

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 931**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

C12N 9/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2010** **E 16200028 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019** **EP 3190183**

54 Título: **Composiciones y métodos comprendiendo variantes de proteasa**

30 Prioridad:

09.12.2009 US 285127 P

12.10.2010 US 392373 P

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

09.03.2020

73 Titular/es:

DANISCO US INC. (100.0%)

925 Page Mill Road

Palo Alto, CA 94304, US

72 Inventor/es:

TORRES PARMINO, DANIEL, ESTEBAN;

POULOSE, AYROOKARAN, J.;

PISARCHIK, ALEXANDER;

KELLIS, JAMES, T.;

ESTELL, DAVID, A.;

CASCÃO-PEREIRA, LUIS, GUSTAVO y

BASLER, JOSHUA, ROY

74 Agente/Representante:

RIZZO , Sergio

ES 2 746 931 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos comprendiendo variantes de proteasa

CAMPO DE LA INVENCIÓN

- 5 [0001] La presente invención proporciona variantes de proteasa, composiciones comprendiendo variantes de proteasa, y métodos para utilizar dichas variantes de proteasas y composiciones de las mismas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] Aunque las proteasas se han conocido durante mucho tiempo en la técnica de enzimas industriales, aún queda una necesidad de proteasas modificadas que sean adecuadas para usos y condiciones particulares. La presente invención satisface estas y otras necesidades.

- 10 [0003] El documento WO 95/30010 describe variantes de BPN' que presenta modificaciones en regiones de lazo de superficie a fin de disminuir la adsorción a sustratos insolubles y aumentar la hidrólisis.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

- 15 [0004] La invención proporciona una variante de proteasa aislada, comprendiendo la variante una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 y comprendiendo el conjunto de sustituciones de aminoácidos S101N-G128A-Y217Q, donde la variante presenta una actividad proteolítica y/o una actividad de limpieza potenciada en comparación con la actividad proteolítica y/o la actividad de limpieza de la proteasa BPN' que presenta la secuencia de la SEQ ID NO:2, y cada posición de aminoácido de la variante está numerada por correspondencia con una posición de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 tal como se determinó por la alineación por la secuencia de aminoácidos de la variante con la SEQ ID NO:2.
- 20

[0005] La variante puede comprender además la sustitución de aminoácidos X097A.

[0006] La variante puede tener al menos un 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:6.

- 25 [0007] La variante puede tener una actividad proteolítica potenciada en comparación con la actividad proteolítica de la proteasa que presenta la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO:6.

[0008] La variante puede comprender un conjunto de sustitución seleccionado de:

- 30 S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q;
S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q;
S024G-N025G-N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q;
S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
N025G-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
N025G-S038G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
N025G-S053G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q;
35 N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
N025G-S053G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
N025G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
N025G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q;
40 N061P-S101N-G128A-Y217Q;
S024G-N025G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q;
S024G-N025G-S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
45 S024G-N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
S024G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
S024G-S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
S024G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
S024G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
50 S024G-S053G-T055P-N061P-S101N-G128A-Y217Q;
S053G-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
S053G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q-S249N;
S053G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
55 S053G-T055P-N061P-S101N-G128A-Y217Q;
S053G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q;

T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 S024G-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 S024G-N025G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 5 S024G-N025G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q;
 S024G-N025G-S053G-T055P-S078N-S101N-G128A-Y217Q;
 S024G-N025G-S053G-T055P-S101N-G128A-Y217Q;
 S024G-N025G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 S024G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 10 S024G-S038G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q;
 S024G-S053G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 S024G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q;
 S024G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 S24G-N25G-N61P-G97A-S101N-G128A-Y217Q;
 15 S24G-N25G-S53G-T55P-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
 N61P-S78N-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
 T55P-N61P-S78N-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
 S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-Y217Q;
 S24G-N25G-T55P-G97A-S101N-G128A-Y217Q;
 20 S24G-N25G-S53G-N61P-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
 T55P-S78N-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
 S53G-N61P-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
 N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-Y217Q;
 S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
 25 S78N-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-Y217Q;
 S24G-N25G-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-Y217Q;
 S24G-N25G-T55P-S78N-G97A-S101N-G128A-Y217Q;
 S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-Y217Q;
 S24G-N25G-S53G-T55P-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
 30 N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
 S24G-N25G-S53G-T55P-S78N-G97A-S101N-G128A-Y217Q;
 S24G-N25G-S53G-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
 S24G-N25G-S78N-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
 S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-Y217Q;
 35 T55P-S78N-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-Y217Q;
 S24G-N25G-T55P-N61P-S78N-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
 S24G-N25G-S53G-S78N-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
 S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-P129S-V203Y-Y217Q;
 S53G-N61P-G97A-S101N-G128A-Y217Q;
 40 S53G-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
 S53G-T55P-S78N-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
 S24G-N25G-S53G-S78N-G97A-S101N-G128A-Y217Q;
 S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
 S24G-N25G-T55P-S78N-A88V-G97A-S101N-G128A-Y217Q;
 45 S24G-N25G-S53G-S78N-S87T-A88L-G97A-S101N-G128A-Y217Q-V203Y;
 S24G-N25G-S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
 T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
 S24G-N25G-S78N-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-Y217Q;
 S53G-N61P-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
 50 S53G-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
 S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
 S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
 S24G-N25G-S78N-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
 S53G-T55P-N61P-L75S-N76Y-G97A-S101N-G128A-S130P-V203Y-Y217Q; y
 55 G97A-S101N-G128A-Y217Q.

[0009] La invención proporciona además un ácido nucleico recombinante o aislado que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica al menos una variante de polipéptido (por ejemplo, variante de proteasa) de la invención, o una secuencia polinucleotídica de la misma.

60 **[0010]** La invención proporciona además un ácido nucleico recombinante o aislado que comprende una secuencia polinucleotídica que presenta al menos un 80 % de identidad de secuencia con la secuencia polinucleotídica expuesta en la SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5, o una secuencia polinucleotídica complementaria de las mismas.

[0011] La invención proporciona además un vector de expresión que comprende al menos un ácido nucleico de la invención. También se proporciona una célula huésped recombinante o un cultivo celular que comprende al menos un ácido nucleico o un vector de expresión de la invención.

5 **[0012]** La invención proporciona además un método para producir al menos un polipéptido (por ejemplo, variante de proteasa) de la invención, comprendiendo el método: (a) introducir un vector de expresión recombinante de la invención que codifica un polipéptido (por ejemplo, una variante de proteasa) de la invención en una población de células; (b) cultivar las células en un medio de cultivo en condiciones propicias para producir el polipéptido (por ejemplo, una variante de proteasa) codificadas por el vector de expresión; y opcionalmente (c) aislar o recuperar la variante de las células o del medio de cultivo.

10 **[0013]** La invención proporciona además una composición que comprende al menos una variante de proteasa o polipéptido de la invención, opcionalmente en combinación con otra enzima. Dicha composición puede comprender un ingrediente auxiliar, como un tensioactivo y/o mejorador, o un portador. Dicha composición puede ser una composición de limpieza o una composición detergente y puede ser útil en los métodos de limpieza descritos en algún otro sitio del presente documento. Dicha composición no es un producto para el cuidado del hogar o de tejidos.

[0014] La invención proporciona además un método para limpiar un artículo, objeto o superficie que necesite limpiarse, comprendiendo el método poner en contacto el artículo, objeto o superficie con un polipéptido o variante de proteasa de la invención o una composición de la invención, y enjuagar de manera opcional el artículo, objeto o superficie con agua.

20 **[0015]** La invención proporciona además un método para limpiar un artículo o una superficie (por ejemplo, una superficie dura), comprendiendo el método poner en contacto al menos una parte del artículo o superficie (por ejemplo, una superficie dura) que se ha de limpiar con una variante de proteasa o polipéptido de la invención o una composición de la invención durante un tiempo suficiente y/o en condiciones suficientes o eficaces para limpiar o lavar el artículo o la superficie (por ejemplo, una superficie dura) hasta un nivel deseado, y
25 comprendiendo de manera opcional aclarar el artículo o superficie (por ejemplo, una superficie dura) con agua.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0016]

La figura 1 proporciona un mapa plasmídico de pHPLT-BPN'-v3.

La figura 2 proporciona un mapa plasmídico de pHPLT-BPN'-v3+S78N.

30 La figura 3 proporciona un mapa plasmídico de pHPLT-BPN' parcial opt.

La figura 4 proporciona un mapa plasmídico de pHPLT-BPN'-v36.

La figura 5 proporciona un alineamiento de las subtilisina proteasas de referencia maduras, incluyendo: BPN' (SEQ ID NO:2) y GG36 (SEQ ID NO:755). Cada posición de aminoácido de cada variante de proteasa descrita en el presente documento, incluyendo cada variante de proteasa en agua fría, se
35 numera según la numeración de la posición de aminoácido correspondiente en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina proteasa BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* (SEQ ID NO:2), tal como se muestra en la figura 5, según lo determinado por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina proteasa BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*. Por tanto, a menos que se especifique lo contrario en el presente documento, las
40 posiciones de sustitución se dan con relación a BPN'.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Definiciones

[0017] A menos que se indique lo contrario, la práctica de la presente invención implica técnicas convencionales que se suelen utilizar en biología molecular, modificación de proteínas, microbiología, y ADN recombinante, que
45 están dentro de la técnica de los expertos en la materia. Los expertos en la materia conocen dichas técnicas, que se describen en numerosos textos y obras de referencia que conocen bien los expertos en la materia.

[0018] Salvo que se defina de otro modo en el presente texto, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente texto tienen el mismo significado que el que entienden comúnmente los expertos en la materia a la que pertenece esta invención. Los expertos en la materia conocen muchos diccionarios técnicos. Aunque
50 cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente texto son de utilidad en la práctica de la presente invención, algunos métodos y materiales adecuados se describen en la presente memoria. Por consiguiente, los términos que se definen inmediatamente a continuación se describen de forma más completa haciendo referencia a la memoria en su conjunto. Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. Salvo que se indique de otro modo, los ácidos nucleicos están escritos de
55 izquierda a derecha en una orientación de 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos están escritas de izquierda a derecha en una orientación de amino a carboxi, respectivamente. Se entiende que esta invención no se

encuentra limitada a la metodología, protocolos y reactivos descritos en concreto, puesto que estos pueden variar, en función del contexto en que sean utilizados por los expertos en la materia.

[0019] La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de purificación de proteínas, biología molecular, microbiología, técnicas de ADN recombinante y secuenciación de proteínas, que están dentro de la técnica de los expertos en la materia.

[0020] Asimismo, los encabezados proporcionados en la presente memoria no constituyen limitaciones a los diversos aspectos de la invención, que pueden tomarse por referencia a la memoria en su conjunto. En consecuencia, los términos que se definen justo a continuación se encuentran definidos de manera más completa en referencia a la memoria en su conjunto. No obstante, con el objetivo de facilitar la comprensión de la invención, a continuación se definen una serie de términos.

[0021] Tal como se entiende en el presente documento, los términos «proteasa» y «proteínasa» hacen referencia a una proteína enzimática que tiene la habilidad de descomponer otras proteínas. Una proteasa posee la capacidad de llevar a cabo la «proteólisis», que comienza el catabolismo de las proteínas mediante la hidrólisis de enlaces peptídicos que unen aminoácidos entre sí en una cadena de péptidos o polipéptidos que forma la proteína. Esta actividad de una proteasa como una enzima capaz de digerir proteínas se denomina «actividad proteolítica». Existen numerosos procedimientos conocidos para medir la actividad proteolítica (véase p. ej., Kalisz, «Microbial Proteinases». En: Fiechter (ed.), *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, (1988)). Por ejemplo, puede determinarse la actividad proteolítica mediante ensayos comparativos que analizan la capacidad que presenta la proteasa respectiva para hidrolizar un sustrato comercial. Ejemplos de sustratos útiles para el análisis de actividad proteasa o proteolítica incluyen, sin carácter limitativo, dimetil caseína (Sigma C-9801), colágeno bovino (Sigma C-9879), elastina bovina (Sigma E-1625) y queratina bovina (ICN Biomedical 902111). Los ensayos colorimétricos que utilizan estos sustratos resultan conocidos en la técnica (Véase, p. ej., el documento WO 99/34011y el documento de patente estadounidense n.º 6,376,450). El ensayo pNA (véase, p. ej., Del Mar et al., *Anal. Biochem.* 99:316-320 [1979]) también se puede utilizar para determinar la concentración de enzima activa para fracciones recogidas durante la elución en gradiente. Este ensayo mide el ritmo al que se libera la p-nitroanilina según la enzima hidroliza el sustrato sintético soluble, succinil-alanina-alanina-prolina-fenilalanina-p-nitroanilida (suc-AAPF-pNA). El ritmo de producción del color amarillo a partir de la reacción de hidrólisis se mide a 410 nm en un espectrofotómetro y es proporcional a la concentración de enzima activa. Además, las mediciones de absorbancia a 280 nanómetros (nm) pueden emplearse para determinar la concentración total de proteínas. La relación de enzimas activas/proteínas totales proporciona pureza a la enzima.

