSM 14391) variantes de proteasa mejoradas en cuanto al rendimiento para el empleo en agentes de lavado y de limpieza mediante una modificación en la posición 21 junto con una modificación en al menos una de las posiciones 12, 122, 177, 222, 228 y 247 en la forma de enumeración de las proteasas alcalinas de *Bacillus gibsonii* (DSM 14391), con respecto a la enzima madura de acuerdo con la SEQ ID NO. 1.

15 Las formas de realización preferentes de proteasas de acuerdo con la invención realizan por ejemplo una aportación al rendimiento de limpieza de un agente de lavado o de limpieza que contiene la proteasa tan buena que se aproxima a la aportación de una enzima proteolítica establecida para este fin al rendimiento de limpieza del agente y que incluso la supera en diferentes suciedades. Por consiguiente, las proteasas de acuerdo con la invención posibilitan una eliminación mejorada de al menos una, preferentemente de varias suciedades sensibles a proteasa en materiales textiles y/o superficies duras, por ejemplo en vajilla. Las formas de realización preferentes de proteasas de acuerdo con la invención muestran rendimientos de limpieza particularmente ventajosos en suciedades que contienen huevo, por ejemplo en la suciedad de huevo completo/pigmento sobre algodón: producto n.º C-S-37 disponible en CFT (Center For Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Países Bajos.

20 Por consiguiente se facilitan gracias a formas de realización preferentes de la presente invención proteasas con especificidad de suciedad, cuyo rendimiento de limpieza es ventajoso de forma específica en vista de una suciedad o de varias suciedades de tipo similar. Por consiguiente, se mejora el foco sobre la mancha de formas de realización preferentes de proteasas de acuerdo con la invención en relación con suciedades que contienen huevo.

25 Las formas de realización preferentes de proteasas de acuerdo con la invención consiguen tales rendimientos de limpieza ventajosos incluso a temperaturas bajas entre 10 °C y 40 °C, entre 10 °C y 30 °C y entre 10 °C y 25 °C, por ejemplo a 20 °C.

30 Además, las formas de realización preferentes de proteasas de acuerdo con la invención disponen de una estabilidad particular con respecto a tensioactivos y/o agentes de blanqueo y/o frente a influencias de temperatura, en particular frente a temperaturas altas o bajas y/o frente a condiciones ácidas o alcalinas y/o frente a cambios del valor de pH y/o frente a agentes desnaturalizantes u oxidantes y/o frente a degradación proteolítica y/o frente a una modificación de las condiciones redox.

35 Por rendimiento de limpieza se entiende en el marco de la invención el rendimiento de blanqueo en una o varias suciedades, en particular sobre colada o vajilla. En el marco de la invención, tanto el agente de lavado o de limpieza que comprende la proteasa o el baño de lavado o de limpieza formado por este agente como la propia proteasa presentan un rendimiento de limpieza respectivo. El rendimiento de limpieza de la enzima contribuye por tanto al rendimiento de limpieza del agente o del baño de lavado o de limpieza formado por el agente. El rendimiento de limpieza se establece con preferencia tal como se indica más adelante.

40 Una proteasa de acuerdo con la invención presenta una actividad proteolítica, es decir, tiene capacidad de hidrólisis de enlaces peptídicos de un polipéptido o de una proteína, en particular en un agente de lavado o de limpieza. Una proteasa de acuerdo con la invención, por tanto, es una enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces peptídicos y por ello está en disposición de escindir péptidos o proteínas. Además, en el caso de una proteasa de acuerdo con la invención se trata preferentemente de una proteasa madura (*mature*), es decir, de la molécula catalíticamente activa sin péptido o péptidos señal y/o propéptido o propéptidos. A menos que se indique de otro modo, también las secuencias indicadas se refieren a enzimas en cada caso maduras.

En otra forma de realización de la invención, la proteasa comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 1 a lo largo de toda su longitud de al menos el ,5 %, 92 %, 92,5 %, 93 %, 93,5 %, 94 %, 94,5 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 % y 99,25 %, y en la enumeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 presenta la sustitución aminoacídica I21V en combinación con al menos otra sustitución aminoacídica, estando seleccionada la otra sustitución aminoacídica del grupo compuesto por Q12L, M122L, N177V, A222S, V228I y T247N.

Son proteasas de acuerdo con la invención particularmente preferentes:

Proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 1 a lo largo de toda su longitud de al menos el 91,5 %, 92 %, 92,5 %, 93 %, 93,5 %, 94 %, 94,5 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 % y 98,5 % y en la enumeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 presenta la sustitución aminoacídica I21V en combinación con las sustituciones aminoacídicas M122L, A222S y T247N.

Proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 1 a lo largo de toda su longitud de al menos el 91,5 %, 92 %, 92,5 %, 93 %, 93,5 %, 94 %, 94,5 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 % y 98,8 % y en la enumeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 presenta la sustitución aminoacídica I21V en combinación con las sustituciones aminoacídicas N177V y V228I.

Proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 1 a lo largo de toda su longitud de al menos el 91,5 %, 92 %, 92,5 %, 93 %, 93,5 %, 94 %, 94,5 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 % y 98,5 % y en la enumeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 presenta la sustitución aminoacídica I21V en combinación con las sustituciones aminoacídicas QG12L, M122L y A222S.

Proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 con las sustituciones aminoacídicas I21V, M122L, A222S y T247N en la enumeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1, en particular una proteasa de acuerdo con la SEQ ID NO. 4.

Proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 con las sustituciones aminoacídicas I21V, N177V y V228I en la enumeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1, en particular una proteasa de acuerdo con la SEQ ID NO. 5.

Proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 con las sustituciones aminoacídicas Q12L, I21V, M122L y A222S en la enumeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1, en particular una proteasa de acuerdo con la SEQ ID NO. 6.

Sorprendentemente se comprobó además que existen otras posibilidades alternativas para modificar el presente aminoácido en la posición 21 para obtener una mejora del rendimiento de la proteasa resultante. Básicamente, es importante que la proteasa esté modificada en general con respecto a la SEQ ID NO. 1 en estas posiciones, es decir, que el aminoácido presente en esta posición esté sustituido por otro aminoácido proteínogénico, por tanto, por alanina o arginina o asparagina o ácido aspártico o cisteína o glutamina o ácido glutámico o glicina o histidina o leucina o lisina o metionina o fenilalanina o prolina o serina o treonina o triptófano o tirosina o en particular valina. Ya que la valina en esta posición es particularmente ventajosa, se prefieren, de los anteriores aminoácidos, los aminoácidos conservadores en cuanto a valina, es decir, aquellos que, siempre que se sustituya la valina por un aminoácido de este tipo, no conduzcan a un cambio de la polaridad o de la carga, en particular glicina, alanina, isoleucina, leucina y metionina.

La determinación de la identidad de secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos se realiza mediante una comparación de secuencias. Esta comparación de secuencias se basa en el algoritmo BLAST establecido y empleado habitualmente en el estado de la técnica (compárese por ejemplo con Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215: 403-410 y Altschul, Stephan F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Hheng Zhang, Webb Miller y David J. Lipman (1997): "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs"; Nucleic Acids Res., 25, pág. 3389-3402) y en principio tiene lugar al asignarse secuencias similares de nucleótidos o aminoácidos en las secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos entre sí. Una asignación tabulada de las respectivas posiciones se denomina alineamiento. Otro algoritmo disponible en el estado de la técnica es el algoritmo FASTA. Las comparaciones de secuencias (alineamientos), en particular las comparaciones de secuencias múltiples, se crean con programas de ordenador. Con frecuencia se emplean por ejemplo la serie Clustal (compárese por ejemplo con Chenna *et al.* (2003): Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acid Research 31, 3497-3500), T-Coffee (compárese por ejemplo con Notredame *et al.* (2000): T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. J. Mol. Biol. 302, 205-217) o programas que se basan en estos programas o algoritmos. En la presente solicitud de patente se crearon todas las comparaciones de secuencias (alineamientos) con el programa de ordenador Vector NTI® Suite 10.3 (Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, California, EE.UU.) con los parámetros estándar predefinidos, cuyo módulo de AlignX para las comparaciones de secuencias se basa en ClustalW.

Una comparación de este tipo permite también una afirmación acerca de la similitud de las secuencias comparadas entre sí. Se indica habitualmente en porcentaje de identidad, es decir, la proporción de los nucleótidos o restos aminoacídicos idénticos en las mismas posiciones o en posiciones correspondientes unas a otras en un alineamiento. El término más amplio de la homología considera también sustituciones aminoacídicas conservadas en las secuencias de aminoácidos, es decir, aminoácidos con una actividad química similar, ya que los mismos dentro de la proteína ejercen la mayoría de las veces actividades químicas similares. Por lo tanto, la similitud de las secuencias comparadas puede estar indicada también como porcentaje de homología o porcentaje de similitud. Las indicaciones de identidad y/u homología se pueden realizar acerca de polipéptidos o genes completos o solo acerca de regiones individuales. Las regiones homólogas o idénticas de distintas secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos están definidas, por tanto, por coincidencias en las secuencias. Tales regiones presentan con frecuencia funciones idénticas. Pueden ser pequeñas y comprender solo pocos nucleótidos o aminoácidos. Con frecuencia, las regiones tan pequeñas ejercen funciones esenciales para la actividad global de la proteína. Por tanto, puede ser razonable relacionar coincidencias de secuencias solo con regiones individuales, dado el caso pequeñas. A menos que se indique de otro modo, las indicaciones de identidad o de homología en la presente solicitud se refieren, no obstante, a toda la longitud de la secuencia indicada en cada caso de ácido nucleico o de aminoácidos.

En otra forma de realización de la invención, la proteasa está caracterizada por que su rendimiento de limpieza se corresponde al menos con el de una proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 1, y/o se corresponde al menos con el de una proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 2, y/o se corresponde al menos con el de una proteasa de acuerdo con la SEQ ID NO. 3, determinándose el rendimiento de limpieza en un sistema de lavado que contiene un agente de lavado en una dosificación entre 4,5 y 7,0 gramos por litro de baño de lavado así como la proteasa, empleándose las proteasas que se van a comparar con la misma actividad y determinándose el rendimiento de limpieza con respecto a una suciedad de huevo sobre algodón, en particular con respecto a la suciedad huevo completo/pigmento sobre algodón: producto n.º C-S-37 disponible en CFT (Center For Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Países Bajos, mediante la medición del grado de blancura de los materiales textiles lavados, realizándose el proceso de lavado durante al menos 30 minutos, opcionalmente 60 minutos, a una temperatura de 20 °C y presentando el agua una dureza de agua entre 15,5 y 16,5 ° (dureza alemana).

Un agente de lavado líquido preferente para un sistema de lavado de este tipo está compuesto del siguiente modo (todas las indicaciones en porcentaje en peso): el 0,3-0,5 % de xantana, el 0,2-0,4 % de agente antiespumante, el 6-7 % de glicerina, el 0,3-0,5 % de etanol, el 4-7 % de FAEOS (etersulfato de alcohol graso), el 24-28 % de tensioactivos no iónicos, el 1 % de ácido bórico, el 1-2 % de citrato de sodio (dihidrato), el 2-4 % de carbonato de sodio, el 14-16 % de ácidos grasos de coco, el 0,5 % de HEDP (ácido 1-hidroxietan-(1,1-di-fosfónico)), el 0-0,4 % de PVP (polivinilpirrolidona), el 0-0,05 % de agente de blanqueo óptico, el 0-0,001 % de colorante, resto agua desmineralizada. Preferentemente, la dosificación del agente de lavado líquido asciende a entre 4,5 y 6,0 gramos por litro de baño de lavado, por ejemplo a 4,7, 4,9 o 5,9 gramos por litro de baño de lavado. Preferentemente se lava en un intervalo de valores de pH entre pH 8 y pH 10,5, preferentemente entre pH 8 y pH 9.

Un agente de lavado en forma de polvo preferente para un sistema de lavado de este tipo está compuesto del siguiente modo (todas las indicaciones en porcentaje en peso): el 10 % de sulfonato de alquilbenceno lineal (sal de sodio), el 1,5 % de sulfato de alcohol graso C12-C18 (sal de sodio), el 2,0 % de alcohol graso C12-C18 con 7 OE, el 20 % de carbonato de sodio, el 6,5 % de hidrogenocarbonato de sodio, el 4,0 % de disilicato de sodio amorfo, el 17 % de carbonato de sodio peroxohidrato, el 4,0 % de TAED, el 3,0 % de poliácido, el 1,0 % de carboximetilcelulosa, el 1,0 % de fosfonato, el 27 % de sulfato de sodio, resto: inhibidores de formación de espuma, agentes de blanqueo óptico, fragancias. Preferentemente, la dosificación del agente de lavado en forma de polvo asciende a entre 4,5 y 7,0 gramos por litro de baño de lavado, por ejemplo y de forma particularmente preferente a 4,7 gramos por litro de baño de lavado, o a 5,5, 5,9 o 6,7 gramos por litro de baño de lavado. Preferentemente se lava en un intervalo de valores de pH entre pH 9 y pH 11.

En el marco de la invención se realiza la determinación del rendimiento de limpieza a 20 °C mediante el uso de un agente de lavado sólido tal como se ha indicado anteriormente, realizándose el proceso de lavado preferentemente durante al menos 60 minutos.

El grado de blancura, es decir, el blanqueo de las suciedades como medida del rendimiento de limpieza se determina preferentemente con procedimientos de medición ópticos, preferentemente mediante fotometría. Un aparato adecuado para esto es, por ejemplo, el espectrómetro Minolta CM508d. Habitualmente se calibran los aparatos empleados para la medición previamente con un patrón de blanco, preferentemente con un patrón de blanco suministrado.

Mediante el empleo con la misma actividad de la respectiva proteasa se asegura que incluso con una posible divergencia de la relación de sustancia activa a proteína total (los valores de la actividad específica) se comparen las respectivas propiedades enzimáticas, es decir, por ejemplo el rendimiento de limpieza en determinadas suciedades. En general se cumple que una baja actividad específica se puede compensar mediante la adición de una mayor cantidad de proteína. El experto en la materia de la tecnología de las enzimas está familiarizado con procedimientos

para la determinación de la actividad proteasa y estos son aplicados por el mismo de forma rutinaria. Por ejemplo, tales procedimientos están desvelados en Tenside, tomo 7 (1970), página 125-132. Como alternativa se puede determinar la actividad proteasa a través de la liberación del cromóforo para-nitroanilina (pNA) del sustrato suc-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitroanilida (AAPF). La proteasa escinde el sustrato y libera pNA. La liberación de la pNA causa un aumento de la extinción a 410 nm, cuya evolución en el tiempo es una medida de la actividad enzimática (compárese con Del Mar *et al.*, 1979). La medición se realiza a una temperatura de 25 °C, a pH 8,6, y con una longitud de onda de 410 nm. El tiempo de medición asciende a 5 min y el intervalo de medición a de 20 s a 60 s.

La concentración de proteínas se puede determinar con ayuda de métodos conocidos, por ejemplo el procedimiento de BCA (ácido bicinonínico; ácido 2,2'-biquinolil-4,4'-dicarboxílico) o el procedimiento de Biuret (A. G. Gornall, C. S. Bardawill y M. M. David, J. Biol. Chem., 177 (1948), pág. 751-766). La determinación de la concentración de proteína activa se puede realizar a este respecto a través de una titulación de los centros activos mediante el uso de un inhibidor irreversible adecuado (para proteasas por ejemplo fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)) y determinación de la actividad residual (compárese con M. Bender *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 88, 24 (1966), pág. 5890-5913).

La actividad proteasa se indica habitualmente en unidades de proteasa (UP). Las actividades proteasa adecuadas ascienden por ejemplo a 2,25, 5 o 10 UP por ml de baño de lavado. Sin embargo, la actividad proteasa no es igual a cero.

Las proteínas se pueden agrupar a través de la reacción con un antisuero o un anticuerpo determinado hasta dar grupos de proteínas inmunológicamente relacionadas. Los miembros de un grupo de este tipo se caracterizan por que presentan el mismo determinante antigénico reconocido por un anticuerpo. Por tanto, son estructuralmente tan similares entre sí que son reconocidos por un antisuero o por determinados anticuerpos. Por tanto, otro objeto de la invención se forma por proteasas que están caracterizadas por que presentan al menos uno y más preferentemente dos, tres o cuatro determinantes antigénicos coincidentes con una proteasa de acuerdo con la invención. Tales proteasas a causa de sus coincidencias inmunológicas son estructuralmente tan similares a las proteasas de acuerdo con la invención que también se puede partir de una función del mismo tipo.

Adicionalmente a las modificaciones de aminoácidos que se han explicado anteriormente, las proteasas de acuerdo con la invención pueden presentar otras modificaciones de aminoácidos, en particular sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos. Tales proteasas se han perfeccionado por ejemplo mediante modificación genética específica, es decir, mediante procedimientos de mutagénesis, y se han optimizado para determinados fines de uso o en relación con propiedades especiales (por ejemplo en relación con su actividad catalítica, estabilidad, etc.). Además, los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención se pueden introducir en preparaciones de recombinación y emplearse, con ello, para la generación de proteasas completamente novedosas u otros polipéptidos.

El objetivo es introducir en las moléculas conocidas mutaciones específicas tales como sustituciones, inserciones o deleciones, para mejorar por ejemplo el rendimiento de limpieza de enzimas de acuerdo con la invención. Para esto se pueden modificar en particular las cargas superficiales y/o el punto isoeléctrico de las moléculas y, con ello, sus interacciones con el sustrato. Así se puede modificar por ejemplo la carga neta de las enzimas, para influir a través de esto en la unión a sustrato en particular para el empleo en agentes de lavado y de limpieza. Como alternativa o de forma complementaria, mediante una o varias mutaciones correspondientes se puede aumentar la estabilidad de la proteasa y, con ello, se puede mejorar su rendimiento de limpieza. Las propiedades ventajosas de mutaciones individuales, por ejemplo de sustituciones individuales, se pueden complementar. Una proteasa ya optimizada con respecto a determinadas propiedades, por ejemplo con respecto a su estabilidad frente a tensioactivos y/o agentes de blanqueo y/u otros componentes, puede estar perfeccionada por tanto adicionalmente en el marco de la invención.

Para la descripción de sustituciones que afectan exactamente a una posición aminoacídica (sustituciones aminoacídicas) se aplica la siguiente convención: en primer lugar, el aminoácido presente de forma natural se denomina en forma del código de una letra habitual a nivel internacional, después sigue la posición de secuencia correspondiente y finalmente el aminoácido incluido. Varias sustituciones dentro de la misma cadena polipeptídica se separan unas de otras por barras. En las inserciones están indicados los aminoácidos adicionales tras la posición en la secuencia. En las deleciones, el aminoácido ausente está reemplazado por un símbolo, por ejemplo una estrella o una raya. Por ejemplo, A95G describe la sustitución de alanina en la posición 95 por glicina, A95AG, la inserción de glicina después del aminoácido alanina en la posición 95 y A95*, la delección de alanina en la posición 95. Esta nomenclatura es conocida por el experto en el campo de la tecnología de las enzimas.