[0022] Tal como se utiliza en el presente documento, el término «subtilisina» se refiere a cualquier miembro de la familia de serina proteasa S8 tal como se describe en la base de datos de peptidasas MEROPS - The Peptidase Database (véase Rawlings et al., *MEROPS: the peptidase database*, *Nucl. Acids Res.*, 34 Database issue, D270-272 [2006]). Tal como se describe en la misma, la familia de peptidasas S8 contiene la subtilisina serina endopeptidasa y sus homólogos (Rawlings & Barrett, *Biochem J.* 290:205-218, [1993]). La familia S8, también conocida como la familia subtilasa, es la segunda familia más grande de serina peptidasas. Recientemente, se han determinado las estructuras terciarias de varios miembros de la familia S8. Una estructura de proteína S8 típica consta de tres capas con una lámina β de siete cadenas colocada entre dos capas de hélices. La subtilisina (S08.001) es la estructura tipo del clan SB (SB). A pesar de la estructura distinta, los sitios activos de subtilisina y quimotripsina (S01.001) pueden superponerse, lo que sugiere que la similitud es el resultado de una evolución convergente en lugar de divergente.

[0023] Una «variante de proteasa» (o «proteasa variante») puede hacer referencia a una proteasa que difiere en su secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de una proteasa de referencia o proteasa original en al menos un residuo de aminoácido. Una proteasa original o proteasa de referencia no necesita ser una proteasa natural, sino que puede ser una variante de una proteasa natural. No se pretende que la proteasa original o de referencia esté limitada por ninguna secuencia de aminoácidos en concreto. Una variante de proteasa de una proteasa original o de referencia puede comprender una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la proteasa original o proteasa de referencia y al menos una inserción, delección o sustitución de aminoácido en relación con la secuencia de aminoácidos de la proteasa original o proteasa de referencia. En un aspecto, la invención incluye una variante de una serina proteasa, donde la variante presenta al menos una mutación en relación con la serina proteasa. En un aspecto, la presente invención incluye una «variante de BPN'» (o «variante de subtilisina BPN'») que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una o más mutaciones en relación con la secuencia de BPN' madura de la SEQ ID NO:2.

[0024] Una proteasa original o proteasa de referencia puede ser, pero no está limitada a, por ejemplo, una proteasa conocida (incluyendo, pero sin carácter limitativo, por ejemplo, BPN') o una proteasa disponible en el mercado o una variante de la proteasa disponible comercialmente. Una proteasa original o proteasa de referencia puede ser una variante de una proteasa conocida o disponible en el mercado. Una variante de proteasa puede derivarse de una proteasa original que está disponible en el mercado o una variante de dicha

proteasa original disponible en el mercado. Las proteasas disponibles comercialmente, incluyen, pero sin carácter limitativo, por ejemplo, las proteasas vendidas con las marcas SAVINASE®, POLARZYME®, KANNASE®, LIQUINASE®, LIQUINASE ULTRA®, SAVINASE ULTRA®, OVOZYME®, (por Novozymes A/S); MAXACAL®, PROPERASE®, PURAFECT®, FN3®, FN4® y PURAFECT OXP®, PURAFAST™, PURAFECT® PRIME, PURAMAX® (por Danisco US, anteriormente Genencor International, Inc.); y las disponibles de Henkel/Kemira, a saber, BLAP (secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 29 del documento US 5,352,604 con las siguientes mutaciones S99D+S101R+S103A+ V104I+G159S, a la que se hará referencia en adelante como BLAP) y BLAP X (BLAP con S3T+V4I+V205I).

[0025] Tal como se utiliza en el presente documento, una «proteasa de agua fría» es una enzima que exhibe uno o más de los siguientes cuatro criterios: (a) un índice de rendimiento de al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de aproximadamente 1,1 a aproximadamente 10, de aproximadamente 1,1 a aproximadamente 8, o incluso de aproximadamente 1,1 a aproximadamente 5 en BMI con pH 8 y 16 °C (60 °F) cuando se compara con PURAFECT® Prime (SEQ ID NO:2 con la sustitución de aminoácido Y217L), tal como se define en el «Método de prueba» expuesto en el presente documento en el Ejemplo 1; (b) un índice de rendimiento de al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de 1,3 a aproximadamente 10, de 1,3 a aproximadamente 8, o incluso de 1,3 a aproximadamente 5 en BMI con pH 8 y 16 °C (60 °F) cuando se compara con BPN' (SEQ ID NO:2), tal como se define en el «Método de prueba» expuesto en el presente documento en el Ejemplo 1; (c) un índice de rendimiento de al menos 0,9, al menos 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de 0,9 a aproximadamente 10, de 0,9 a aproximadamente 8, o incluso de 0,9 a aproximadamente 5 en BMI con pH 8 y 16 °C (60 °F) cuando se compara con BPN'-v3 (SEQ ID NO:4), tal como se define en el «Método de prueba» expuesto en el presente documento en el Ejemplo 1; y/o (d) un índice de rendimiento de al menos 0,9, al menos 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de 0,9 a aproximadamente 10, de 1,0 a aproximadamente 8, o incluso de 1,0 a aproximadamente 5 en BMI con pH 8 y 16 °C (60 °F) cuando se compara con BPN'-v36 (SEQ ID NO:6), tal como se define en el «Método de prueba» expuesto en el presente documento en el Ejemplo 1.

[0026] Algunas proteasas de agua fría adecuadas se derivan de subtilisinas, en concreto de aquellas que se derivan de la subtilisina BPN' (SEQ ID NO:2). Una proteasa de agua fría puede ser una variante de BPN' presentando la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 (por ejemplo, una «variante de BPN'» o «variante de subtilisina BPN'»). Algunas proteasas de agua fría comprenden una o más sustituciones de aminoácidos expuestas en el presente documento.

[0027] Tal como se emplea en el presente documento, el género *Bacillus* incluye todas las especies del género *Bacillus*, tal como los conocen los expertos en la materia, incluyendo, pero sin carácter limitativo, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. clausii*, *B. halodurans*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus*, y *B. thuringiensis*. Se reconoce que el género *Bacillus* continúa siendo objeto de reorganización taxonómica. En consecuencia, se pretende que el género incluya las especies que han sido reclasificadas, incluyendo, pero sin carácter limitativo, organismos como *B. stearothermophilus*, ahora denominado «*Geobacillus stearothermophilus*». La producción de endosporas resistentes en presencia de oxígeno se considera el rasgo definitorio del género *Bacillus*, aunque esta característica también se aplica a los recientemente denominados *Alicyclobacillus*, *Amphibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Anoxybacillus*, *Brevibacillus*, *Filobacillus*, *Gracilibacillus*, *Halobacillus*, *Paenibacillus*, *Salibacillus*, *Thermobacillus*, *Ureibacillus*, y *Virgibacillus*.

[0028] Los términos «polinucleótido» y «ácido nucleico», que se utilizan indistintamente en el presente documento, se refieren a un polímero de cualquier longitud de monómeros nucleotídicos unidos de forma covalente en una cadena. El ADN (ácido desoxirribonucleico), un polinucleótido que comprende desoxirribonucleótidos, y el ARN, (ácido ribonucleico), un polímero de ribonucleótidos, son ejemplos de polinucleótidos o ácidos nucleicos que tienen distinta función biológica. Los polinucleótidos o los ácidos nucleicos incluyen, pero sin carácter limitativo, ADN monocatenario, bicatenario o tricatenario, ADN genómico, ADNc, ARN, híbridos ADN-ARN, o un polímero que comprende bases de purinas y pirimidinas, u otras bases nucleotídicas naturales, modificadas química o bioquímicamente, no naturales o derivadas. A continuación, se presentan ejemplos no limitativos de polinucleótidos: genes, fragmentos de genes, fragmentos cromosómicos, marcador(es) de secuencia expresada (EST, por sus siglas en inglés), exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt), ARN ribosómico (ARNr), ribozimas, ADN complementario (ADNc), polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. Algunos polinucleótidos comprenden nucleótidos modificados, como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos, uracilo, otros azúcares y grupos de enlace como fluororribosa y tioato, y ramificaciones nucleotídicas. Una secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida por componentes no nucleotídicos.

[0029] Tal como se utiliza en el presente documento, el término «vector» se refiere a un constructo de ácido nucleico o un constructo polinucleotídico utilizado para introducir o transferir ácido(s) nucleico(s) o

polinucleótido(s) a un tejido o una célula diana. Normalmente se utiliza un vector para introducir ADN extraño en otro tejido o célula. Por lo general, un vector comprende una secuencia de ADN que es un transgén y una secuencia polinucleotídica mayor que sirve como «cadena principal» del vector. El vector sirve normalmente para transferir información genética, como el transgén insertado, a un tejido o una célula diana con el fin de aislar, multiplicar o expresar el inserto en el tejido o la célula diana. Los vectores incluyen plásmidos, vectores de clonación, bacteriófagos, virus (p. ej., vector viral), cósmidos, vectores de expresión, vectores transportadores, casetes, y similares. Un vector incluye normalmente un origen de replicación, un sitio de clonación múltiple y un marcador de selección. El proceso de inserción de un vector en una célula diana se denomina normalmente transformación en células de levadura y bacterianas, y transfección en células de mamíferos. La presente invención incluye un vector que comprende una secuencia de ADN que codifica una variante de proteasa (p. ej., una variante de proteasa precursora o madura) que se encuentra ligada de forma operativa a una prosequencia adecuada (p. ej., secretora, secuencia de péptido señal, etc.) capaz de efectuar la expresión de la secuencia de ADN en un huésped adecuado.

[0030] Tal como se utiliza en el presente documento, los términos «casete de expresión» o «vector de expresión» se refieren a un vector o un constructo de ácido nucleico generado de forma recombinante o sintética para la expresión de un ácido nucleico de interés (p. ej., un transgén o un ácido nucleico extraño) en una célula diana. El ácido nucleico de interés expresa normalmente una proteína de interés. Un vector de expresión o casete de expresión comprende normalmente una secuencia nucleotídica promotora que dirige o promueve la expresión del ácido nucleico extraño. El vector o casete de expresión también incluye normalmente cualquier otro elemento de ácido nucleico específico que permite la transcripción de un ácido nucleico concreto en una célula diana. Un casete de expresión recombinante se puede incorporar en un plásmido, cromosoma, ADN mitocondrial, ADN plastidial, virus o fragmento de ácido nucleico. Algunos vectores de expresión tienen la capacidad de incorporar y expresar fragmentos de ADN heterólogo en una célula huésped. Muchos vectores de expresión procariotas y eucariotas están comercialmente disponibles. La selección de vectores de expresión adecuados está dentro del conocimiento de los expertos en la materia. La selección de vectores de expresión apropiados para la expresión de una proteína de una secuencia de ácidos nucleicos incorporada en el vector de expresión se encuentra incluida en los conocimientos de los expertos en la materia.

[0031] Un constructo de ADN es un segmento de ácido nucleico construido de forma artificial que puede introducirse en una célula o tejido diana. Un constructo de ADN comprende parcialmente una inserción de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que ha sido subclonada en un vector. El vector puede contener genes de resistencia bacteriana para crecer en bacterias y un promotor para la expresión de la proteína de interés en un organismo. El ADN puede generarse *in vitro* mediante PCR o cualquier otra técnica conocida por los expertos en la materia. El constructo de ADN puede comprender una secuencia de ácido nucleico de interés. En un aspecto, la secuencia se encuentra ligada de forma operativa a elementos adicionales, como elementos de control (p. ej., promotores, etc.). El constructo de ADN puede comprender también un marcador de selección y puede comprender también una secuencia de entrada flanqueada por cajas de homología. El constructo puede comprender otras secuencias no homólogas, añadidas a los extremos (p. ej., secuencias o flancos de relleno). Los extremos de la secuencia pueden estar cerrados, de forma que el constructo de ADN forma un círculo cerrado. La secuencia de ácidos nucleicos de interés, que se incorpora en el constructo de ADN, utilizando técnicas bien conocidas en el ámbito de especialización, puede ser un ácido nucleico natural, mutante o modificado. El constructo de ADN puede comprender una o más secuencias de ácido nucleico homólogas al cromosoma de la célula huésped. El constructo de ADN puede comprender una o más secuencias nucleotídicas no homólogas. Una vez el constructo de ADN se ensambla *in vitro* puede utilizarse, por ejemplo, para: 1) insertar secuencias heterólogas en una secuencia diana deseada de una célula huésped; y/o 2) mutagenizar una región del cromosoma de la célula huésped (esto es, sustituir una secuencia endógena por una secuencia heteróloga); 3) delecionar los genes diana; e/o 4) introducir un plásmido de replicación en el huésped. En el presente documento, «constructo de ADN» se emplea de manera intercambiable con «casete de expresión».

[0032] Tal como se utiliza en el presente documento, un «plásmido» se refiere a una molécula de ADN extracromosómico que es capaz de replicarse de forma independiente del ADN cromosómico. Un plásmido es bicatenario (ds) y puede ser circular, y se utiliza normalmente como un vector de clonación.

[0033] Tal como se utiliza en el presente documento en el contexto de la introducción de una secuencia de ácidos nucleicos en una célula, el término «introducido» se refiere a cualquier método adecuado para transferir la secuencia de ácidos nucleicos a la célula. Dichos métodos de introducción incluyen, sin carácter limitativo, transfección, transformación, electroporación, conjugación, transducción y fusión de protoplastos (véase, p. ej., Ferrari et al., «Genetics», en Hardwood et al. (eds.), Bacillus, Plenum Publishing Corp., pp. 57-72 [1989]).

[0034] Transformación se refiere a la alteración genética de una célula que resulta de la captación, la incorporación genómica y la expresión de material genético (p. ej., ADN).

[0035] Tal como se entiende en el presente documento, un ácido nucleico está «ligado de forma operativa» con otra secuencia de ácidos nucleicos cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un promotor o potenciador se encuentra ligado de forma operativa a una secuencia que

codifica nucleótidos si el promotor afecta a la transcripción de la secuencia codificante. Un sitio de unión al ribosoma puede estar ligado de forma operativa a una secuencia codificante si se sitúa de forma que facilite la traducción de la secuencia codificante. Normalmente, las secuencias de ADN «ligadas de forma operativa» son contiguas. No obstante, los potenciadores no tienen por qué ser contiguos. La unión se consigue mediante ligadura en sitios de restricción convenientes. Si no existen dichos sitios, se pueden utilizar adaptadores o conectores oligonucleotídicos sintéticos según la práctica convencional.

[0036] Tal como se utiliza en el presente documento, el término «recombinante», al utilizarse en referencia a una célula, indica normalmente que la célula se ha modificado mediante la introducción de una secuencia de ácidos nucleicos heterólogos o que la célula se deriva de una célula modificada de esta manera. Por ejemplo, una célula recombinante puede comprender un gen que no se encuentre de forma idéntica en la forma nativa (no recombinante) de la célula, o una célula recombinante puede comprender un gen nativo (encontrado en la forma nativa de la célula), pero que haya sido modificado y reintroducido en la célula. Una célula recombinante puede comprender un ácido nucleico endógeno a la célula que haya sido modificado sin extraer el ácido nucleico de la célula; dichas modificaciones incluyen las obtenidas por sustitución genética, mutación de sitio específico y técnicas relacionadas conocidas por los expertos en la materia. El ADN recombinante (ADNr) es una forma de ADN artificial que se crea al combinar dos o más secuencias de nucleótidos que normalmente no aparecerían juntas mediante el proceso de corte y empalme de genes. La tecnología de ADN recombinante incluye técnicas para la producción de ADN recombinante *in vitro* y la transferencia del ADN recombinante a células donde pueda expresarse o propagarse, produciendo así un polipéptido recombinante.

[0037] En el sentido en que se usan en la presente memoria, el término «amplificación» de genes o del ácido nucleico hace referencia a un proceso mediante el cual se replican de manera desproporcionada secuencias de ADN específicas, de modo que el gen o el ácido nucleico amplificado se hace presente en un número mayor de copias que el que estaba presente al principio en el genoma. La selección de células por cultivo en presencia de un fármaco (p. ej., un inhibidor de una enzima que puede inhibirse) puede dar como resultado la amplificación bien del gen endógeno que codifica el producto génico necesario para el cultivo en presencia del fármaco, bien la amplificación de secuencias exógenas (p. ej., entrada) que codifican este producto génico o de ácido nucleico, o ambas.

[0038] Tal como se utiliza en el presente documento, el término «cebador» se refiere a un oligonucleótido (un polímero de residuos nucleotídicos), bien de origen natural, como en una digestión de restricción purificada, bien producido de forma sintética, que es capaz de actuar como punto de iniciación de síntesis cuando se pone en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión de cebador que es complementario a una cadena de ácido nucleico (esto es, en presencia de nucleótidos y un agente inductor como ADN polimerasa y a una temperatura y un pH adecuados). Un cebador es preferentemente monocatenario para una eficacia máxima en la amplificación, pero de manera alternativa puede ser bicatenario. Si es bicatenario, en primer lugar se trata el cebador para separar sus cadenas antes de utilizarse para preparar productos de extensión. El cebador puede comprender un oligodesoxirribonucleótido. El cebador debe ser lo suficientemente largo para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia del agente inductor. La longitud exacta de un cebador dependerá de una variedad de factores, entre los que se incluye la temperatura, fuente de cebador y el uso del método.

[0039] Tal como se utiliza en el presente documento, el término «sonda» se refiere a un oligonucleótido, bien de origen natural, como en una digestión de restricción purificada, bien producido de forma sintética, de forma recombinante o mediante amplificación por PCR, que es capaz normalmente de hibridar con otro oligonucleótido de interés. Una sonda puede ser monocatenaria o bicatenaria. Las sondas resultan de utilidad en la detección, identificación y aislamiento de secuencias de genes concretas. Se contempla que cualquier sonda usada en la presente invención estará marcada con cualquier «molécula informadora» de modo que sea detectable en cualquier sistema de detección, entre los que se incluyen, sin carácter limitativo, sistemas enzimáticos (por ejemplo, ELISA, así como ensayos histoquímicos basados en enzimas), fluorescentes, radiactivos y luminiscentes. No se pretende que la invención esté limitada a ningún sistema de detección ni marca en concreto.

[0040] En el sentido en que se usa en la presente memoria, el término «reacción en cadena de la polimerasa» (PCR, por sus siglas en inglés) hace referencia a los métodos de los documentos de patente U.S. 4,683,195 4,683,202, y 4,965,188, que incluyen métodos para aumentar la concentración de un segmento de una secuencia diana en una mezcla de ADN genómico sin clonación ni purificación. Este proceso para amplificar la secuencia diana se conoce bien en la técnica.

[0041] Tal como se utiliza en el presente documento, el término «reactivos de amplificación» se refiere a aquellos reactivos (p. ej., desoxirribonucleótidos trifosfatos, tampón, etc.), necesarios para la amplificación salvo los cebadores, el molde de ácido nucleico y la enzima de amplificación. Normalmente, los reactivos de amplificación junto con los demás componentes de reacción están dispuestos y contenidos en un recipiente de reacción (tubo de ensayo, micropocillo, etc.).

[0042] Tal como se utiliza en el presente documento, los términos «endonucleasa de restricción» o «enzima de restricción» se refieren a una enzima (p. ej., una enzima bacteriana) que es capaz de cortar ADN monocatenario

o bicatenario en una secuencia específica de nucleótidos conocida como sitio de restricción, o cerca de la misma. La secuencia nucleotídica que comprende el sitio de restricción es reconocida y escindida por una endonucleasa de restricción o enzima de restricción determinada y, con frecuencia, es el sitio de inserción de fragmentos de ADN. Un sitio de restricción puede convertirse en un vector de expresión o constructo de ADN.

- 5 **[0043]** Como se conoce en el ámbito de especialización, una secuencia de ADN puede ser transcrita mediante una ARN polimerasa para producir una secuencia de ARN, pero una secuencia de ARN puede ser retrotranscrita mediante retrotranscriptasa para producir una secuencia de ADN.

10 **[0044]** «Cepa huésped» o «célula huésped» se refieren a un huésped adecuado para un vector de expresión que comprende una secuencia de ADN de interés. Una secuencia de ADN de interés puede expresar una proteína de interés en la cepa huésped o célula huésped.

15 **[0045]** Una «proteína» o «polipéptido» o «péptido» es una secuencia polimérica de residuos de aminoácidos. Un grupo carboxilo de un aminoácido está unido al grupo amino del otro. Los términos «proteína» y «polipéptido» y «péptido» pueden utilizarse indistintamente en el presente documento. Un péptido comprende dos o más aminoácidos. Los péptidos contienen normalmente menos aminoácidos que los polipéptidos o proteínas. A lo largo de la presente exposición, se utiliza el código de una y tres letras para los aminoácidos tal como se define de conformidad con la comisión conjunta de nomenclatura bioquímica (JBCN, por sus siglas en inglés) de la IUPAC-IUB. Una única letra X hace referencia a cualquiera de los veinte aminoácidos. Se comprenderá también que se puede codificar un polipéptido mediante más de una secuencia de nucleótidos debido a la degeneración del código genético.

20 **[0046]** Al describir las variantes de enzimas, se utiliza normalmente la siguiente nomenclatura para mayor facilidad de referencia: Aminoácido(s) original(es):posición(es):aminoácido(s) sustituido(s). Se emplea la abreviatura de aminoácidos de tres letras o de una letra aceptada por la IUPAC. La letra «X» hace referencia a cualquier residuo de aminoácidos. No obstante, cuando está en el contexto de una sustitución de aminoácido (por ejemplo, «X003C»), debe entenderse que «X» hace referencia a un residuo de aminoácidos distinto del residuo de aminoácido que es resultado de la sustitución (por ejemplo, X es un residuo de aminoácido distinto de C). Las mutaciones se suelen nombrar con el código de una letra para el aminoácido original, seguido de un número de posición de aminoácido de uno o dos o tres dígitos en una secuencia de aminoácidos, y luego el código de una letra para la variante de aminoácido sustituida. Por ejemplo, la mutación del aminoácido glicina (G) en la posición de aminoácido 87 de una secuencia de aminoácidos sustituyéndolo por el aminoácido serina (S) para la glicina (G) se representa como «G087S» o «G87S». Normalmente, la sustitución de una glicina en la posición 2 con una treonina se representa como G002T; no obstante, esta sustitución también puede representarse como G02T o G2T. Uno o dos ceros («0») iniciales pueden incluirse simplemente para proporcionar una designación de tres números conveniente para cada posición de aminoácido. La posición de aminoácido «001» es la misma que «1» y por tanto «A001» es lo mismo que «A1C». «X001G» hace referencia a la sustitución de glicina (G) en una posición de aminoácidos 1 en una secuencia de aminoácidos, donde el aminoácido que debe reemplazarse por la glicina es cualquier aminoácido. Se indican múltiples mutaciones indicando insertando un «-» entre las mutaciones o utilizando un signo más («+») entre las mutaciones. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos en las posiciones de aminoácido 87 y 90 en una secuencia de aminoácidos se representan o bien como «G087S-A090Y» o «G87S-A90Y» o «G87S + A90Y» o «G087S + A090Y». Para deleciones, se utiliza el código de una letra «Z». Para una inserción en relación con la secuencia original, el código de una letra «Z» está a la izquierda del número de posición. Para una delección, el código de una letra «Z» está a la derecha del número de posición. Para inserciones, el número de posición es el número de posición anterior al aminoácido(s) insertado(s), más 0,01 por cada aminoácido. Por ejemplo, una inserción de tres aminoácidos alanina (A), serina (S) y tirosina (Y) entre la posición 87 y 88 se muestra como «Z087,01A-Z087,02S-Z087,03Y». Por tanto, una combinación de todas las mutaciones anteriores más una delección en la posición 100 sería: «G087S-Z087,01A-Z087,02S-Z087,03Y-A090Y-A100Z».

[0047] Una «prosecuencia» o «secuencia propeptídica» se refiere a una secuencia de aminoácidos entre la secuencia de péptido señal y la secuencia de proteasa madura que es necesaria para la secreción de la proteasa. La escisión de la prosecuencia o secuencia propeptídica da lugar a la proteasa activa madura.

50 **[0048]** Los términos «secuencia señal» o «péptido señal» se refieren a una secuencia de residuos de aminoácidos que pueden participar en la secreción o transporte directo de la forma precursora o madura de una proteína. La secuencia señal se ubica normalmente en el extremo N-terminal con respecto a la secuencia de proteínas precursora o madura. A la secuencia señal también se le puede hacer referencia como una secuencia líder. La secuencia señal puede ser endógena o exógena. Un ejemplo de secuencia señal exógena comprende los siete primeros residuos de aminoácidos de la secuencia señal de la subtilisina de *Bacillus subtilis* fusionada con lo restante de la secuencia señal de la subtilisina de *Bacillus lentus* (ATCC 21536). Normalmente, una secuencia señal está ausente de la proteína madura. Normalmente, una secuencia señal se escinde de la proteína mediante una peptidasa señal después de que la proteína se haya transportado.

60 **[0049]** El término «secuencia señal híbrida» se refiere a las secuencias señal en las que parte de la secuencia se obtiene del huésped de expresión fusionado con la secuencia señal del gen que se ha de expresar. Pueden utilizarse secuencias sintéticas.

[0050] El término forma «madura» de una proteína, polipéptido o péptido se refiere a la forma funcional de la proteína, el polipéptido o el péptido sin la secuencia de péptido señal ni la secuencia propeptídica.

[0051] El término forma «precursora» de una proteína o péptido se refiere a una forma madura de la proteína que presenta una prosequencia ligada de forma operativa al terminal amino o carbonilo de la proteína. El precursor también puede tener una secuencia «señal» ligada de forma operativa al extremo amino terminal de la prosequencia. El precursor también puede tener polinucleótidos adicionales que participen en la actividad posterior a la traducción (p. ej., polinucleótidos escindidos del mismo para dejar la forma madura de una proteína, polipéptido o péptido).

[0052] El término «natural», en referencia a una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácidos nucleicos, indica que la secuencia de aminoácidos o la secuencia de ácidos nucleicos es una secuencia nativa o de origen natural. Tal como se utiliza en el presente documento, el término «de origen natural» se refiere a cualquier cosa (p. ej., proteínas, aminoácidos, o secuencias de ácidos nucleicos) que se hallan en la naturaleza (por ejemplo, que no se han manipulado mediante métodos recombinantes o químicos). Tal como se entiende en el presente documento, el término «de origen no natural» se refiere a cualquier cosa que no se halle en la naturaleza (p. ej., ácidos nucleicos recombinantes o sintetizados químicamente producidos en el laboratorio).

[0053] Un residuo de aminoácidos en una secuencia de aminoácidos concreta puede numerarse por correspondencia con un residuo de aminoácidos en una posición de una secuencia de aminoácidos de referencia. Un residuo de aminoácido de una secuencia de aminoácidos de interés que esté en una posición que «se corresponde con» o es «correspondiente a» o en «correspondencia con» la posición de un residuo de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de referencia indica que el residuo de aminoácidos de la secuencia de interés se sitúa en una posición que es equivalente u homologa a la posición de un residuo de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de referencia. Un experto en la materia puede determinar si una posición de un residuo concreto en un polipéptido se corresponde con una posición de una secuencia de referencia homóloga. Por ejemplo, una variante de proteasa puede alinearse con la de una secuencia de referencia (por ejemplo, la secuencia de BPN' de la SEQ ID NO:2) utilizando técnicas conocidas. Las posiciones de los residuos de aminoácidos en la secuencia de referencia se utilizan para la numeración de los residuos de aminoácidos en la secuencia de interés. En consecuencia, los residuos de aminoácidos de la variante de proteasa pueden estar numerados según la numeración de la posición del residuo de aminoácido correspondiente de la secuencia de referencia. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos de la secuencia de referencia de la SEQ ID NO: 2 pueden utilizarse para determinar la numeración de la posición de los residuos de aminoácidos de cada residuo de aminoácidos de una variante de proteasa de interés.