Por lo tanto, otro objeto de la invención es una proteasa que está caracterizada por que contiene sustituciones conservadoras de aminoácidos sencillas o múltiples, presentando la proteasa en la enumeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 todavía la sustitución aminoacídica de acuerdo con la invención I21V en combinación con al menos otra sustitución aminoacídica, estando seleccionada la otra sustitución aminoacídica del grupo compuesto por Q12L, M122L, N177V, A222S, V228I y T247N, tal como se ha descrito anteriormente. La expresión "sustitución conservadora de aminoácidos" significa la sustitución (reemplazo) de un resto aminoacídico por otro resto aminoacídico, no conduciendo esta sustitución a ningún cambio en la polaridad o en la carga en la posición del aminoácido sustituido, por ejemplo la sustitución de un resto aminoacídico no polar por otro resto aminoacídico no

polar. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos en el marco de la invención comprenden por ejemplo: G=A=S, I=V=L=M, D=E, N=Q, K=R, Y=F, S=T, G=A=I=V=L=M=Y=F=W=P=S=T.

Por ejemplo, también es posible deleccionar en los extremos o en los bucles de la enzima aminoácidos individuales, sin que por ello se pierda o disminuya la actividad proteolítica. Además, mediante fragmentación, mutagénesis por delección, inserción o sustitución se puede disminuir por ejemplo también la capacidad alergénica de las respectivas enzimas y mejorarse, por lo tanto, globalmente su aptitud para el uso. Ventajosamente, las enzimas incluso después de la mutagénesis conservan su actividad proteolítica, es decir, su actividad proteolítica se corresponde al menos con la de la enzima de partida. También las sustituciones pueden mostrar efectos ventajosos. Tanto aminoácidos individuales como varios aminoácidos relacionados se pueden sustituir por otros aminoácidos.

Como alternativa o de forma complementaria, la proteasa está caracterizada por que presenta una o varias sustituciones aminoacídicas en las posiciones que están asignadas a las posiciones 3, 4, 36, 42, 47, 56, 61, 69, 87, 96, 99, 101, 102, 104, 114, 118, 120, 130, 139, 141, 142, 154, 157, 188, 193, 199, 205, 211, 224, 229, 236, 237, 242, 243, 255 y 268 de la proteasa de *Bacillus lentus* de acuerdo con la SEQ ID NO. 3 en un alineamiento, presentando la proteasa en la enumeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 todavía la sustitución aminoacídica de acuerdo con la invención I21V en combinación con al menos otra sustitución aminoacídica, estando seleccionada la otra sustitución aminoacídica del grupo compuesto por Q12L, M122L, N177V, A222S, V228I y T247N, tal como se ha descrito anteriormente. Las otras posiciones de aminoácidos se definen en este caso por un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de una proteasa de acuerdo con la invención con la secuencia de aminoácidos de la proteasa de *Bacillus lentus*, tal como está indicado en la SEQ ID NO. 3. Un alineamiento de este tipo está indicado en la Figura 1. Ya que la proteasa de *Bacillus lentus* representa en el estado de la técnica una molécula de referencia importante para la descripción de nuevas proteasas y de modificaciones de aminoácidos y las nuevas proteasas descritas en el presente documento y, por tanto, también su secuencia hasta la fecha son desconocidas, es ventajoso hacer referencia en la asignación de las posiciones de aminoácidos a la proteasa de *Bacillus lentus* (SEQ ID NO. 3). Además, la asignación de las proteínas se rige según la proteína madura (*mature*). Esta asignación se debe aplicar en particular también cuando la secuencia de aminoácidos de una proteasa de acuerdo con la invención comprende una mayor cantidad de restos aminoacídicos que la proteasa de *Bacillus lentus* de acuerdo con la SEQ ID NO. 3. Partiendo de las posiciones mencionadas en la secuencia de aminoácidos de la proteasa de *Bacillus lentus*, las posiciones de modificación en una proteasa de acuerdo con la invención son aquellas que están asignadas precisamente a estas posiciones en un alineamiento, por ejemplo de acuerdo con la Figura 1.

Son por consiguiente posiciones ventajosas para modificaciones de secuencia, en particular sustituciones, de la proteasa de *Bacillus lentus* que transferidas a posiciones homólogas de las proteasas de acuerdo con la invención son de particular importancia y que otorgan a la proteasa propiedades funcionales ventajosas las posiciones 3, 4, 36, 42, 47, 56, 61, 69, 87, 96, 99, 101, 102, 104, 114, 118, 120, 130, 139, 141, 142, 154, 157, 188, 193, 199, 205, 211, 224, 229, 236, 237, 242, 243, 255 y 268, para la asignación en un alineamiento con la SEQ ID NO. 3 y, por tanto en la enumeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 3. En las posiciones mencionadas, en la molécula de tipo natural de la proteasa de *Bacillus lentus* se encuentran los siguientes restos aminoacídicos: S3, V4, S36, N42, A47, T56, G61, T69, E87, A96, R99, A101, I102, S104, N114, H118, A120, S130, S139, T141, S142, S154, S157, A188, V193, V199, G205, L211, A224, K229, S236, N237, N242, H243, N255 o T268.

Son ventajosas en particular por ejemplo las sustituciones 3T, 4I, 61A, 99G, 99A, 99S, 99E, 154D, 154E, 211D, 211G y 211E, siempre que las posiciones correspondientemente homólogas en una proteasa de acuerdo con la invención no estén ocupadas ya de forma natural por uno de estos aminoácidos preferentes. Las sustituciones 3T y 4I conducen, a través de un efecto de estabilización sobre la molécula, a una mejora del rendimiento de limpieza de la proteasa y, con ello, a un rendimiento de limpieza mejorado de un agente de lavado o de limpieza que contiene la proteasa.

Otra confirmación de la correcta asignación a los aminoácidos que se van a modificar, es decir, en particular de su correspondencia funcional, se puede proporcionar por ensayos comparativos, según lo cual las dos posiciones asignadas una a otra a base de un alineamiento en las dos proteasas comparadas entre sí se modifican del mismo modo y se observa si en ambas se modifica del mismo modo la actividad enzimática. Si por ejemplo tiene lugar una sustitución aminoacídica en una posición determinada de la proteasa de *Bacillus lentus* de acuerdo con la SEQ ID NO. 3 con una modificación de un parámetro enzimático, por ejemplo el aumento del valor de K_M , y se observa una modificación correspondiente del parámetro enzimático, por ejemplo por tanto así mismo un aumento del valor de K_M , en una variante de proteasa de acuerdo con la invención, cuya sustitución aminoacídica se haya conseguido mediante el mismo aminoácido introducido, se ha de ver en esto una confirmación de la correcta asignación.

Todos los hechos mencionados se pueden aplicar también a los procedimientos de acuerdo con la invención para la producción de una proteasa. Por consiguiente, un procedimiento de acuerdo con la invención comprende además una o varias de las siguientes etapas de procedimiento:

(a) introducción de una sustitución conservadora de aminoácidos sencilla o múltiple, presentando la proteasa en la enumeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 la sustitución aminoacídica I21V en combinación con al menos

otra sustitución aminoacídica, estando seleccionada la otra sustitución aminoacídica del grupo compuesto por Q12L, M122L, N177V, A222S, V228I y T247N;

(b) introducción de una sustitución aminoacídica sencilla o múltiple en una o varias de las posiciones que están asignadas a las posiciones 3, 4, 36, 42, 47, 56, 61, 69, 87, 96, 99, 101, 102, 104, 114, 118, 120, 130, 139, 141, 142, 154, 157, 188, 193, 199, 205, 211, 224, 229, 236, 237, 242, 243, 255 y 268 de la proteasa de *Bacillus lentus* de acuerdo con la SEQ ID NO. 3 en un alineamiento, presentando la proteasa en la enumeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 la sustitución aminoacídica I21V en combinación con al menos otra sustitución aminoacídica, estando seleccionada la otra sustitución aminoacídica del grupo compuesto por Q12L, M122L, N177V, A222S, V228I y T247N.

Todas las explicaciones se aplican también a los procedimientos de acuerdo con la invención.

En otras configuraciones de la invención, la proteasa o la proteasa producida con un procedimiento de acuerdo con la invención todavía tiene una identidad de al menos el 91,5 %, 92 %, 92,5 %, 93 %, 93,5 %, 94 %, 94,5 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 98,8 %, 99 % o 99,25 % con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO.1 a lo largo de toda su longitud. La proteasa o la proteasa producida con un procedimiento de acuerdo con la invención presenta la sustitución aminoacídica I21V en combinación con al menos otra sustitución aminoacídica, estando seleccionada la otra sustitución aminoacídica del grupo compuesto por Q12L, M122L, N177V, A222S, V228I y T247N.

Otro objeto de la invención es una proteasa que se ha descrito anteriormente, que está estabilizada adicionalmente, en particular mediante una o varias mutaciones, por ejemplo sustituciones, o mediante acoplamiento a un polímero. De hecho, un aumento de la estabilidad durante el almacenamiento y/o durante el empleo, por ejemplo durante el proceso de lavado, conduce a que la actividad enzimática dure más tiempo y, con ello, se mejore el rendimiento de limpieza. Básicamente se consideran todas las posibilidades de estabilización descritas y/o apropiadas del estado de la técnica. Se prefieren aquellas estabilizaciones que se consiguen a través de mutaciones de la propia enzima, ya que tales estabilizaciones después de la obtención de la enzima no requieren etapas de trabajo adicionales. Se han mencionado anteriormente ejemplos de modificaciones de secuencia adecuadas para esto. Por el estado de la técnica se conocen otras modificaciones de secuencia adecuadas. Así, las proteasas por ejemplo también se pueden estabilizar al sustituirse uno o varios restos de tirosina por otros aminoácidos.