[0054] Tal como se utiliza en el presente documento, «homología» se refiere a similitud o identidad de secuencia, prefiriéndose identidad. La homología puede determinarse utilizando técnicas estándar conocidas en el ámbito de especialización (véase, p.ej., Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 [1981]; Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 [1970]; Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 [1988]; programas de software como GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA del paquete de software Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin); y Devereux et al., Nucl. Acids Res. 12:387-395 [1984]). Un ejemplo de algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea un alineamiento múltiple de secuencias a partir de un grupo de secuencias relacionadas utilizando alineamientos progresivos por pares. También puede trazar un árbol que muestre las relaciones de agrupamiento utilizadas para crear el alineamiento. PILEUP utiliza una simplificación del método de alineamiento progresivo de Feng y Doolittle (Véase, Feng & Doolittle, J. Mol. Evol. 35:351-360 [1987]). El método es similar al descrito por Higgins y Sharp (véase, Higgins & Sharp, CABIOS 5:151-153 [1989]). Unos parámetros útiles de PILEUP incluyen un peso de hueco por defecto de 3.00, un peso de longitud de hueco por defecto de 0.10 y huecos de extremo ponderados. Otro ejemplo de algoritmo útil es el algoritmo BLAST, descrito por Altschul et al., (véase, Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 [1990]; y Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 [1993]). Un programa BLAST especialmente útil es el programa WU-BLAST-2 (véase, Altschul et al., Meth. Enzymol. 266:460-480 [1996]). WU-BLAST-2 utiliza varios parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales se establecen en los valores por defecto. Los parámetros ajustables se establecen con los siguientes valores: intervalo de solapamiento = 1, fracción de solapamiento = 0.125, umbral de palabra (T) = 11. Los parámetros HSP S y HSP S2 son valores dinámicos y son establecidos por el propio programa dependiendo de la composición de la secuencia concreta y de la composición de la base de datos concreta en la que se está buscando la secuencia de interés. No obstante, los valores pueden ajustarse para incrementar la sensibilidad.

[0055] El porcentaje de identidad de secuencia (% de identidad de secuencia o simplemente % de identidad) entre una secuencia polipeptídica objeto y una secuencia polipeptídica de referencia significa que la secuencia de aminoácidos objeto es idéntica en función de cada residuo de aminoácido por un porcentaje especificado a la secuencia polipeptídica de referencia sobre una longitud de comparación cuando las secuencias están alineadas de manera óptima, tal como se determina, por ejemplo, con un algoritmo de comparación de secuencias de aminoácidos o por inspección visual. El porcentaje de identidad de secuencia entre una secuencia de ácidos nucleicos objeto y una secuencia de ácidos nucleicos de referencia significa de manera similar que la secuencia de nucleótidos objeto es idéntica en función de cada residuo de ácido nucleico por un porcentaje especificado en

la secuencia nucleotídica de referencia sobre una longitud de comparación cuando las secuencias se alinean de manera óptima.

[0056] El porcentaje de identidad de secuencia (% de identidad de secuencia o simplemente % de identidad) entre una secuencia de referencia y una secuencia objeto de interés puede determinarse fácilmente por un experto en la materia. Puede determinarse el porcentaje de identidad compartido por dos secuencias polipeptídicas, por ejemplo, al comparar directamente los residuos de aminoácidos en cada secuencia alineando los residuos de las respectivas secuencias para una similitud máxima y al determinar el número de residuos de aminoácidos idénticos entre las secuencias utilizando un algoritmo de comparación de secuencias conocido en la técnica o mediante inspección visual. Las dos secuencias polipeptídicas alineadas de manera óptima pueden compararse con la longitud de la comparación y puede determinarse el número de posiciones en la alineación óptima en la que los residuos de aminoácidos idénticos ocurren en ambas secuencias polipeptídicas, proporcionando por tanto el número de posiciones emparejadas, y el número de posiciones emparejadas se divide después por el número total de posiciones en la longitud de la comparación. El número resultante se multiplica por 100 para obtener el porcentaje de identidad de la secuencia polipeptídica sujeto con respecto a la secuencia polipeptídica de referencia (o consulta). Puede determinarse de manera similar el porcentaje de identidad compartido por dos secuencias de ácidos nucleicos al comparar directamente los residuos de nucleótidos en cada secuencia alineando los residuos de las respectivas secuencias para una similitud máxima y al determinar el número de residuos de aminoácidos idénticos entre las secuencias de ácidos nucleicos utilizando un algoritmo de comparación de secuencias o mediante inspección visual. El porcentaje de identidad entre dos o más secuencias también puede describirse como que las secuencias son idénticas en un porcentaje concreto.

[0057] Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar la identidad de secuencia es el algoritmo BLAST, (véase Altschul, et al., J. Mol. Biol., 215:403-410 [1990]). El software para llevar a cabo los análisis BLAST está disponible públicamente en el National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo implica en primer lugar identificar pares de secuencias de alta puntuación (HSP, por sus siglas en inglés) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta que coinciden con o cumplen alguna puntuación umbral T con valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. Estas coincidencias de palabras iniciales próximas actúan como puntos de partida para encontrar pares de secuencias de alta puntuación más largas que las contengan. Las coincidencias de palabras se expanden en ambas direcciones a lo largo de cada una de las dos secuencias que se comparan hasta donde se pueda aumentar la puntuación de alineamiento acumulativa. La extensión de las coincidencias de palabras se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye en la cantidad X a partir de un valor máximo conseguido; la puntuación acumulativa es cero o inferior; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLAST utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 [1992]) alineamientos (B) de 50, expectación (E) de 10, M'5, N'-4, y una comparación de ambas cadenas.

[0058] El algoritmo BLAST realiza a continuación un análisis estadístico de la similitud entre las dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin & Altschul, *supra*). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que un emparejamiento entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos ocurriría al azar. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a un ácido nucleico que codifica una proteasa de la presente invención si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con respecto a un ácido nucleico que codifica una proteasa es inferior a aproximadamente 0,1, más preferiblemente inferior a aproximadamente 0,01 y siendo lo más preferible inferior a aproximadamente 0,001. Cuando el ácido nucleico de prueba codifica un polipéptido de proteasa, se lo considera similar a un ácido nucleico que codifica una proteasa concreto si la comparación tiene como resultado una probabilidad de suma más pequeña inferior a aproximadamente 0,5 y más preferiblemente inferior a aproximadamente 0,2.

[0059] Los términos «alineamiento óptimo» o «alineado/a(s) de forma óptima» se refieren al alineamiento de dos (o más) secuencias que tienen la puntuación más alta de porcentaje de identidad. Por ejemplo, el alineamiento óptimo de dos secuencias de polipéptidos puede obtenerse alineando de forma manual las secuencias de forma que se alinee el máximo número de residuos de aminoácidos idénticos en cada secuencia o utilizando programas de software o procedimientos descritos en el presente documento o conocidos en el ámbito de especialización. El alineamiento óptimo de dos secuencias de ácidos nucleicos puede obtenerse alineando de forma manual las secuencias de forma que se alinee el máximo número de residuos de nucleótidos idénticos en cada secuencia o utilizando programas de software o procedimientos descritos en el presente documento o conocidos en el ámbito de especialización.

[0060] Dos secuencias (por ejemplo, secuencias polipeptídicas) se consideran «alineadas de forma óptima» cuando se alinean utilizando parámetros definidos, como una matriz de sustitución de aminoácidos definida, una penalización por existencia de huecos (también denominada penalización por hueco abierto) y una penalización por extensión de huecos, con el fin de conseguir la máxima puntuación de identidad posible para dicho par de secuencias. La matriz de puntuación de BLOSUM62 (véase, Henikoff & Henikoff, *supra*) suele utilizarse como

matriz de sustitución de puntuación por defecto en algoritmos de alineamiento de secuencias de polipéptidos (p. ej., BLASTP). La penalización por existencia de huecos se impone para la introducción de un solo hueco de aminoácido en una de las secuencias alineadas, y la penalización por extensión de hueco se impone para cada posición de residuo en el hueco. Algunos ejemplos de parámetros de alineamiento utilizados son: Matriz de puntuación de BLOSUM62, penalización por existencia de hueco =11 y penalización por extensión de hueco =1. La puntuación del alineamiento se define por las posiciones de aminoácidos de cada secuencia en las que el alineamiento empieza y acaba (p. ej., la ventana de alineamiento), y opcionalmente por la inserción de un hueco o múltiples huecos en una o ambas secuencias, con el fin de conseguir la máxima puntuación de similitud posible.

10 **[0061]** El alineamiento óptimo entre dos o más secuencias puede determinarse manualmente mediante inspección visual o utilizando un ordenador, como por ejemplo, sin carácter limitativo, el programa BLASTP para secuencias de aminoácidos y el programa BLASTN para secuencias de ácidos nucleicos (véase, por ejemplo, Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402 (1997); véase también la página web del National Center for Biotechnology Information (NCBI)) o el programa CLUSTALW.

15 **[0062]** Puede decirse que un polipéptido de interés es «sustancialmente idéntico» a un polipéptido de referencia si el polipéptido de interés comprende una secuencia de aminoácidos presentando una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 99,5 % con respecto a la secuencia de aminoácidos del polipéptido de referencia. El porcentaje de identidad entre dos polipéptidos tales puede determinarse manualmente mediante la inspección de las dos secuencias polipeptídicas alineadas de forma óptima o utilizando programas de software o algoritmos (p. ej., BLAST, ALIGN, CLUSTAL) con parámetros estándar. Un indicativo de que dos polipéptidos son sustancialmente idénticos es que el primer polipéptido reacciona inmunitariamente de forma cruzada con el segundo polipéptido. Normalmente, los polipéptidos que difieren en sustituciones de aminoácidos conservadoras reaccionan inmunitariamente de forma cruzada. Por tanto, un polipéptido es sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren únicamente en una sustitución conservativa de aminoácidos o una o más sustituciones conservativas de aminoácidos.

20 **[0063]** Un ácido nucleico de interés puede decirse que es «sustancialmente idéntico» a un ácido nucleico de referencia si el ácido nucleico de interés comprende una secuencia de nucleótidos presentando una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 99,5 % con respecto a la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico de referencia. El porcentaje de identidad entre dos ácidos nucleicos tales puede determinarse manualmente mediante la inspección de las dos secuencias de ácidos nucleicos alineadas de forma óptima o utilizando programas de software o algoritmos (p. ej., BLAST, ALIGN, CLUSTAL) con parámetros estándar. Una indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas de ácidos nucleicos se hibridan entre sí en condiciones rigurosas (p. ej., dentro de un rango de rigurosidad media a elevada).

30 **[0064]** Tal como se utiliza en el presente documento, «aislado», haciendo referencia a un componente concreto de interés significa que ese componente está esencial o sustancialmente exento de otros componentes. Por ejemplo, un polipéptido «aislado» se refiere a que el polipéptido está esencial o sustancialmente exento de otros componentes, incluyendo, pero sin carácter limitativo, por ejemplo, otros polipéptidos y componentes celulares. Un ácido nucleico «aislado» se refiere a que el ácido nucleico está esencial o sustancialmente libre de otros componentes, incluyendo, pero sin carácter limitativo, otros ácidos nucleicos y componentes celulares. A los efectos de la presente solicitud, «aislado» se refiere a ácidos nucleicos o polipéptidos que no forman parte de una biblioteca (por ejemplo, una biblioteca de cribado).

45 **[0065]** La pureza y homogeneidad se determinan normalmente utilizando técnicas de química analítica, como la electroforesis en gel de poliacrilamida o la cromatografía de líquidos de alto rendimiento. Una proteína o ácido nucleico que es la especie predominante presente en una preparación se purifica de manera sustancial. El término «purificado» denota que un ácido nucleico o proteína da lugar a esencialmente una banda en un gel electroforético, eluato cromatográfico, y/o un medio sometido a una centrifugación por gradiente de densidad. En concreto, «purificado» significa que cuando está aislado, lo aislado contiene al menos un 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 99,5 % o más de ácidos nucleicos o proteínas por peso del aislado. Los polipéptidos purificados pueden obtenerse mediante un número de métodos, incluyendo, pero sin carácter limitativo, por ejemplo, síntesis en laboratorio, cromatografía (por ejemplo, cromatografía líquida de alto rendimiento), electroforesis preparativa, electroforesis en gel de poliacrilamida seguida de la visualización tras la tinción, centrifugación, precipitación, purificación por afinidad, etc. (véase, en general, R Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y. (1982), Deutscher, *Methods in Enzymol.*, Vol. 182: *Guide to Protein Purification*, Academic Press, Inc. N.Y. (1990)). La invención incluye polipéptidos purificados o aislados (por ejemplo, variantes de subtilisina o variantes de proteasa aisladas de la invención) y ácidos nucleicos purificados o aislados (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican variantes de proteasa, o variantes de subtilisina de la invención).