Otras posibilidades de estabilización son por ejemplo:

- modificación de la unión de iones de metal, en particular de los puntos de unión a calcio, por ejemplo por sustitución de uno o varios de los aminoácidos que intervienen en la unión a calcio por uno o varios aminoácidos de carga negativa y/o mediante la introducción de modificaciones de secuencia en al menos una de las sucesiones de los dos aminoácidos arginina/glicina;
- protección frente a la influencia de agentes desnaturizantes tales como tensioactivos por mutaciones que causan una modificación de la secuencia de aminoácidos sobre o en la superficie de la proteína;
- sustitución de aminoácidos que se encuentran próximos al extremo N por aquellos que se ponen en contacto con el resto de la molécula probablemente a través de interacciones no covalentes y, de este modo, realizan una aportación a la conservación de la estructura globular.

Son formas de realización preferentes aquellas en las que se estabiliza la enzima de varias maneras, ya que varias mutaciones estabilizantes tienen un efecto aditivo o sinérgico.

Otro objeto de la invención es una proteasa como se ha descrito anteriormente, que está caracterizada por que presenta al menos una modificación química. Una proteasa con una modificación de este tipo se denomina derivado, es decir, la proteasa está derivatizada.

Por consiguiente, por derivados se entiende en el sentido de la presente invención aquellas proteínas cuya cadena de aminoácidos pura se ha modificado químicamente. Tales derivatizaciones se pueden realizar por ejemplo *in vivo* por la célula hospedadora que expresa la proteína. A este respecto cabe destacar en particular acoplamientos de compuestos de bajo peso molecular, tal como de lípidos u oligosacáridos. Pero las derivatizaciones se pueden realizar también *in vitro*, por ejemplo mediante la transformación química de una cadena lateral de un aminoácido o mediante la unión covalente con otro compuesto a la proteína. Por ejemplo, es posible el acoplamiento de aminas a grupos carboxilo de una enzima para la modificación del punto isoelectrónico. Un compuesto diferente de este tipo también puede ser otra proteína que se une por ejemplo a través de compuestos químicos bifuncionales a una proteína de acuerdo con la invención. Así mismo, por derivatización se ha de entender el enlace covalente a un vehículo macromolecular o incluso una inclusión no covalente en estructuras macromoleculares de jaula adecuadas. Las derivatizaciones pueden influir por ejemplo en la especificidad por sustrato o en el poder de unión al sustrato o causar un bloqueo temporal de la actividad enzimática cuando, en el caso de la sustancia acoplada, se trata de un inhibidor. Esto puede ser razonable por ejemplo para el periodo de tiempo del almacenamiento. Tales modificaciones pueden influir además en la estabilidad o la actividad enzimática. Además, también pueden servir para reducir la capacidad alérgica y/o inmunogenicidad de la proteína y aumentar de este modo por ejemplo su compatibilidad

con la piel. Por ejemplo, los acoplamientos con compuestos macromoleculares, por ejemplo polietilenglicol, pueden mejorar la proteína en relación con la estabilidad y/o la compatibilidad con la piel.

5 Por derivados de una proteína de acuerdo con la invención se puede entender en el sentido más amplio también preparaciones de estas proteínas. En función de la obtención, el tratamiento o la preparación, una proteína puede estar asociada a diversas de otras sustancias, por ejemplo del cultivo de los microorganismos productores. Una proteína también puede haberse mezclado, por ejemplo para el aumento de su estabilidad en almacenamiento, de forma específica con otras sustancias. Por tanto, también están de acuerdo con la invención todas las preparaciones de una proteína de acuerdo con la invención. Esto también es independiente de si en una preparación determinada realmente despliega o no esta actividad enzimática. De hecho, puede desearse que durante el almacenamiento no posea actividad o solo una actividad reducida y que no despliegue hasta el momento del uso su función enzimática. Esto se puede controlar por ejemplo a través de sustancias acompañantes correspondientes. En particular, a este respecto es posible la preparación conjunta de proteasas con inhibidores de proteasa.

15 En relación con todas las proteasas o variantes de proteasa y/o derivados que se han descrito anteriormente, en el marco de la presente invención se prefieren en particular aquellos cuya actividad se corresponde al menos con aquella de la proteasa de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 y/o SEQ ID NO. 2 y/o SEQ ID NO. 3 y/o cuyo rendimiento de limpieza se corresponde al menos con el de la proteasa de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 y/o SEQ ID NO. 2 y/o SEQ ID NO. 3, determinándose el rendimiento de limpieza en un sistema de lavado tal como se ha descrito anteriormente.

20 Otro objeto de la invención es un ácido nucleico que codifica una proteasa de acuerdo con la invención, así como un vector que contiene un ácido nucleico de este tipo, en particular un vector de clonación o un vector de expresión.

25 A este respecto se puede tratar de moléculas de ADN o de ARN. Pueden estar presentes como cadena sencilla, como una cadena sencilla complementaria a esta cadena sencilla o como cadena doble. En particular en el caso de moléculas de ADN se han de considerar las secuencias de ambas cadenas complementarias en, en cada caso, las tres posibles fases de lectura. Además se ha de tener en cuenta que distintos codones, es decir, tripletes de bases, pueden codificar los mismos aminoácidos, de tal manera que varios ácidos nucleicos diferentes pueden codificar una secuencia de aminoácidos determinada. A causa de esta degeneración del código genético quedan incluidas en este objeto de la invención todas las secuencias de ácido nucleico que pueden codificar una de las proteasas que se han descrito anteriormente. El experto en la materia está en disposición de determinar de forma inequívoca estas secuencias de ácido nucleico, ya que a pesar de la degeneración del código genético se pueden asignar aminoácidos definidos a codones individuales. Por tanto, el experto en la materia, partiendo de una secuencia de aminoácidos, puede establecer sin problemas los ácidos nucleicos que codifican esta secuencia de aminoácidos. Además, en los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención pueden estar sustituidos uno o varios codones por codones sinónimos. Este aspecto se refiere en particular a la expresión heteróloga de las enzimas de acuerdo con la invención. Así, cada organismo, por ejemplo una célula hospedadora de una cepa de producción, posee un determinado uso de codón. Por uso de codón se entiende la traducción del código genético en aminoácidos por el respectivo organismo. Pueden darse cuellos de botella en la biosíntesis de proteínas cuando los codones que se encuentran en el ácido nucleico en el organismo se encuentran frente a un número comparativamente reducido de moléculas de ARNt cargadas. A pesar de que codifique el mismo aminoácido, esto conduce a que en el organismo un codón se traduzca con menor eficiencia que un codón sinónimo que codifica el mismo aminoácido. A causa de la presencia de una mayor cantidad de moléculas de ARNt para el codón sinónimo, el mismo se puede traducir de forma más eficaz en el organismo.

45 Para un experto en la materia, a través de métodos conocidos de forma general hoy en día, tales como por ejemplo la síntesis química o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), junto con métodos convencionales de biología molecular y/o de química de proteínas, es posible producir mediante secuencias conocidas de ADN y/o aminoácidos los correspondientes ácidos nucleicos hasta genes completos. Tales métodos se conocen por ejemplo por Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3ª Edición Cold Spring Laboratory Press.

55 Por vectores se entiende en el sentido de la presente invención elementos compuestos por ácidos nucleicos, que contienen un ácido nucleico de acuerdo con la invención como región caracterizadora de ácido nucleico. Son capaces de establecer los mismos en una especie o en una línea celular a lo largo de varias generaciones o divisiones celulares como elemento genético estable. Los vectores son, en particular en el caso del uso en bacterias, plásmidos especiales, es decir elementos genéticos circulares. En el marco de la presente invención se clona un ácido nucleico de acuerdo con la invención en un vector. A los vectores pertenecen por ejemplo aquellos cuyo origen son plásmidos bacterianos, virus o bacteriófagos, o vectores o plásmidos sobre todo sintéticos con elementos del más diverso origen. Con los otros elementos genéticos en cada caso presentes se pueden establecer los vectores en las respectivas células hospedadoras a lo largo de varias generaciones como unidades estables. Pueden estar presentes de forma extracromosómica como unidades propias o integrarse en un cromosoma o en un ADN cromosómico.

65 Los vectores de expresión comprenden secuencias de ácido nucleico que les capacitan para replicarse en las células hospedadoras que los contienen, preferentemente en microorganismos, de forma particularmente preferente

bacterias, y expresar allí un ácido nucleico contenido. La expresión se ve influida en particular por el o los promotores que regulan la transcripción. En principio se puede realizar la expresión por el promotor natural, localizado originalmente delante del ácido nucleico que se va a expresar, pero también por un promotor facilitado en el vector de expresión de la célula hospedadora o incluso por un promotor modificado o un promotor completamente diferente de otro organismo o de otra célula hospedadora. En el presente caso se pone a disposición al menos un promotor para la expresión de un ácido nucleico de acuerdo con la invención y se aprovecha para su expresión. Los vectores de expresión además pueden ser regulables, por ejemplo mediante cambio de las condiciones de cultivo, o al alcanzar una determinada densidad celular de las células hospedadoras que los contienen o mediante la adición de determinadas sustancias, en particular activadores de la expresión génica. Un ejemplo de una sustancia de este tipo es el derivado de galactosa isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG), que se usa como activador del operón lactosa (operón lac) bacteriano. A diferencia de los vectores de expresión, el ácido nucleico contenido no se expresa en vectores de clonación.