[0066] De forma relacionada, la invención proporciona métodos de enriquecimiento de composiciones para una o más moléculas de la invención, como uno o más polipéptidos de la invención (p. ej., una o más variantes de proteasas de la invención) o uno o más ácidos nucleicos de la invención (p. ej., uno o más ácidos nucleicos que codifican una o más variantes de proteasas de la invención). Una composición se enriquece para una molécula cuando hay un incremento sustancial en la concentración de la molécula después de aplicar una técnica de purificación o enriquecimiento. Un polipéptido o un ácido nucleico sustancialmente puro comprenderá normalmente al menos aproximadamente un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 %, un 99,5 % o más en peso (desde el punto de vista de la molaridad) de todas las especies macromoleculares en una composición concreta.

[0067] Tal como se utiliza en el presente documento, el término «mutagénesis combinatoria» se refiere a los métodos en los que se generan bibliotecas de variantes de ácidos nucleicos de una secuencia de ácidos nucleicos de referencia. En estas bibliotecas, las variantes contienen una o varias mutaciones escogidas de un conjunto de mutaciones predefinido. Los métodos también proporcionan medios para introducir mutaciones aleatorias que no pertenecían al conjunto de mutaciones predeterminado. Algunos de dichos métodos incluyen los expuestos en el documento U.S. 6,582,914. Algunos de dichos métodos de mutagénesis combinatoria incluyen y/o abarcan métodos puestos en práctica en kits comercializados (p. ej., el kit de mutagénesis dirigida de sitio múltiple QUIKCHANGE® (Stratagene)).

[0068] Tal como se utiliza en el presente documento, que presenta «propiedades mejoradas», utilizado en relación con una variante de proteasa se refiere a una variante de proteasa que presenta propiedades mejoradas en comparación con una proteasa original o de referencia. Las variantes de proteasas de la invención pueden exhibir una o más de las siguientes propiedades: actividad proteolítica mejorada o potenciada, estabilidad mejorada o potenciada, habilidad para limpiar una superficie o artículo mejorada o potenciada, rendimiento de limpieza mejorado o potenciado, rendimiento de lavado de la colada o de tejidos mejorado o potenciado, rendimiento de lavado de manos mejorado o potenciado, rendimiento de lavado de vajilla manual o a mano mejorado o potenciado, rendimiento de lavado de vajilla automático mejorado o potenciado, rendimiento de lavado de colada mejorado o potenciado, en comparación con una proteasa original o proteasa de referencia de interés.

[0069] Según se utiliza en el presente documento, el término «ensayo funcional» se refiere a un ensayo que proporciona un indicio de la actividad de una proteína. El término se refiere normalmente a sistemas de ensayo en los que se analiza la capacidad de una proteína para funcionar en su rendimiento habitual. Por ejemplo, en el caso de las enzimas, un ensayo funcional conlleva la determinación de la efectividad de la enzima para catalizar una reacción.

[0070] El término «propiedad» o equivalentes gramaticales del mismo, en el contexto de una molécula, puede referirse a cualquier característica o atributo de la molécula que puede seleccionarse o detectarse. Por ejemplo, en el contexto de un polipéptido, una propiedad puede ser una actividad enzimática (por ejemplo, actividad proteolítica, estabilidad u otra propiedad).

[0071] Una secuencia de ácidos nucleicos «mutante» se refiere normalmente a una secuencia de ácidos nucleicos que tiene una alteración en al menos un codón presente en una secuencia natural de la célula huésped de forma que el producto de expresión de la secuencia de ácidos nucleicos mutante es una proteína con una secuencia de aminoácidos alterada en comparación con la proteína natural. El producto de expresión puede tener una capacidad funcional alterada (p. ej., actividad enzimática potenciada).

[0072] Tal como se entiende en el presente documento, el término «carga neta» se define como la suma de todas las cargas presentes en una molécula. Pueden hacerse «cambios de carga neta» a una molécula de una proteína original para proporcionar una variante de proteína que presente una carga neta que difiera de la de la molécula de proteína original (es decir, la variante tiene una carga neta que no es igual que la de la molécula original). Por ejemplo, la sustitución de un aminoácido neutro de una proteína por un aminoácido con carga negativa o la sustitución de un aminoácido con carga positiva de una proteína por un aminoácido neutro da como resultado una carga neta de -1 con respecto a la proteína sin modificar. La sustitución de un aminoácido con carga positiva de una proteína por un aminoácido con carga negativa da como resultado una carga neta de -2 con respecto a la proteína sin modificar. La sustitución de un aminoácido neutro de una proteína por un aminoácido con carga positiva o la sustitución de un aminoácido con carga negativa de una proteína por un aminoácido neutro da como resultado una carga neta de +1 con respecto a la original. La sustitución de un aminoácido con carga negativa de una proteína por un aminoácido con carga positiva da como resultado una carga neta de +2 con respecto a la proteína sin modificar. La carga neta de una proteína original también puede alterarse mediante delección y/o inserción de uno o más aminoácidos con carga.

[0073] Los términos «térmicamente estable» y «termoestable» y «termoestabilidad», en referencia a un polipéptido indica que el polipéptido es resistente a un cambio permanente en su actividad causado solo por calor, como, por ejemplo, por la exposición a una temperatura más alta. Por ejemplo, una enzima térmicamente estable significa que la enzima es resistente a un cambio permanente en su actividad enzimática causada solo por calor, como, por ejemplo, mediante la exposición a una temperatura más alta. Normalmente, una proteasa que es térmicamente estable es capaz de retener al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más de su actividad enzimática después de la exposición a una temperatura más alta.

95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de su actividad proteolítica tras la exposición a temperaturas aumentadas durante un periodo de tiempo determinado, es decir, al menos aproximadamente 60 minutos, 120 minutos, 180 minutos, 240 minutos, 300 minutos, etc.

5 **[0074]** La actividad de limpieza de un polipéptido o una proteasa puede hacer referencia a un rendimiento de limpieza conseguido por una proteasa. La actividad de limpieza puede determinarse utilizando varios ensayos para limpiar una o más de varias manchas sensibles a las enzimas de un objeto, artículo o superficie (por ejemplo, una mancha que resulta de comida, hierba, sangre, tinta, sangre/leche/tinta, leche/aceite/pigmento, yema de huevo, leche, aceite, y/o proteína de huevo). El rendimiento de limpieza de un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido de la invención (como una variante de proteasa) o un polipéptido de referencia (por ejemplo, una proteasa de referencia) puede determinarse sometiendo la mancha del artículo, objeto o superficie a condiciones de lavado estándar y evaluando la medida en la que se elimina la mancha utilizando varias metodologías cromatográficas, espectrofotométricas u otras metodologías cuantitativas. En la técnica se conocen ejemplos de métodos y ensayos de limpieza, e incluyen, aunque sin carácter limitativo, los descritos en el documento WO 99/34011 y en el documento de patente estadounidense n.º 6,605,458, así como los métodos y ensayos de limpieza incluidos en los Ejemplos proporcionados más adelante.

20 **[0075]** El término «cantidad de limpieza efectiva» de una variante de proteasa o proteasa de referencia se refiere a la cantidad de proteasa que alcanza un nivel deseado de actividad enzimática en una composición de limpieza específica. Un experto en la materia determina fácilmente dichas cantidades efectivas, que se fundamentan en muchos factores, como la proteasa concreta utilizada, la aplicación de limpieza, la composición específica de la composición de limpieza, y en si se necesita una composición líquida o seca (p. ej., granulada, pastillas, de barra), etc.

25 **[0076]** El término «material de limpieza adjunto» se refiere a cualquier material líquido, sólido o gaseoso incluido en la composición de limpieza que no sea una variante de proteasa de la invención. Las composiciones de limpieza de la presente invención pueden incluir uno o más materiales de limpieza adjuntos. Cada material de limpieza adjunto se selecciona normalmente dependiendo del tipo y la forma concretos de la composición de limpieza (p. ej., composición líquida, granulada, en polvo, en barra, en pasta, en spray, en pastilla, en gel, en espuma u otra composición). Preferiblemente, cada material de limpieza adjunto es compatible con la enzima de proteasa utilizada en la composición.

30 **[0077]** El término «eficacia potenciada» en el contexto de actividad de limpieza se refiere a una actividad de limpieza mayor o incrementada por una enzima en determinadas manchas susceptibles a enzimas como las de huevo, leche, hierba, tinta, aceite y/o sangre, según se determina mediante una evaluación normal después de un ciclo de lavado estándar y/o múltiples ciclos de lavado.

35 **[0078]** El término «eficacia disminuida» en el contexto de actividad de limpieza se refiere a una actividad de limpieza menor o reducida por una enzima en determinadas manchas susceptibles a enzimas como las de huevo, leche, hierba o sangre, según se determina mediante una evaluación normal después de un ciclo de lavado estándar.

40 **[0079]** Tal como se entiende en el presente documento, el término «composición de limpieza institucional» se refiere a productos adecuados para su utilización en instituciones, incluyendo, pero sin carácter limitativo, colegios, hospitales, fábricas, almacenes, empresas, edificios, restaurantes, oficinas, complejos y edificios de oficinas, plantas de producción y/o procesamiento, hospitales veterinarios, explotaciones industriales, explotaciones ganaderas, etc.

45 **[0080]** Tal como se entiende en el presente documento, «productos de cuidado del hogar y de tejidos» se refiere a un producto o dispositivo que en general pretende ser utilizado o consumido en la forma en la que se vende y que es para tratar tejidos, superficies duras, y cualquier otra superficie en el área del cuidado del hogar y de tejidos, incluyendo: productos de cuidado del aire, incluyendo ambientadores y sistemas de administración de fragancias, cuidado del vehículo, lavado de vajilla, acondicionador para tejidos (incluyendo suavizantes y/o perfumadores), detergentes para la colada, cuidados y/o aditivos de lavado y aclarado, tratamiento y/o limpieza de superficies duras, incluyendo limpiadores para el suelo y de inodoros, y otros productos de limpieza para uso institucional y de consumo.

50 **[0081]** Tal como se entiende en el presente documento, los términos «composición de limpieza» y «formulación de limpieza» hacen referencia a las composiciones que son de utilidad para retirar compuesto(s) indeseado(s) de un artículo(s) que se ha de limpiar, como por ejemplo, pero sin carácter limitativo, tejidos, colada, platos, vajilla, lentes de contacto, otros sustratos sólidos, cabello (incluido de humano o de animal) (champús), piel (jabones, cosméticos y cremas), dientes (enjuagues, dentífricos), objetos para el cuidado del hogar y de no tejidos, filtros, membranas (por ejemplo, membrana de filtrado, incluyendo, pero sin carácter limitativo, membranas de ultrafiltración), superficies duras y otras superficies, incluyendo, pero sin carácter limitativo, por ejemplo, la superficie dura de una mesa (tablero o patas), pared, o cualquier otro mueble u objeto, suelo, techo, etc. Una composición de limpieza o formulación de limpieza puede ser útil en una aplicación de cuidado personal y/o en un artículo de cuidado personal, incluyendo, pero sin carácter limitativo, por ejemplo, champú (para lavar cabello humano o de animal); jabón, crema o cosméticos, (para la limpieza de la piel o el cuidado de la piel); enjuague

bucal (para cuidado oral); pasta de dientes (para lavar dientes y/o cuidado oral). Los términos abarcan cualquier material/compuesto seleccionado para el tipo concreto de composición o formulación de limpieza deseado y la forma del producto (por ejemplo, líquido, gel, gránulos, o composición de espray), siempre que la composición o formulación sea compatible con la proteasa y/u otra(s) enzima(s) utilizadas en la composición o formulación. La selección específica de los materiales de la composición o formulación de limpieza se realiza con facilidad al considerar la superficie, el objeto o el artículo (por ejemplo, un tejido) que va a ser limpiado, y la forma deseada de la composición o formulación para las condiciones de limpieza en el uso. En un aspecto, una composición o formulación de limpieza puede ser un producto de cuidado del hogar y de tejidos (por ejemplo, una composición de limpieza para lavar la colada). En otro aspecto, una composición o formulación de limpieza no es un producto de cuidado del hogar y de tejidos (por ejemplo, una composición de limpieza para limpiar lentes de contacto, cabello, dientes o piel, o útil para aplicaciones de cuidado personal y/o artículos de cuidado personal).

[0082] Las composiciones de limpieza y las formulaciones de limpieza incluyen cualquier composición que resulte adecuada para limpiar, blanquear, desinfectar y/o esterilizar cualquier objeto, artículo y/o superficie. Dichas composiciones y formulaciones incluyen, a modo de ejemplo y sin carácter limitativo, composiciones líquidas y/o sólidas, incluyendo composiciones de limpieza o detergentes (p. ej., composiciones detergentes para tejidos delicados y composiciones detergentes o de limpieza para ropa líquidas, en pastilla, en gel, en barra, granuladas y/o sólidas; composiciones y formulaciones de limpieza de superficies duras, tales como encimeras y ventanas de vidrio, madera, cerámica y metal; limpiadores de alfombras; limpiadores para hornos; ambientadores para tejidos; suavizantes para tejidos; y composiciones detergentes o de limpieza potenciadoras para la ropa y textiles, composiciones de limpieza aditivas para la ropa, y composiciones de limpieza de pretratado para la ropa; composiciones lavavajillas, incluyendo composiciones para el lavado de la vajilla de forma manual o a mano (p. ej., detergentes lavavajillas «manuales» o «a mano») y composiciones de lavavajillas automático (p. ej., «detergentes lavavajillas automáticos»).