Otro objeto de la invención es una célula hospedadora no humana, que incluye un ácido nucleico de acuerdo con la invención o un vector de acuerdo con la invención, o que incluye una proteasa de acuerdo con la invención, en particular una que secreta la proteasa al medio que rodea a la célula hospedadora. Preferentemente se introduce mediante transformación un ácido nucleico de acuerdo con la invención o un vector de acuerdo con la invención en un microorganismo, que entonces representa una célula hospedadora de acuerdo con la invención. Como alternativa también se pueden introducir componentes individuales, es decir, partes o fragmentos de ácido nucleico de un ácido nucleico de acuerdo con la invención en una célula hospedadora, de tal modo que la célula hospedadora que entonces resulta contiene un ácido nucleico de acuerdo con la invención o un vector de acuerdo con la invención. Este proceder es particularmente adecuado cuando la célula hospedadora ya contiene uno o varios constituyentes de un ácido nucleico de acuerdo con la invención o de un vector de acuerdo con la invención y entonces se complementan correspondientemente los otros constituyentes. Los procedimientos para la transformación de células están establecidos en el estado de la técnica y se conocen suficientemente por el experto en la materia. En principio, como células hospedadoras son adecuadas todas las células, es decir, células procariotas o eucariotas. Se prefieren aquellas células hospedadoras que se pueden manipular de forma ventajosa genéticamente, en lo que respecta por ejemplo a la transformación con el ácido nucleico o el vector y su establecimiento estable, por ejemplo hongos unicelulares o bacterias. Además, las células hospedadoras preferentes se caracterizan por una capacidad de manipulación microbiológica y biotecnológica adecuada. Esto se refiere por ejemplo a la fácil capacidad de cultivo, elevados índices de crecimiento, bajas exigencias en cuanto a los medios de fermentación y buenos índices de producción y secreción para proteínas extrañas. Las células hospedadoras de acuerdo con la invención preferentes secretan la proteína expresada (transgénica) al medio que rodea a las células hospedadoras. Además, las proteasas se pueden modificar por las células que producen las mismas después de su producción, por ejemplo mediante el enlazado de moléculas de azúcar, formilaciones, aminaciones, etc. Tales modificaciones postraduccionales pueden influir funcionalmente en la proteasa.

Otras formas de realización preferentes se representan por las células hospedadoras que se pueden regular en su actividad a causa de elementos de regulación genéticos, que se ponen a disposición por ejemplo en el vector, pero que también pueden estar presentes de antemano en estas células. Por ejemplo, mediante la adición controlada de compuestos químicos, que sirven de activadores, mediante cambio de las condiciones de cultivo o al alcanzar una densidad celular determinada, se pueden estimular los mismos para la expresión. Esto posibilita una producción rentable de las proteínas de acuerdo con la invención. Un ejemplo de un compuesto de este tipo es IPTG, como se ha descrito anteriormente.

Las células hospedadoras preferentes son células procariotas o bacterianas. Las bacterias se caracterizan por tiempos de generación cortos y pocas exigencias a las condiciones de cultivo. Por ello se pueden establecer procedimientos de cultivo o procedimientos de producción económicos. Además, el experto en la materia en el caso de bacterias en la técnica de fermentación dispone de una experiencia extensa. Para una producción especial, por lo más diversos motivos que en el caso particular se deben establecer experimentalmente, tales como fuentes de nutrientes, índice de formación de producto, tiempo requerido, etc., pueden ser adecuadas bacterias Gram negativas o Gram positivas.

En el caso de bacterias Gram negativas, tales como por ejemplo *Escherichia coli*, se secreta una pluralidad de proteínas al espacio periplasmático, es decir, al compartimento entre las dos membranas que encierran las células. Esto puede ser ventajoso para aplicaciones especiales. Además, también se pueden configurar las bacterias Gram negativas de tal modo que secreten las proteínas expresadas no solo al espacio periplasmático, sino al medio que rodea a la bacteria. Las bacterias Gram positivas, tales como por ejemplo bacilos o actinomicetos u otros representantes de los *Actinomycetales*, frente a esto no poseen ninguna membrana externa, de tal modo que las proteínas secretadas se descargan de inmediato al medio que rodea a las bacterias, por norma general el medio de cultivo, del que se pueden purificar las proteínas expresadas. Se pueden aislar directamente del medio o se pueden seguir procesando. Además, las bacterias Gram positivas están relacionadas con la mayoría de los organismos de origen para enzimas técnicamente importantes o son idénticas a los mismos y forman, la mayoría de las veces, ellas mismas enzimas comparables, de tal modo que disponen de un uso de codón similar y su mecanismo de síntesis de proteínas está preparado de forma natural correspondientemente.

Las células hospedadoras de acuerdo con la invención pueden estar modificadas con respecto a sus exigencias a las condiciones de cultivo, presentar otros marcadores de selección o marcadores de selección adicionales o expresar también otras proteínas o proteínas adicionales. En particular se puede tratar también de aquellas células hospedadoras que expresan de forma transgénica varias proteínas o enzimas.

La presente invención se puede aplicar en principio en todos los microorganismos, en particular en todos los microorganismos fermentables, de forma particularmente preferente en aquellos del género *Bacillus* y conduce a que, mediante el empleo de tales microorganismos, se puedan preparar proteínas de acuerdo con la invención. Tales microorganismos representan entonces células hospedadoras en el sentido de la invención.

En otra forma de realización de la invención, la célula hospedadora está caracterizada por que es una bacteria, preferentemente una que está seleccionada del grupo de los géneros de *Escherichia*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Stenotrophomonas* y *Pseudomonas*, más preferentemente una que está seleccionada del grupo de *Escherichia coli*, *Klebsiella planticola*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus globigii*, *Bacillus gibsonii*, *Bacillus clausii*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus carnosus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Arthrobacter oxidans*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor* y *Stenotrophomonas maltophilia*.

Pero la célula hospedadora puede ser también una célula eucariota que está caracterizada por que posee un núcleo celular. Por tanto, otro objeto de la invención se representa por una célula hospedadora que está caracterizada por que posee un núcleo celular. A diferencia de las células procariotas, las células eucariotas están en disposición de modificar postraduccionalmente la proteína formada. Son ejemplos de esto hongos tales como actinomicetos o levaduras tales como *Saccharomyces* o *Kluyveromyces*. Esto puede ser particularmente ventajoso por ejemplo cuando las proteínas en relación con su síntesis han de experimentar modificaciones específicas que posibiliten tales sistemas. A las modificaciones que llevan a cabo los sistemas eucariotas en particular en relación con la síntesis de proteínas pertenecen, por ejemplo, la unión a compuestos de bajo peso molecular, tales como anclajes a membrana u oligosacáridos. Tales modificaciones de oligosacáridos pueden ser deseables por ejemplo para la reducción de la capacidad alergénica de una proteína expresada. Puede ser ventajosa también una coexpresión con las enzimas formadas de forma natural por tales células, tales como por ejemplo celulasas o lipasas. Además pueden ser adecuados por ejemplo sistemas de expresión fúngicos termófilos, en particular para la expresión de proteínas o variantes termorresistentes.

Las células hospedadoras de acuerdo con la invención se cultivan y fermentan de la manera habitual, por ejemplo en sistemas discontinuos o continuos. En el primer caso se inocula un medio de cultivo adecuado con las células hospedadoras y se recoge el producto del medio después de un periodo de tiempo que se debe establecer de forma experimental. Las fermentaciones continuas se caracterizan por la consecución de un equilibrio de flujo, en el que a lo largo de un periodo relativamente largo en parte mueren células, pero también vuelven a desarrollarse y, al mismo tiempo, se puede retirar del medio la proteína formada.

Las células hospedadoras de acuerdo con la invención se usan preferentemente para producir proteasas de acuerdo con la invención. Por tanto, otro objeto de la invención es un procedimiento para la producción de una proteasa que comprende

- a) el cultivo de una célula hospedadora de acuerdo con la invención
- b) el aislamiento de la proteasa del medio de cultivo o de la célula hospedadora.

Este objeto de la invención comprende preferentemente procedimientos de fermentación. Los procedimientos de fermentación en sí son conocidos por el estado de la técnica y representan la etapa de producción a gran escala en sí, por norma general seguido de un método de purificación adecuado del producto producido, por ejemplo de la proteasa de acuerdo con la invención. Todos los procedimientos de fermentación que se basan en un procedimiento correspondiente para la producción de una proteasa de acuerdo con la invención representan formas de realización de este objeto de la invención.

Se consideran en particular los procedimientos de fermentación que están caracterizados por que se lleva a cabo la fermentación a través de una estrategia de alimentación. En este caso se suministran los constituyentes del medio que son consumidos por el cultivo continuo. Por ello se pueden conseguir considerables aumentos tanto en la densidad celular como en la masa celular o la masa seca y/o sobre todo la actividad de la proteasa de interés. Además, la fermentación también se puede diseñar de tal modo que se retiren mediante filtración los productos indeseados del metabolismo o se neutralicen mediante adición de tampón o contraiones en cada caso adecuados.

La proteasa producida se puede recoger del medio de fermentación. Un procedimiento de fermentación de este tipo se prefiere frente a un aislamiento de la proteasa de la célula hospedadora, es decir, una preparación de producto de la masa de células (masa seca), sin embargo, requiere la puesta a disposición de células hospedadoras adecuadas o de uno o varios marcadores o mecanismos de secreción y/o sistemas de transporte adecuados para que las células hospedadoras secreten la proteasa al medio de fermentación. Sin la secreción se puede realizar como alternativa el aislamiento de la proteasa de la célula hospedadora, es decir, una purificación de la misma de la masa

celular, por ejemplo mediante precipitación con sulfato de amonio o etanol o mediante purificación mediante cromatografía.

5 Todos los hechos que se han indicado anteriormente se pueden combinar hasta dar procedimientos para producir proteasas de acuerdo con la invención.

10 Otro objeto de la invención es un medio que está caracterizado por que contiene una proteasa de acuerdo con la invención tal como se ha descrito anteriormente. Preferentemente, el agente es un agente de lavado o de limpieza. Ya que las proteasas de acuerdo con la invención presentan rendimientos de limpieza ventajosos en particular en suciedades que contienen huevo, los agentes son particularmente adecuados y ventajosos para la eliminación de tales suciedades.

15 A este objeto de la invención pertenecen todos los tipos concebibles de agentes de lavado o de limpieza, tanto concentrados como agentes que se deben aplicar sin diluir, para su empleo a escala comercial, en la lavadora o en el lavado o la limpieza a mano. A esto pertenecen por ejemplo agentes de lavado para materiales textiles, alfombras o fibras naturales, para los que se usa la denominación de agentes de lavado. A esto pertenecen por ejemplo también lavavajillas para máquinas lavavajillas o agentes para el lavado manual de la vajilla o detergentes para superficies duras tales como metal, vidrio, porcelana, cerámica, baldosas, piedra, superficies barnizadas, plásticos, madera o cuero, para los que se usa la denominación agentes de limpieza, es decir, aparte de agentes para el lavado a mano y a máquina de la vajilla, por ejemplo también agentes para fregar, limpiacristales, pastillas para WC, etc. A los agentes de lavado y de limpieza en el marco de la invención pertenecen además coadyuvantes de lavado que se añaden mediante dosificación al agente de lavado en sí durante la colada a mano o a máquina del material textil para conseguir un efecto adicional. Además, a los agentes de lavado y de limpieza en el marco de la invención pertenecen también agentes para el pretratamiento y el tratamiento posterior de materiales textiles, es decir, aquellos agentes con los que se pone en contacto la prenda de ropa antes de la colada en sí, por ejemplo para la disolución de ensuciamientos resistentes, y también aquellos agentes que proporcionan, en una etapa pospuesta a la colada en sí del material textil, al artículo de lavado propiedades deseables adicionales tales como un tacto agradable, ausencia de arrugas o una reducida carga estática. A los agentes mencionados en último lugar pertenecen, entre otros, los suavizantes.

20 Los agentes de lavado o de limpieza de acuerdo con la invención, que pueden estar presentes como sólidos en particular en forma de polvo, en forma de partículas compactadas posteriormente, como soluciones o suspensiones homogéneas, pueden contener, aparte de una proteasa de acuerdo con la invención, todos los ingredientes conocidos y habituales en tales agentes, estando presente preferentemente al menos otro ingrediente en el agente. Los agentes de acuerdo con la invención pueden contener en particular tensioactivos, adyuvantes (soportes), compuestos de peróxigeno o activadores de blanqueo. Además pueden contener disolventes orgánicos miscibles con agua, otras enzimas, agentes secuestrantes, electrolitos, reguladores del pH y/u otros coadyuvantes tales como agentes de blanqueo óptico, inhibidores del agrisado, reguladores de espuma así como colorantes y fragancias así como combinaciones de los mismos.

25 En particular es ventajosa una combinación de una proteasa de acuerdo con la invención con uno o varios ingredientes adicionales del agente, ya que tal agente en configuraciones de acuerdo con la invención preferentes presenta un rendimiento de limpieza mejorado por las sinergias que se producen. En particular mediante la combinación de una proteasa de acuerdo con la invención con un tensioactivo y/o un adyuvante (soporte) y/o un compuesto de peróxigeno y/o un activador de blanqueo se puede conseguir tal sinergia.

30 Se desvelan ingredientes ventajosos de los agentes de acuerdo con la invención en la solicitud de patente internacional WO2009/121725, allí comenzando en la página 5, penúltimo párrafo, y terminando en la página 13 después del segundo párrafo. Se hace referencia expresa a esa divulgación y se incorpora su contenido de divulgación en la presente solicitud de patente.

35 Un agente de acuerdo con la invención contiene la proteasa ventajosamente en una cantidad de 2 µg a 20 mg, preferentemente de 5 µg a 17,5 mg, de forma particularmente preferente de 20 µg a 15 mg y de forma muy particularmente preferente de 50 µg a 10 mg por g del agente. Además, la proteasa contenida en el agente y/u otros ingredientes del agente pueden estar envueltos con una sustancia impermeable para la enzima a temperatura ambiente o en ausencia de agua que en las condiciones de aplicación del agente se hace permeable para la enzima. Una forma de realización de este tipo de la invención, por tanto, está caracterizada por que la proteasa está envuelta con una sustancia impermeable para la proteasa a temperatura ambiente o en ausencia de agua. Además, también el propio agente de lavado o de limpieza puede estar envasado en un recipiente, preferentemente un recipiente permeable a aire, del cual se libera justo antes del uso o durante el proceso de lavado.

40 En otras formas de realización de la invención, el agente está caracterizado por que

- 45 (a) está presente en forma sólida, en particular está presente como polvo fluido con una densidad aparente de 300 g/l a 1200 g/l, en particular de 500 g/l a 900 g/l o
 (b) está presente en forma pastosa o líquida y/o

- (c) está presente como sistema de un componente o
- (d) está dividido en varios componentes.

5 Estas formas de realización de la presente invención comprenden todas las formas de presentación sólidas, en polvo, líquidas, en forma de gel o pastosas de agentes de acuerdo con la invención, que pueden estar compuestas dado el caso también por varias fases y pueden estar presentes en forma comprimida o no comprimida. El agente puede estar presente también como polvo fluido, en particular con una densidad aparente de 300 g/l a 1200 g/l, en particular de 500 g/l a 900 g/l o de 600 g/l a 850 g/l. A las formas de presentación sólidas del agente pertenecen además extruídos, granulados, pastillas o bolsas. Como alternativa, el agente también puede ser líquido, estar en
10 forma de gel o ser pastoso, por ejemplo en forma de un agente de lavado líquido no acuoso o una pasta no acuosa o en forma de un agente de lavado líquido acuoso o una pasta que contiene agua. Además, el agente puede estar presente como sistema de un componente. Tales agentes se componen de una fase. Como alternativa, un agente se puede componer también de varias fases. Un agente de este tipo está dividido por tanto en varios componentes.

15 Los agentes de lavado o de limpieza de acuerdo con la invención pueden contener exclusivamente una proteasa. Como alternativa pueden contener también otras enzimas hidrolíticas u otras enzimas en una concentración apropiada para la eficacia del agente. Otra forma de realización de la invención se representa por tanto por agentes que comprenden además una o varias de enzimas adicionales. Como enzimas adicionales se pueden emplear preferentemente todas las enzimas que pueden desplegar una actividad catalítica en el agente de acuerdo con la
20 invención, en particular una proteasa, amilasa, celulasa, hemicelulasa, mananasa, tanasa, xilanasas, xantanasa, xiloglucanasa, β -glucosidasa, pectinasa, carragenasa, perhidrolasa, oxidasa, oxidorreductasa o una lipasa así como sus mezclas. Las enzimas adicionales están contenidas en el agente ventajosamente en cada caso en una cantidad del 1×10^{-8} al 5 por ciento en peso con respecto a la proteína activa. Más preferentemente está contenida cada enzima adicional en una cantidad del 1×10^{-7} -3 % en peso, del 0,00001-1 % en peso, del 0,00005-0,5 % en peso,
25 del 0,0001 al 0,1 % en peso y de forma particularmente preferente del 0,0001 al 0,05 % en peso en agentes de acuerdo con la invención con respecto a la proteína activa. De forma particularmente preferente, las enzimas muestran rendimientos de limpieza sinérgicos con respecto a determinadas suciedades o manchas, es decir, las enzimas contenidas en la composición de agente se respaldan mutuamente en su rendimiento de limpieza. De forma muy particularmente preferente existe una sinergia de este tipo entre la proteasa contenida de acuerdo con la
30 invención y otra enzima de un agente de acuerdo con la invención, entre esto en particular entre la proteasa mencionada y la amilasa y/o una lipasa y/o una mananasa y/o una celulasa y/o una pectinasa. Los efectos sinérgicos pueden aparecer no solo entre distintas enzimas, sino también entre una o varias enzimas y otros ingredientes del agente de acuerdo con la invención.

35 Otro objeto de la invención es un procedimiento para la limpieza de materiales textiles o superficies duras que está caracterizado por que en al menos una etapa del procedimiento se aplica un agente de acuerdo con la invención o por que en al menos una etapa del procedimiento una proteasa de acuerdo con la invención se convierte en catalíticamente activa, en particular de tal modo que la proteasa se emplea en una cantidad de 40 μ g a 4 g, preferentemente de 50 μ g a 3 g, de forma particularmente preferente de 100 μ g a 2 g y de forma muy
40 particularmente preferente de 200 μ g a 1 g.

Entre estos se incluyen procedimientos tanto manuales como a máquina, prefiriéndose los procedimientos a máquina. Los procedimientos para la limpieza de materiales textiles en general se caracterizan por que en varias etapas del procedimiento se aplican distintas sustancias con actividad de limpieza sobre el material de limpieza y se
45 eliminan mediante lavado después del tiempo de actuación o por que el material de limpieza se trata de otro modo con un agente de lavado o una solución o dilución de este agente. Lo correspondiente se aplica a procedimientos para la limpieza de todos los demás materiales distintos de materiales textiles, en particular de superficies duras. Todos los procedimientos de lavado o de limpieza concebibles se pueden enriquecer en al menos una de las etapas del procedimiento con la aplicación de un agente de lavado o de limpieza de acuerdo con la invención o una
50 proteasa de acuerdo con la invención y representan entonces formas de realización de la presente invención. Todos los hechos, objetos y formas de realización que se han descrito para las proteasas de acuerdo con la invención o los agentes que contienen las mismas se pueden aplicar también a este objeto de la invención. Por tanto, se hace referencia expresa en este punto a la divulgación en el lugar correspondiente con la indicación de que esta divulgación se aplica también a los anteriores procedimientos de acuerdo con la invención.