[0083] Las composiciones de limpieza o formulaciones de limpieza incluyen, tal como se utilizan en el presente documento y a menos que se indique otra cosa, agentes de lavado potentes o multiusos en polvo o granulados, especialmente detergentes de limpieza; agentes de lavado multiusos en forma líquida, granulada, en gel, sólida, en pastillas o en pasta, en concreto los tipos denominados detergentes líquidos potentes (HDL, por sus siglas en inglés) o detergentes en polvo potentes (HDD, por sus siglas en inglés); detergentes líquidos para tejidos delicados; agentes para el lavado de la vajilla de forma manual o a mano, incluyendo los de tipo muy espumoso; agentes de lavavajillas a mano o manuales, de lavavajillas automáticos o para el lavado de artículos de vajilla o artículos de mesa, incluidos los varios tipos en pastillas, en polvo, sólidos, granulados, líquidos, en gel o de enjuague para uso doméstico o institucional; agentes desinfectantes y de limpieza líquidos, incluidos los tipos para el lavado de manos antibacteriano, barras de limpieza, enjuagues bucales, productos para la limpieza de dentaduras, champús para automóviles, para alfombras, limpiadores para el baño; artículos de cuidado personal, como por ejemplo, pero sin carácter limitativo, champús para el pelo y/o enjuagues de pelo para humanos (y otros animales); geles de ducha y baños de espuma, artículos para el cuidado de la piel, jabones para baño y para humanos personales; limpiadores de metales; así como productos auxiliares de limpieza, como aditivos blanqueadores y productos de tipo «antiadherencia de manchas» o de pretratamiento. Algunas composiciones granuladas se encuentran en forma «compacta»; algunas composiciones líquidas se encuentran en forma «concentrada».

[0084] En un aspecto, la invención proporciona una composición de limpieza o composición detergente comprendiendo al menos una variante de proteasa o polipéptido de la invención, donde la composición de limpieza o composición detergente es útil para limpiar lentes de contacto. En otro aspecto, la invención proporciona una composición de limpieza o composición detergente que comprende al menos una variante de proteasa o polipéptido de la invención, donde la composición de limpieza o composición detergente es útil en una aplicación para el cuidado personal. En otro aspecto, la invención proporciona una composición de limpieza o composición detergente comprendiendo al menos una variante de proteasa o polipéptido de la invención, donde la composición de limpieza o composición detergente es útil para lavar o enjuagar cabello, incluyendo cabello humano y/o de animales (por ejemplo, champú para cabello y/o productos para el aclarado del cabello). En otro aspecto, la invención proporciona una composición de limpieza o composición detergente comprendiendo al menos una variante de proteasa o polipéptido de la invención, donde la composición de limpieza o composición detergente es útil para lavar o tratar la piel (por ejemplo, piel humana y/o de animal) (por ejemplo, gel de ducha, espuma de baño, limpiadores para el cuidado de la piel, cosméticos, crema y/o jabón de baño). En otro aspecto, la invención proporciona una composición de limpieza o composición detergente comprendiendo al menos una variante de proteasa o polipéptido de la invención, donde la composición de limpieza o composición detergente es útil para limpiar dientes y/o dentaduras y/o para el cuidado oral. Tales composiciones de limpieza o composiciones detergentes pueden comprender al menos un ingrediente o portador adjunto, al menos una enzima adicional, al menos un mejorador, y/o al menos un tensioactivo, y pueden estar formuladas o en una forma apropiada para su uso. Tales composiciones detergentes o de limpieza pueden contener fosfatos o pueden estar exentas de fosfatos. En otro lugar del presente documento se proporcionan detalles adicionales en relación con las composiciones de la invención.

[0085] Tal como se utiliza en el presente documento, «composiciones de limpieza de tejidos» incluyen composiciones detergentes para el lavado de la colada a mano y a máquina, incluidas composiciones aditivas y composiciones adecuadas para su utilización en el remojo y/o el pretratamiento de tejidos manchados (p. ej., ropa, ropa de hogar y otros materiales textiles).

5 **[0086]** Tal como se utiliza en el presente documento, «composiciones de limpieza que no son para tejidos» incluyen composiciones para la limpieza de superficies no textiles (es decir, sin tejido), entre las que se incluyen, sin carácter limitativo, por ejemplo, composiciones detergentes para el lavado de la vajilla de forma automática, manual o a mano, composiciones de limpieza bucal, composiciones para la limpieza de dentaduras y composiciones de aseo personal.

10 **[0087]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término «composición detergente» o «formulación detergente» se emplea en referencia a una composición pensada para su uso en un medio de lavado para la limpieza de objetos sucios o manchados, incluyendo artículos u objetos concretos con tejido o sin tejido. Dichas composiciones de la presente invención no se limitan a ninguna composición o formulación detergente en concreto. De hecho, los detergentes de la invención pueden comprender al menos una variante de proteasa de la invención y, además, uno o más tensioactivos, transferasa(s), enzimas hidrolíticas, perhidrolasas, óxidorreductasas, mejoradores (como, por ejemplo, una sal mejoradora), agentes de blanqueado, activadores del blanqueado, agentes para teñir de azul, colorantes fluorescentes, inhibidores de aglomerantes, agentes secuestrantes, activadores de enzimas, antioxidantes y/o solubilizadores. En algunos casos, una sal mejoradora es una mezcla de una sal de silicato y una sal de fosfato, preferiblemente con más silicato (p. ej., metasilicato

15

20 **sódico**) que fosfato (p. ej., tripolifosfato sódico). Algunas composiciones de la invención, como, sin carácter limitativo, composiciones de limpieza o composiciones detergentes, no contienen ningún fosfato (p. ej., sal de fosfato o mejorador de fosfato).

[0088] Tal como se utiliza en la presente memoria, «composición de lavavajillas» designa todas las formas de las composiciones para lavar vajilla, incluida la cubertería, lo que incluye, sin carácter limitativo, formas granuladas y líquidas. En algunos aspectos, la composición de lavavajillas es una composición para «lavavajillas automático» que se utiliza en máquinas lavavajillas automáticas. No se pretende que la presente invención esté limitada a ningún tipo concreto de composición de lavavajillas. De hecho, la presente invención se utiliza para lavar artículos de vajilla (por ejemplo, platos, incluyendo, pero sin carácter limitativo, platos, copas, vasos, boles, etc.) y cubertería (por ejemplo, utensilios, incluyendo, pero sin carácter limitativo, cucharas, cuchillos, tenedores,

25

30 **utensilios para servir, etc.)** de cualquier material, incluyendo, pero sin carácter limitativo, cerámica, plástico, metales, porcelana, cristal, acrílico, etc. El término «artículos de vajilla» se utiliza en el presente documento haciendo referencia a la vajilla y la cubertería.

[0089] Tal como se utiliza en el presente documento, el término «blanqueado» se refiere al tratamiento de un material (p. ej., tejido, colada, pasta, etc.) o una superficie durante un período de tiempo suficiente y/o en condiciones de pH y/o temperatura adecuadas para efectuar un abrillantado (esto es, un blanqueado) y/o limpiar el material. Entre los ejemplos de sustancias químicas adecuadas para el blanqueo se incluyen, aunque sin carácter limitativo, por ejemplo, ClO_2 , H_2O_2 , perácidos, NO_2 , etc.

35

[0090] Tal como se utiliza en el presente documento, el «rendimiento de lavado» de una proteasa (p. ej., una variante de proteasa de la invención) se refiere a la contribución de una variante de proteasa al lavado que proporciona un rendimiento de limpieza adicional al detergente en comparación con el detergente sin la adición de la variante de proteasa a la composición. El rendimiento de lavado se compara en condiciones de lavado pertinentes. En algunos sistemas de prueba, otros factores pertinentes, como la composición detergente, la concentración de espuma, la dureza del agua, el mecanismo de lavado, el tiempo, el pH y/o la temperatura pueden ser controlados de tal forma que se imite(n) la(s) condición(es) típica(s) para la aplicación doméstica en un determinado segmento de mercado (p. ej., lavado de la vajilla de forma manual o a mano, lavado de la vajilla de forma automática, limpieza de artículos de vajilla, limpieza de artículos de mesa, limpieza de tejidos, etc.).

40

45

[0091] El término «condiciones de lavado pertinentes» se utiliza en el presente documento para indicar las condiciones, en concreto la temperatura de lavado, el tiempo, el mecanismo de lavado, la concentración de espuma, el tipo de detergente y la dureza del agua, que se utilizan en el ámbito doméstico en un sector de mercado de lavado de vajilla a mano, lavado de vajilla automático o detergente para la ropa.

50

[0092] El término «eficacia de lavado mejorada» se utiliza para indicar que se obtiene un mejor resultado final en la eliminación de manchas en condiciones de lavado relevantes, o que se necesita una cantidad de menor de variante de proteasa, desde el punto de vista del peso, para obtener el mismo resultado final en comparación con la proteasa original inicial o natural.

55 **[0093]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término «desinfección» se refiere a la eliminación de contaminantes de las superficies, así como la inhibición o destrucción de microbios en las superficies de los artículos. No se pretende que la presente invención esté limitada a ninguna superficie ni artículo en concreto ni a contaminante(s) o microbios que van a eliminarse.

[0094] La forma «compacta» de las composiciones de limpieza del presente documento se refleja de la mejor forma por la densidad y, en lo que respecta a la composición, por la cantidad de sal de relleno inorgánica. Las

60

sales de relleno inorgánicas son ingredientes convencionales de las composiciones de detergentes en polvo. En composiciones detergentes convencionales, las sales de relleno se encuentran presentes en cantidades considerables, normalmente de aproximadamente un 17 % a aproximadamente un 35 % en peso de la composición total. En cambio, en composiciones compactas, la sal de relleno se encuentra presente en cantidades que no superan aproximadamente un 15 % de la composición total. La sal de relleno se encuentra presente en cantidades que no exceden aproximadamente un 10 % o, más preferiblemente, aproximadamente un 5 % en peso de la composición. Las sales de relleno inorgánicas se pueden seleccionar de las sales alcalinas y las sales metálicas alcalinotérreas de sulfatos y cloruros. La sal de relleno puede ser sulfato de sodio.

[0095] La posición de un residuo de aminoácido en una secuencia de aminoácidos determinada se numera normalmente en el presente documento utilizando la numeración de la posición del residuo de aminoácido correspondiente de la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* mostrada en SEQ ID NO:2. Por tanto, la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* de la SEQ ID NO:2 sirve como secuencia de referencia. Una determinada secuencia de aminoácidos, como una secuencia de aminoácidos de una variante de proteasa descrita en el presente documento, puede alinearse con la secuencia de BPN' (SEQ ID NO:2) utilizando un algoritmo de alineamiento como se describe aquí, y un residuo de aminoácido de la secuencia de aminoácidos dada que se alinea (preferiblemente, se alinea de forma óptima) con el residuo de aminoácido de la secuencia BPN' puede numerarse de forma conveniente por referencia al residuo de aminoácido correspondiente de secuencia de la subtilisina BPN'.

[0096] Por lo general, la nomenclatura utilizada en el presente documento y muchos de los procedimientos de laboratorio de cultivo celular, genética molecular, biología molecular, química de ácidos nucleicos y química de proteínas descritos a continuación son ampliamente conocidos y comúnmente empleados por los expertos en la materia. Los expertos en la materia conocen métodos para la producción y manipulación de métodos de ácidos nucleicos recombinantes, síntesis de ácidos nucleicos, métodos de cultivo celular, e incorporación de transgenes (p. ej., transfección, electroporación), y se describen en numerosos textos estándar. Las etapas de síntesis y purificación de oligonucleótidos se realizan normalmente según la memoria. Las técnicas y los procedimientos se realizan por lo general según métodos convencionales ampliamente conocidos en el ámbito de especialización y varias referencias generales que se proporcionan a lo largo del presente documento. Se considera que dichos procedimientos son ampliamente conocidos por los expertos en la materia y se proporcionan para comodidad del lector.

[0097] Se da a conocer un producto de cuidado del hogar y de tejidos que puede comprender una proteasa (incluida una variante de proteasa), incluyendo una o más variantes de proteasas de la invención y un material seleccionado del grupo que consiste en un encapsulado que comprende un perfume, un agente matificante, un polímero de limpieza anfífilo y mezclas de los mismos, con el resto de cualquiera de los aspectos de la composición mencionada anteriormente hecho de uno o más materiales auxiliares. En un aspecto del producto de cuidado del hogar y de tejidos mencionado anteriormente, dicho producto de cuidado del hogar y de tejidos puede comprender, en función del peso total del producto de cuidado del hogar y de tejidos, de aproximadamente un 0,005 por ciento en peso (0,0005 % en peso) a aproximadamente un 0,1 % en peso, de aproximadamente un 0,001 % en peso a aproximadamente un 0,05 % en peso, o incluso de aproximadamente un 0,002 % en peso a aproximadamente un 0,03 % en peso de dicha proteasa. En un aspecto del producto de cuidado del hogar y de tejidos mencionado anteriormente, dicho producto de cuidado del hogar y de tejidos puede comprender, en función del peso total del producto de cuidado del hogar y de tejidos, de aproximadamente un 0,00003 % en peso a aproximadamente un 0,1 % en peso, de aproximadamente un 0,00008 % en peso a aproximadamente un 0,05 % en peso, o incluso de aproximadamente un 0,0001 % en peso a aproximadamente un 0,04 % en peso de agente matificante de tejidos. En un aspecto del producto de cuidado del hogar y de tejidos mencionado anteriormente, dicho producto de cuidado del hogar y de tejidos puede comprender, en función del peso total del producto de cuidado del hogar y de tejidos, de aproximadamente un 0,001 % en peso a aproximadamente un 5 % en peso, de aproximadamente un 0,01 % en peso a aproximadamente un 2 % en peso, o incluso de aproximadamente un 0,03 % en peso a aproximadamente un 0,5 % en peso de cápsulas de perfume. En un aspecto del producto de cuidado del hogar y de tejidos mencionado anteriormente, dicho producto de cuidado del hogar y de tejidos puede comprender, en función del peso total del producto de cuidado del hogar y de tejidos, de aproximadamente un 0,1 % en peso a aproximadamente un 5 % en peso, de aproximadamente un 0,25 % en peso a aproximadamente un 2,5 % en peso, o incluso de aproximadamente un 0,3 % en peso a aproximadamente un 1,5 % en peso de polímero de limpieza anfífilo.