55 Ya que las proteasas de acuerdo con la invención ya poseen de forma natural una actividad hidrolítica y también despliegan la misma en medios que por lo demás no poseen ningún poder de limpieza, tal como por ejemplo en un mero tampón, una única y/o la única etapa de un procedimiento de este tipo puede consistir en que en caso deseado se ponga en contacto como único componente con actividad de limpieza una proteasa de acuerdo con la invención
60 con la suciedad, preferentemente en una solución de tampón o en agua. Esto representa otra forma de realización de este objeto de la invención.

Representan formas de realización alternativas de este objeto de la invención también los procedimientos para el tratamiento de materias primas de material textil o para el cuidado de materiales textiles en los que se convierte en
65 activa una proteasa de acuerdo con la invención en al menos una etapa del procedimiento. Entre estos se prefieren

procedimientos para materias primas de materiales textiles, fibras o materiales textiles con constituyentes naturales y de forma muy particularmente preferente para aquellos con lana o seda.

5 Otro objeto de la invención es el uso de un agente de acuerdo con la invención para la limpieza de materiales textiles o de superficies duras, o de una proteasa de acuerdo con la invención para la limpieza de materiales textiles o de superficies duras, en particular de tal modo que la proteasa se emplea en una cantidad de 40 µg a 4 g, preferentemente de 50 µg a 3 g, de forma particularmente preferente de 100 µg a 2 g y de forma muy particularmente preferente de 200 µg a 1 g.

10 Todos los hechos, objetos y formas de realización que se han descrito para las proteasas de acuerdo con la invención o los agentes que contienen las mismas se pueden aplicar también a este objeto de la invención. Por tanto, se hace referencia expresa en este punto a la divulgación en el lugar correspondiente con la indicación de que esta divulgación se aplica también al anterior uso de acuerdo con la invención.

15 Ejemplos

Todas las etapas de trabajo de biología molecular siguen métodos convencionales, tal como están indicados por ejemplo en el manual de Fritsch, Sambrook y Maniatis "Molecular cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbour Laboratory Press, Nueva York, 1989, o en obras pertinentes comparables. Se emplearon las enzimas y los elementos combinables (kits) según las indicaciones de los respectivos fabricantes.

Ejemplo 1

25 Partiendo de una proteasa que presentaba una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 se produjo una variante de proteasa de acuerdo con la invención mediante mutagénesis dirigida ("*site-directed*") en el ácido nucleico que codificaba la proteasa mediante el método de SeSaM (Wong, T. S. *et al.* (2004): Sequence saturation mutagenesis (SeSaM): a novel method for directed evolution. *Nucleic Acids Res.* 32, 26 y siguientes). En este caso se modificaron los codones para las posiciones indicadas de aminoácidos, de tal modo que con respecto a la secuencia de aminoácidos se produjo una sustitución de los aminoácidos tal como se indica. La expresión de la variante de proteasa se realizó de forma y manera habitual en la técnica mediante transformación de *Bacillus subtilis* DB 104 (Kawamura y Doi (1984), *J. Bacteriol.*, tomo 160 (1), pág. 442-444) con un vector de expresión correspondiente y posterior cultivo de los transformantes que expresaban la variante de proteasa.

35 Variante de proteasa 1: proteasa con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 con las sustituciones aminoacídicas I21V, M122L, A222S y T247N en la enumeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 (SEQ ID NO. 4);

Variante de proteasa 2: proteasa con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 con las sustituciones aminoacídicas I21V, N177V y V228I en la enumeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 (SEQ ID NO. 5);

40 Variante de proteasa 3: proteasa con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 con las sustituciones aminoacídicas Q12L, I21V, M122L y A222S en la enumeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 (SEQ ID NO. 6)

45 Ejemplo 2: establecimiento del rendimiento de limpieza con el empleo en un agente de lavado en forma de polvo disponible en el mercado

Para este ejemplo se emplearon materiales textiles ensuciados de forma normalizada. Se usaron las siguientes suciedades:

50 A: huevo completo/pigmento sobre algodón: producto n.º C-S-37 disponible en CFT (Center For Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Países Bajos.

Con este material de ensayo se examinaron distintas formulaciones de agente de lavado con respecto a su rendimiento de limpieza. Para esto se lavaron las preparaciones durante 60 minutos a una temperatura de 20 °C o 55 40 °C. La dosificación se situaba en 4,7 g del agente de lavado por litro de baño de lavado. Se lavó con agua corriente con una dureza del agua de 16° de dureza alemana.

60 Como agente de lavado de control sirvió una formulación de base de agente de lavado con la siguiente composición (todas las indicaciones en porcentaje en peso): el 10 % de sulfonato de alquilbenceno lineal (sal de sodio), el 1,5 % de sulfato de alcohol graso C12-C18 (sal de sodio), el 2,0 % de alcohol graso C12-C18 con 7 OE, el 20 % de carbonato de sodio, el 6,5 % de hidrogenocarbonato de sodio, el 4,0 % de disilicato de sodio amorfo, el 17 % de carbonato de sodio peroxohidrato, el 4,0 % de TAED, el 3,0 % de poliacrilato, el 1,0 % de carboximetilcelulosa, el 1,0 % de fosfonato, el 27 % de sulfato de sodio, resto: inhibidores de formación de espuma, agentes de blanqueo óptico, fragancias.

65

La formulación de base de agente de lavado se mezcló para las distintas series de ensayo con la misma actividad (5 UP/ml de concentración final) con las siguientes proteasas: variante de proteasa 1 (preparación 1), variante de proteasa 2 (preparación 2) y variante de proteasa 3 (preparación 3). Como patrón se empleó la proteasa alcalina de *Bacillus gibsonii* DSM 14391 de acuerdo con la SEQ ID NO. 1.

Después del lavado se midió el grado de blancura de los materiales textiles lavados. La medición se realizó en un espectrómetro Minolta CM508d (tipo de luz D65, 10°). El aparato se calibró previamente con un patrón de blanco suministrado. Los resultados obtenidos son los rendimientos relativos de las proteasas de acuerdo con la invención con respecto a la proteasa convencional (medida en unidades de Y) y están resumidos en la siguiente Tabla 1. Permiten una inmediata deducción de la aportación de la enzima contenida en cada caso al rendimiento de limpieza del agente usado.

Tabla 1: resultados de lavado con un agente de lavado en forma de polvo a 20 °C o 40 °C

| | Patrón | Preparación 1 | Preparación 2 | Preparación 3 |
|-------|--------|---------------|---------------|---------------|
| 20 °C | 100 % | 178% | 246% | 250% |
| 40 °C | 100 % | 171% | 218% | 220% |

Se evidencia que las proteasas de acuerdo con la invención muestran rendimientos de limpieza ventajosos.

Descripción de la figura:

Figura 1:

comparación de secuencia (alineamiento) de las secuencias de acuerdo con la SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2 y SEQ ID NO. 3, creada con el programa Vector NTI® Suite 10.3 (Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, California, EE.UU.) con parámetros convencionales.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Henkel AG & Co. KGaA

<120> Variantes de proteasa mejoradas en cuanto al rendimiento

<130> PT018511 (H 09129) PCT

<150> DE102011005354.9

<151> 10-03-2011

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 269

<212> PRT

<213> *Bacillus* sp.

<400> 1

ES 2 666 001 T3

Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Thr Val
 1 5 10 15

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

Thr Gly Ile Ala Gln His Ser Asp Leu Thr Ile Arg Gly Gly Ala Ser
 35 40 45

Phe Val Pro Gly Glu Ser Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr
 50 55 60

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

Gly Val Ala Pro Ser Ala Asp Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala
 85 90 95

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

Ala Thr Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ser Asp Ala
 115 120 125

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

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

Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln

ES 2 666 001 T3

165 170 175
 Asn Asn Arg Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Thr Gly Ile Asp Ile
 180 185 190
 Val Ala Pro Gly Val Gly Ile Gln Ser Thr Tyr Leu Asn Asn Ser Tyr
 195 200 205
 Ala Ser Met Pro Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Val
 210 215 220
 Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Asn Ala Thr Gln Ile
 225 230 235 240
 Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Asn Leu Gly Asn Ser Ser Gln
 245 250 255
 Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Asp Ala Ala Thr Arg
 260 265

<210> 2
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> *Bacillus* sp.

5

<400> 2

Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Thr Val
 1 5 10 15
 His Asn Arg Gly Val Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Ile Leu Asp
 20 25 30
 Thr Gly Ile Ala Gln His Ser Asp Leu Thr Ile Arg Gly Gly Ala Ser
 35 40 45
 Phe Val Pro Gly Glu Ser Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr
 50 55 60
 His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Ile
 65 70 75 80
 Gly Val Ala Pro Ser Ala Asp Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala
 85 90 95
 Asn Gly Arg Gly Ser Val Ser Gly Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala
 100 105 110
 Ala Thr Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ser Asp Ala

10

ES 2 666 001 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|--|--|
| 115 | 120 | 125 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pro | Ser | Thr | Thr | Leu | Glu | Arg | Ala | Val | Asn | Tyr | Ala | Thr | Ser | Arg | Gly | | | | | | |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | | | | | | |
| Val | Leu | Val | Ile | Ala | Ala | Thr | Gly | Asn | Asn | Gly | Thr | Gly | Ser | Ile | Gly | | | | | | |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | | | | | | |
| Tyr | Pro | Ala | Arg | Tyr | Ala | Asn | Ala | Met | Ala | Val | Gly | Ala | Thr | Asp | Gln | | | | | | |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | | | | | | |
| Asn | Asn | Arg | Arg | Ala | Ser | Phe | Ser | Gln | Tyr | Gly | Thr | Gly | Ile | Asp | Ile | | | | | | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | | | | | | |
| Val | Ala | Pro | Gly | Val | Gly | Ile | Gln | Ser | Thr | Tyr | Leu | Asn | Asn | Ser | Tyr | | | | | | |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | | | | | | |
| Ala | Ser | Met | Pro | Gly | Thr | Ser | Met | Ala | Thr | Pro | His | Val | Ala | Gly | Val | | | | | | |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | | | | | | |
| Ala | Ala | Leu | Val | Lys | Gln | Lys | Asn | Pro | Ser | Trp | Asn | Ala | Thr | Gln | Ile | | | | | | |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | | | | | | |
| Arg | Asn | His | Leu | Lys | Asn | Thr | Ala | Thr | Asn | Leu | Gly | Asn | Ser | Ser | Gln | | | | | | |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | | | | | | |
| Phe | Gly | Ser | Gly | Leu | Val | Asn | Ala | Asp | Ala | Ala | Thr | Arg | | | | | | | | | |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | | | | | | | | | |

5 <210> 3
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> *Bacillus lentus*

10 <400> 3

ES 2 666 001 T3

Ala Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala
1 5 10 15

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

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

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

His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu

ES 2 666 001 T3

<210> 5
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> *Bacillus* sp.

5

<400> 5

Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Gln Ala Pro Thr Val
 1 5 10 15

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

Thr Gly Ile Ala Gln His Ser Asp Leu Thr Ile Arg Gly Gly Ala Ser
 35 40 45

Phe Val Pro Gly Glu Ser Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr
 50 55 60

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

Gly Val Ala Pro Ser Ala Asp Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala
 85 90 95

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

Ala Thr Asn Asn Met His Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Ser Asp Ala
 115 120 125

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

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

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

Val Asn Arg Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Thr Gly Ile Asp Ile
 180 185 190

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

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

ES 2 666 001 T3

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

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

Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Asp Ala Ala Thr Arg
 260 265

<210> 6
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> *Bacillus* sp.

5

<400> 6

Gln Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Thr Arg Val Leu Ala Pro Thr Val
 1 5 10 15

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

Thr Gly Ile Ala Gln His Ser Asp Leu Thr Ile Arg Gly Gly Ala Ser
 35 40 45

Phe Val Pro Gly Glu Ser Thr Thr Ala Asp Leu Asn Gly His Gly Thr
 50 55 60

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

Gly Val Ala Pro Ser Ala Asp Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala
 85 90 95

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

Ala Thr Asn Asn Met His Ile Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Asp Ala
 115 120 125

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

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

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

10

ES 2 666 001 T3

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

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

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

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

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

Phe Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Asp Ala Ala Thr Arg
260 265

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 1 a lo largo de toda su longitud de al menos el 91,5 % y en la enumeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 presenta la sustitución aminoacídica I21V en combinación con al menos otra sustitución aminoacídica, estando seleccionada la otra sustitución aminoacídica del grupo compuesto por Q12L, M122L, N177V, A222S, V228I y T247N, estando mejorada esta proteasa en cuanto al rendimiento en agentes de lavado y de limpieza con respecto a la correspondiente proteasa que no presenta estas sustituciones aminoacídicas.
- 10 2. Proteasa de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que
 - (a) la proteasa presenta sustituciones conservadoras de aminoácidos sencillas o múltiples y/o
 - (b) la proteasa presenta una o varias sustituciones aminoacídicas en las posiciones que están asignadas a las
 - 15 188, 193, 199, 205, 211, 224, 229, 236, 237, 242, 243, 255 y 268 de la proteasa de *Bacillus lentus* de acuerdo con la SEQ ID NO. 3 en un alineamiento, presentando la proteasa en la enumeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 la sustitución aminoacídica I21V en combinación con al menos otra sustitución aminoacídica, estando seleccionada la otra sustitución aminoacídica del grupo compuesto por Q12L, M122L, N177V, A222S, V228I y T247N.
 - 20
- 25 3. Procedimiento para la producción de una proteasa de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende la introducción de una sustitución aminoacídica I21V en combinación con al menos otra sustitución aminoacídica, estando seleccionada la otra sustitución aminoacídica del grupo compuesto por Q12L, M122L, N177V, A222S, V228I y T247N, en la enumeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 en una proteasa de partida que tiene una identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 1 a lo largo de toda su longitud de al menos el 91,5 %.
- 30 4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende además una o varias de las siguientes etapas de procedimiento:
 - (a) introducción de una sustitución conservadora de aminoácidos sencilla o múltiple, presentando la proteasa en la enumeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 la sustitución aminoacídica I21V en combinación con al menos otra sustitución aminoacídica, estando seleccionada la otra sustitución aminoacídica del grupo compuesto por
 - 35 Q12L, M122L, N177V, A222S, V228I y T247N;
 - (b) introducción de una sustitución aminoacídica sencilla o múltiple en una o varias de las posiciones que están asignadas a las posiciones 3, 4, 36, 42, 47, 56, 61, 69, 87, 96, 99, 101, 102, 104, 114, 118, 120, 130, 139, 141, 142, 154, 157, 188, 193, 199, 205, 211, 224, 229, 236, 237, 242, 243, 255 y 268 de la proteasa de *Bacillus lentus* de acuerdo con la SEQ ID NO. 3 en un alineamiento, presentando la proteasa en la enumeración de acuerdo con la SEQ ID NO. 1 la sustitución aminoacídica I21V en combinación con al menos otra sustitución aminoacídica,
 - 40 estando seleccionada la otra sustitución aminoacídica del grupo compuesto por Q12L, M122L, N177V, A222S, V228I y T247N.
- 45 5. Ácido nucleico que codifica una proteasa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2.
- 50 6. Vector que contiene un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5, en particular un vector de clonación o un vector de expresión.
7. Célula hospedadora no humana, que incluye un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 o un vector de acuerdo con la reivindicación 6, o que incluye una proteasa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, en particular una que secreta la proteasa al medio que rodea a la célula hospedadora.
8. Procedimiento para la producción de una proteasa que comprende
 - a) el cultivo de una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 7
 - 55 b) el aislamiento de la proteasa del medio de cultivo o de la célula hospedadora.
9. Agente, en particular un agente de lavado o de limpieza, caracterizado por que contiene al menos una proteasa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, en particular en una cantidad de 2 µg a 20 mg por g del agente, y/o por que contiene al menos una proteasa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2 y la proteasa en el agente está envuelta con una sustancia impermeable para la proteasa a temperatura ambiente o en ausencia de agua.
- 60 10. Procedimiento para la limpieza de materiales textiles o superficies duras, caracterizado por que en al menos una etapa del procedimiento se aplica un agente de acuerdo con la reivindicación 9 o por que en al menos una etapa del procedimiento se hace catalíticamente activa una proteasa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, en particular de tal modo que se emplea la proteasa en una cantidad de 40 µg a 4 g por aplicación.
- 65

Figura 1:

| | | | | |
|--------------|-------|---|------------------------------|----------------------|
| | | 1 | | 50 |
| SEQ ID NO. 1 | (1) | QQTVPWGITRVQAPT | VHNRGITGSGVKVAI | LDTGIAQHSDLTIRGGASFV |
| SEQ ID NO. 2 | (1) | QQTVPWGITRVQAPT | VHNRGVTGSGVKVAI | LDTGIAQHSDLTIRGGASFV |
| SEQ ID NO. 3 | (1) | AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLT | GSGVKVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFV | |
| | | 51 | | 100 |
| SEQ ID NO. 1 | (51) | PGESTTADLNHGHTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPSADLYAVKVLGANGRG | | |
| SEQ ID NO. 2 | (51) | PGESTTADLNHGHTHVAGTVAALNNSIGVIGVAPSADLYAVKVLGANGRG | | |
| SEQ ID NO. 3 | (51) | PGEPSTQDGNHGHTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGADGRG | | |
| | | 101 | | 150 |
| SEQ ID NO. 1 | (101) | SVSGIAQGLEWAATNNMHIANMSLGSDAPSTTLERAVNYATSRGVLVIAA | | |
| SEQ ID NO. 2 | (101) | SVSGIAQGLEWAATNNMHIANMSLGSDAPSTTLERAVNYATSRGVLVIAA | | |
| SEQ ID NO. 3 | (101) | AISSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSPPSPSATLEQAVNSATSRGVLVIAA | | |
| | | 151 | | 200 |
| SEQ ID NO. 1 | (151) | TGNNGTGSIGYPARYANAMAVGATDQNNRRASFQYGTGIDIVAPGVGIQ | | |
| SEQ ID NO. 2 | (151) | TGNNGTGSIGYPARYANAMAVGATDQNNRRASFQYGTGIDIVAPGVGIQ | | |
| SEQ ID NO. 3 | (151) | SGNSGASSISYPARYANAMAVGATDQNNRRASFQYAGLDIVAPGVNVQ | | |
| | | 201 | | 250 |
| SEQ ID NO. 1 | (201) | STYLNNSYASMPGTSMATPHVAGVAALVKQKNPSWNPATQIRNHLKNTATN | | |
| SEQ ID NO. 2 | (201) | STYLNNSYASMPGTSMATPHVAGVAALVKQKNPSWNPATQIRNHLKNTATN | | |
| SEQ ID NO. 3 | (201) | STYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKNPSWSNVQIRNHLKNTATS | | |
| | | 251 | | 269 |
| SEQ ID NO. 1 | (251) | LGNSSQFGSGLVNADAATR | | |
| SEQ ID NO. 2 | (251) | LGNSSQFGSGLVNADAATR | | |
| SEQ ID NO. 3 | (251) | LGSTNLYGSGLVNAEAATR | | |