Polipéptidos de la invención

[0098] La presente invención proporciona polipéptidos novedosos, a los que se puede hacer referencia de forma colectiva como «polipéptidos de la invención». Los polipéptidos de la invención incluyen variantes de proteasa que se no se hallan en la naturaleza, sustancialmente puras, recombinantes o aisladas, incluyendo, por ejemplo, polipéptidos de variantes de subtilisina proteasa, que presentan una actividad enzimática (por ejemplo, actividad proteolítica) y/o propiedades adicionales expuestas con más detalle en otro lugar del presente documento (por ejemplo, actividad de limpieza, estabilidad, etc.).

[0099] Como se ha indicado anteriormente, los polipéptidos de variantes de proteasas de la invención tienen actividades enzimáticas (p. ej., actividades proteolíticas) y, en consecuencia, son útiles en aplicaciones de limpieza, incluyendo, pero sin carácter limitativo, métodos para limpiar artículos de vajilla, artículos de mesa, tejidos y artículos que tengan superficies duras (p. ej., la superficie dura de una mesa, tablero, pared, mueble, suelo, techo, etc.). Algunos ejemplos de composiciones de limpieza que comprenden uno o más polipéptidos de variantes de proteasas de la invención se describen a continuación. La actividad enzimática (p. ej., la actividad de proteasa) de un polipéptido de variante de proteasa de la invención puede determinarse fácilmente utilizando procedimientos ampliamente conocidos por los expertos en la materia. Los ejemplos presentados a continuación describen métodos para evaluar la actividad enzimática, la eficacia de limpieza y/o la eficacia de lavado. La eficacia de las variantes de proteasas de la invención para eliminar manchas (p. ej., una mancha proteínica), limpiar superficies duras o lavar artículos de la colada, de la vajilla o de mesa puede determinarse fácilmente utilizando procedimientos ampliamente conocidos en el ámbito de especialización y/o utilizando procedimientos expuestos en los Ejemplos.

[0100] Un polipéptido de la invención puede someterse a varios cambios, como a una o más inserciones, deleciones y/o sustituciones de aminoácidos, ya sean conservativas o no conservativas, incluso cuando dichos cambios no alteren de manera considerable la actividad enzimática del polipéptido. De forma similar, un ácido nucleico de la invención también puede someterse a varios cambios, como una o más sustituciones de uno o más ácidos nucleicos en uno o más codones de forma que un codón concrete codifique el mismo o aminoácido o uno diferente, teniendo como resultado bien una variación silenciosa (p. ej., una mutación en una secuencia nucleotídica tiene como resultado una mutación silenciosa en la secuencia de aminoácidos, p. ej., cuando el aminoácido codificado no es alterado por la mutación del ácido nucleico) o una variación no silenciosa, una o más deleciones de uno o más ácidos nucleicos (o codones) en la secuencia, una o más adiciones o inserciones de uno o más ácidos nucleicos (o codones) en la secuencia, y/o la escisión de o uno o más truncamientos de uno o más ácidos nucleicos (o codones) en la secuencia. Muchos de estos cambios en la secuencia de ácido nucleico pueden no alterar de manera considerable la actividad enzimática de la variante de proteasa codificada resultante en comparación con la variante de proteasa codificada por la secuencia de ácido nucleico original. Un ácido nucleico de la invención también puede modificarse para incluir uno o más codones que proporcionen una expresión óptima en un sistema de expresión (p. ej., sistemas de expresión en bacterias), aunque, si se desea, dichos uno o más codones todavía codifiquen el/los mismo(s) aminoácido(s).

[0101] La presente invención incluye un género de polipéptidos que comprende polipéptidos de variantes de proteasas que tienen la actividad enzimática deseada (p. ej., actividad de proteasa o actividad de eficacia de limpieza) que comprenden secuencias que tengan las sustituciones de aminoácidos descritas en el presente documento y que también comprenden una o más sustituciones de aminoácidos adicionales, como sustituciones conservativas o no conservativas, donde el polipéptido exhibe, mantiene o mantiene de forma aproximada la actividad enzimática deseada (p. ej., actividad de proteasa o actividad de subtilisina, tal como se refleja en la actividad o en la eficacia de limpieza de la variante de proteasa). Las sustituciones de aminoácidos de acuerdo con la invención pueden incluir, aunque sin carácter limitativo, una o más sustituciones no conservativas de aminoácidos y/o una o más sustituciones conservativas de aminoácidos. Una sustitución de residuo de aminoácido conservativa conlleva normalmente el intercambio de un elemento dentro de una clase funcional de residuos de aminoácidos por un residuo que pertenece a la misma clase funcional (los residuos de aminoácidos idénticos se consideran funcionalmente homólogos o se conservan calculando el porcentaje de homología funcional). Una sustitución de aminoácido conservativa conlleva normalmente la sustitución de un aminoácido en una secuencia de aminoácidos con un aminoácido funcionalmente similar. Por ejemplo, la alanina, la glicina, la serina y la treonina son funcionalmente similares y, por consiguiente, pueden servir como sustituciones conservativas de aminoácidos entre sí. El ácido aspártico y el ácido glutámico pueden servir como sustituciones conservativas entre sí. La asparagina y la glutamina pueden servir como sustituciones conservativas entre sí. La arginina, la lisina y la histidina pueden servir como sustituciones conservativas entre sí. La isoleucina, la leucina, la metionina y la valina pueden servir como sustituciones conservativas entre sí. La fenilalanina, la tirosina y el triptófano pueden servir como sustituciones conservativas entre sí.

[0102] Pueden contemplarse otros grupos de sustituciones conservativas de aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos pueden agruparse por estructura química, composición o función similar (p. ej., ácidos, básicos, alifáticos, aromáticos, contenedores de sulfuro). Por ejemplo, un grupo alifático puede comprender: Glicina (G), Alanina (A), Valina (V), Leucina (L), Isoleucina (I). Otros grupos que contienen aminoácidos que se consideran sustituciones conservativas entre sí incluyen: aromáticos: Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); azufrados: metionina (M), cisteína (C); básicos: arginina (R), lisina (K), histidina (H); ácidos: Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); residuos sin carga no polares, Cisteína (C), Metionina (M) y Prolina (P); residuos sin carga hidrofílicos: serina (S), treonina (T), asparagina (N) y glutamina (Q). Los expertos en la materia conocen grupos adicionales de aminoácidos, y se describen en varios libros de texto convencionales. El listado de una secuencia polipeptídica en el presente documento, junto con los anteriores grupos de sustituciones, proporciona una relación expresa de todas las secuencias polipeptídicas sustituidas de manera conservativa.

[0103] Existen más sustituciones conservativas incluidas en las clases de residuos de aminoácidos descritas anteriormente, que pueden resultar adecuadas de manera alternativa o adicional. Los grupos de conservación

para sustituciones que sean más conservativas incluyen: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, y asparagina-glutamina. Por consiguiente, por ejemplo, la invención incluye un polipéptido de variante de proteasa recombinante o aislado (por ejemplo, una variante de subtilisina) que presenta actividad proteolítica, comprendiendo dicho polipéptido de variante de proteasa una secuencia de aminoácidos que presenta al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 99,5 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2. No se espera que una sustitución conservativa de un aminoácido por otro en la variante de proteasa de la invención altere de forma significativa la actividad enzimática o la actividad de eficacia de limpieza de la variante de proteasa. La actividad enzimática o la actividad de eficacia de limpieza de la proteasa resultante puede determinarse fácilmente utilizando ensayos estándar y los ensayos descritos en el presente documento.

[0104] La presente invención proporciona variantes de proteasa, incluyendo variantes de serina proteasa, que presentan una o más sustituciones en comparación con una serina proteasa de referencia. En un aspecto, la presente invención proporciona proteasas de agua fría. Además, la presente invención proporciona composiciones que comprenden una o más de estas variantes de proteasa, por ejemplo, variantes de serina proteasa. Una composición puede comprender al menos una de dichas variantes de proteasa de la invención y un ingrediente auxiliar, tal como se describe en otro lugar del presente documento. En un aspecto, la presente invención proporciona composiciones de limpieza que comprenden al menos una de estas variantes de proteasa, por ejemplo, variantes de serina proteasa. Una composición de limpieza puede ser una composición detergente. La tendencia en el lavado es utilizar temperaturas de lavado más bajas para ahorrar energía. Las enzimas presentan una actividad más baja a bajas temperaturas que resultan en un rendimiento de limpieza reducido. Existe la necesidad en la técnica de enzimas con un rendimiento potenciado en condiciones de lavado con agua fría sobre las que se conocen actualmente en la técnica. La presente invención aborda esta necesidad.

[0105] La presente invención proporciona composiciones de limpieza que comprenden al menos una variante de serina proteasa descrita en el presente documento, como una variante de subtilisina proteasa. La variante de subtilisina proteasa puede ser una variante de proteasa BPN'. Tal como se ha expuesto anteriormente con más detalle, la invención incluye una composición comprendiendo una variante de proteasa BPN' y una variante de proteasa GG36. Algunas variantes de proteasa, incluyendo, pero sin carácter limitativo, por ejemplo, variantes de subtilisina de la invención, son proteasas de agua fría. La composición de limpieza puede ser un detergente para la colada. El detergente para la colada puede ser un detergente que presente un pH de entre 3 y 11 (por ejemplo, entre pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 7,5, pH 8, pH 9, pH 10, pH 10,5, etc.), un detergente de agua fría, un detergente con un pH bajo (por ejemplo, pH 3-6), un detergente con pH neutro (por ejemplo, 6,5-7,5), un detergente con pH alcalino (por ejemplo, pH 9-11), o un detergente compacto. Un detergente puede incluir fosfato o ser sin fosfato. La composición de limpieza puede ser un detergente para lavar la vajilla. En un aspecto, el detergente para la vajilla es un detergente exento de fosfatos, mientras que en otro aspecto, el detergente para la vajilla es un detergente que contiene fosfatos. En un aspecto, la composición de limpieza de la invención comprende además al menos una enzima adicional, que puede seleccionarse de manera opcional del grupo de una metaloproteasa neutra, lipasa, cutinasa, amilasa, carbohidrasa, celulasa, pectinasa, mananasa, arabinasa, galactanasa, xilanasa, perhidrolasa, oxidasa y peroxidasa. También se proporcionan ácidos nucleicos aislados que codifican una variante de serina proteasa de la invención, vectores de expresión comprendiendo uno o más de tales ácidos nucleicos de la invención, y células huésped comprendiendo al menos un vector de expresión de la invención.

[0106] A lo largo de la memoria, para facilitar la referencia, un «conjunto de sustituciones de aminoácidos» o «conjunto de sustituciones» puede hacer referencia a un conjunto de múltiples sustituciones de aminoácidos (es decir, G097A+G128A+Y217Q) o un conjunto de una única sustitución de aminoácido (es decir, Y217Q). Por tanto, una variante de BPN' comprendiendo la secuencia de BPN' (SEQ ID NO:2) comprendiendo al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en G097A-G128A-Y217Q y Y217Q indica que la variante de BPN' comprende una secuencia de aminoácidos que comprende BPN'-G097A-G128A-Y217Q o BPN'-Y217Q.

[0107] La secuencia de aminoácidos de la variante de subtilisina proteasa BPN'-madura, que está expuesta en la SEQ ID NO:4, puede representarse como BPN'-G097A-G128A-Y217Q, que se refiere a la secuencia de aminoácidos de BPN' de la SEQ ID NO:2 con tres sustituciones G097A, G128A, y Y217Q. En este formato, cada guion (-) es equivalente a utilizar un signo más (+). Por tanto, BPN'-G097A-G128A-Y217Q puede escribirse de manera alternativa como BPN'+G097A+G128A+Y217Q. La secuencia de aminoácidos de la variante de subtilisina proteasa BPN'-v36 madura, que está expuesta en la SEQ ID NO:6, puede representarse como BPN'-S24G-S53G-S78N-S101N-G128A-Y217Q o BPN'+S24G+S53G+S78N+S101N+G128A+Y217Q. Las variantes de BPN' de la invención pueden representarse utilizando estos formatos.

[0108] La presente invención también proporciona composiciones para el lavado de la vajilla comprendiendo la(s) variante(s) de subtilisina, y las composiciones de limpieza de tejidos comprendiendo la(s) variante(s) de subtilisina. En algunos aspectos preferidos, las composiciones de limpieza de tejidos y de la vajilla comprenden además al menos una enzima adicional. En algunos aspectos preferidos, la enzima adicional se selecciona de entre: una proteasa (por ejemplo, una metaloproteasa neutra, una serina proteasa natural, o una segunda variante de serina proteasa), una lipasa, una cutinasa, una amilasa, una carbohidrasa, una celulasa, una pectinasa, una mananasa, una arabinasa, una galactanasa, una xilanasa, una perhidrolasa, una oxidasa, y una

peroxidasa. Asimismo, la presente invención proporciona métodos para el lavado de vajilla, comprendiendo los pasos de: proporcionar i) la composición para el lavado de la vajilla que comprende la variante de subtilisina, y ii) vajilla que necesita limpiarse; y poner en contacto la vajilla con la composición para el lavado de la vajilla en condiciones eficaces para proporcionar la limpieza de la vajilla. De manera similar, la presente invención proporciona métodos para el lavado de tejidos, comprendiendo los pasos de: proporcionar i) la composición para el lavado de tejidos que comprende la variante de subtilisina, y ii) colada que necesita limpiarse; y poner en contacto la colada con la composición para el lavado de tejidos en condiciones eficaces para proporcionar el lavado de tejidos. En aspectos adicionales, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica la variante, el vector de expresión que comprende el ácido nucleico aislado en combinación operable con un promotor, y/o se proporcionan células huésped que comprenden el vector de expresión.

[0109] La presente invención también proporciona composiciones de limpieza que comprenden las variantes de subtilisina proporcionadas en el presente documento. En un aspecto, las composiciones de limpieza comprenden un detergente líquido, en gel, en pastillas, en polvo, y/o granulado. En algunos aspectos adicionales, las composiciones de limpieza se seleccionan de entre detergentes para la colada y detergentes para la vajilla. En algunos aspectos preferidos, las composiciones de limpieza comprenden detergentes de la colada. En algunos aspectos preferidos en particular, las composiciones de limpieza son detergentes de uso intensivo. En algunos aspectos adicionales, las composiciones de limpieza comprenden detergentes para la vajilla seleccionados de entre detergentes para lavar la vajilla a mano y detergentes para lavavajillas automático. En algunos aspectos adicionales preferidos, las composiciones de limpieza proporcionadas en el presente documento comprenden además al menos un agente blanqueador. En algunos aspectos adicionales, las composiciones de limpieza proporcionadas en el presente documento están exentas de fosfatos, mientras que en algunos aspectos alternativos, las composiciones proporcionadas en el presente documento son detergentes que contienen fosfatos. En algunos otros aspectos adicionales, las composiciones de limpieza expuestas en el presente documento son detergentes de agua fría. En algunos aspectos adicionales, las composiciones de limpieza proporcionadas en el presente documento comprenden al menos una enzima adicional. En un aspecto, las composiciones de limpieza pueden comprender al menos una enzima adicional seleccionada del grupo que consiste en una hemicelulasa, celulasa, peroxidasa, proteasa, metaloproteasa, xilanas, lipasa, fosfolipasa, esterasa, perhidrolasa, cutinasa, pectinasa, pectato liasa, mananasa, queratinasa, reductasa, oxidasa, fenoloxidasa, lipoxigenasa, ligninasa, pululanasa, tanasa, pentosanasa, malanasa, β -glucanasa, arabinosidasa, hialuronidasa, condroitinasa, lacasa y amilasa; o mezclas de cualquiera de los mismos.

[0110] La presente invención también proporciona métodos para la limpieza, comprendiendo proporcionar un artículo que ha de ser limpiado y una composición que comprende al menos una composición proporcionada en el presente documento, y ponerlos en contacto con la composición, en condiciones eficaces para proporcionar la limpieza del artículo. En un aspecto, los métodos comprenden además la etapa de aclarar el artículo tras ponerlo en contacto con la composición de limpieza. En algunos aspectos preferidos, el artículo que ha de ser limpiado comprende artículos de vajilla. En algunos aspectos alternativos, el artículo que ha de ser limpiado comprende tejidos.

Ácidos nucleicos de la invención

[0111] La invención proporciona ácidos nucleicos aislados, de origen no natural o recombinantes (también denominados en el presente documento «polinucleótidos»), a los que se puede hacer referencia de forma colectiva como «ácidos nucleicos de la invención» o «polinucleótidos de la invención», que codifican polipéptidos (por ejemplo, variantes de proteasa) de la invención. Los ácidos nucleicos de la invención, incluyendo todos los que se describen a continuación, son útiles en la producción recombinante (p. ej., expresión) de polipéptidos de la invención, normalmente a través de la expresión de un vector de expresión plasmídico que comprende una secuencia que codifica el polipéptido de interés o fragmento del mismo.

[0112] El ácido nucleico puede comprender una secuencia polinucleotídica que presente al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia polinucleotídica expuesta en la SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5, o una secuencia polinucleotídica complementaria de la misma.

[0113] Los ácidos nucleicos de la invención pueden generarse utilizando cualquier técnica adecuada de síntesis, manipulación y/o aislamiento, o combinaciones de las mismas. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede producirse utilizando técnicas de síntesis de ácidos nucleicos estándar, como técnicas de síntesis en fase sólida que son ampliamente conocidas por los expertos en la materia. En dichas técnicas, normalmente se sintetizan fragmentos de hasta 50 o más bases nucleotídicas, que después se unen (p. ej., con métodos de ligadura química o enzimática, o métodos de recombinación mediante polimerasa) para formar básicamente cualquier secuencia de ácido nucleico continuada que se desee. La síntesis de los ácidos nucleicos de la invención también puede facilitarse (o conseguirse de forma alternativa) mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo, pero sin carácter limitativo, la síntesis química que utiliza el método de fosforamidita clásico (véase, p. ej., Beaucage et al. Tetrahedron Letters 22:1859-69 (1981)); o el método descrito en Matthes et al., EMBO J. 3:801-805 (1984), como se suele practicar en métodos sintéticos automatizados. Los ácidos nucleicos de la invención también se pueden producir utilizando un sintetizador de ADN automático.

Pueden adquirirse ácidos nucleicos personalizados a través de una variedad de fuentes comerciales, (p. ej., Midland Certified Reagent Company, Great American Gene Company, Operon Technologies Inc. y DNA2.0). En el ámbito de especialización se conocen otras técnicas para sintetizar ácidos nucleicos y principios relacionados (véase, p. ej., Itakura *et al.*, Ann. Rev. Biochem. 53:323 (1984); e Itakura *et al.*, Science 198:1056 (1984)).

- 5 **[0114]** Tal como se ha indicado anteriormente, las técnicas de ADN recombinante útiles para la modificación de ácidos nucleicos resultan ampliamente conocidas en el ámbito de especialización. Por ejemplo, técnicas como la digestión con endonucleasas de restricción, la ligadura, la transcripción inversa y la producción de ADNc, así como la reacción en cadena de la polimerasa (p. ej., PCR) resultan conocidas y las utilizan ampliamente los expertos en la materia. Los nucleótidos de la invención también pueden obtenerse cribando bibliotecas de ADNc
- 10 (p. ej., bibliotecas de ADNc generadas mediante técnicas de mutagénesis utilizadas en el ámbito de especialización, incluidas las descritas en el presente documento) utilizando una o más sondas de oligonucleótidos que puedan hibridarse con polinucleótidos que codifican un polipéptido(s) de variante de proteasa de la invención, o que puedan amplificarlos con PCR. Los procedimientos para cribar y aislar clones de ADNc y los procedimientos de amplificación mediante PCR resultan conocidos para los expertos en la materia y se describen en referencias generales conocidas por los expertos en la materia. Algunos ácidos nucleicos de la invención se pueden obtener alterando la estructura principal de un polinucleótido de origen natural (p. ej., que codifique una enzima o proteasa original) mediante, por ejemplo, un procedimiento de mutagénesis conocido (p. ej., mutagénesis de sitio dirigido, mutagénesis de saturación de sitio y recombinación *in vitro*).

- 20 **[0115]** Los ácidos nucleicos se hibridan debido a una variedad de fuerzas fisicoquímicas bien definidas, como un enlace de hidrógeno, exclusión de disolventes, apilamiento de bases y similares. Una guía extensa para la hibridación de ácidos nucleicos extensos se encuentra en P. Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes*, vol. 24, parte I, capítulo 2, «Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays», (Elsevier, N.Y.) (en lo sucesivo, «Tijssen»). Véase también Hames & Higgins (1995) *Gene Probes 1 & 2*. Un indicativo de que dos
- 25 secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas se hibridan entre sí al menos en condiciones rigurosas. Las condiciones rigurosas de hibridación en el contexto de los experimentos de hibridación de ácidos nucleicos, como las hibridaciones northern o Southern, dependen de la secuencia, y son distintas bajo distintos parámetros medioambientales diferentes. Se seleccionan normalmente condiciones de alta rigurosidad de manera que la hibridación ocurra a aproximadamente 5 °C o a menos del punto de fusión
- 30 térmica (T_m) para la secuencia específica a un pH y una fuerza iónica definidos. El T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50 % de la secuencia de prueba se hibrida con una sonda perfectamente emparejada. El T_m indica la temperatura a la que el dúplex de ácidos nucleicos se desnaturaliza al 50 % en las condiciones determinadas y se representa una medida directa de la estabilidad del híbrido de ácido nucleico. Por consiguiente, el T_m se corresponde con la temperatura que se corresponde con el punto
- 35 medio en la transición de hélice a espiral aleatoria; depende de la longitud, composición nucleotídica, y fuerza iónica para largos tramos de nucleótidos. En condiciones rigurosas, una sonda se hibridará normalmente a su subsecuencia diana, pero a ninguna otra secuencia. Se seleccionan «condiciones muy rigurosas» para ser iguales a el T_m para una sonda concreta.

- 40 **[0116]** El T_m de un dúplex ADN-ADN puede estimarse utilizando la ecuación (1): $T_m (^{\circ}\text{C}) = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 (\log_{10}M) + 0,41 (\% \text{ G+C}) - 0,72 (\% \text{ f}) - 500/n$, donde M es la molaridad de los cationes monovalentes (normalmente Na⁺), (% G+C) es el porcentaje de nucleótidos guanosina (G) y citosina (C), (% f) es el porcentaje de formamida y n es el número de bases nucleotídicas (es decir, la longitud) del híbrido. El T_m de un dúplex ARN-ADN puede estimarse utilizando la ecuación (2): $T_m (^{\circ}\text{C}) = 79,8^{\circ}\text{C} + 18,5 (\log_{10}M) + 0,58 (\% \text{ G+C}) - 11,8 (\% \text{ G+C})^2 - 0,56 (\% \text{ f}) - 820/n$, donde M es la molaridad de los cationes monovalentes (normalmente Na⁺), (% G+C) es el porcentaje de
- 45 nucleótidos guanosina (G) y citosina (C), (% f) es el porcentaje de formamida y n es el número de bases nucleotídicas (es decir, la longitud) del híbrido. Las ecuaciones 1 y 2 anteriores normalmente son precisas solo para dúplex híbridos de más de 100-200 nucleótidos. El T_m de secuencias de ácidos nucleicos de menos de 50 nucleótidos puede calcularse de la siguiente manera: $T_m (^{\circ}\text{C}) = 4\text{G+C} + 2(\text{A+T})$, donde A (adenina), C, T (timina), y G son los números de los nucleótidos correspondientes.

- 50 **[0117]** El material de ácido nucleico no hibridado normalmente se retira por una serie de lavados, cuya rigurosidad puede ajustarse dependiendo de los resultados deseados, en un análisis de hibridación. Unas condiciones de lavado poco rigurosas (por ejemplo, utilizar más sal y temperaturas más bajas) aumenta la sensibilidad, pero puede producir señales de hibridación no específicas y altas señales de fondo. Unas condiciones de lavado de mayor rigurosidad (por ejemplo, utilizar menos sal y una temperatura más alta que esté
- 55 más cerca de la temperatura de hibridación) disminuyen la señal de fondo, quedando normalmente solo la señal específica. Para más directrices adicionales, véase Hames & Higgins, *supra*.

- [0118]** Entre las condiciones rigurosas de ejemplo para el análisis de al menos dos ácidos nucleicos comprendiendo al menos 100 nucleótidos se incluye la incubación en una solución o en un filtro en una transferencia northern o Southern comprende formalina al 50 % (o formamida) con 1 miligramo (mg) de heparina
- 60 a 42 °C, con la hibridación llevándose a cabo durante toda la noche. Un lavado con una rigurosidad regular puede llevarse a cabo utilizando una solución que comprende 0,2x de tampón SSC de lavado a aproximadamente 65 °C durante aproximadamente 15 minutos (véase Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning*:

A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, y la tercera edición del mismo (2001) para una descripción de un tampón SSC). El lavado con una rigurosidad regular puede ir precedido por un lavado de baja rigurosidad para retirar las señales de la sonda de fondo. Un lavado con baja rigurosidad puede llevarse a cabo en, por ejemplo, una solución que comprende 2x de tampón SSC a aproximadamente 40 °C durante aproximadamente 15 minutos. Un lavado con alta rigurosidad puede llevarse a cabo utilizando una solución que comprende 0,15 M de NaCl a aproximadamente 75 °C durante aproximadamente 15 minutos. Entre las condiciones de rigurosidad moderada de ejemplo se incluyen una incubación durante toda la noche a 37 °C en una solución que comprende formalina al 20 % (o formamida), 0,5x de SSC, 50 mM de fosfato de sodio (pH 7,6), 5x de solución Denhardt, sulfato de dextrano al 10 %, y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado, seguido de un lavado de los filtros en 1x de SSC a aproximadamente 37-50 °C. Las condiciones de alta rigurosidad son condiciones que (a) utilizan una fuerza iónica baja y una temperatura alta para el lavado, como 0,015 M de cloruro sódico/0,0015 M de citrato de sodio/dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,1 % a 50 °C, (b) emplean un agente desnaturalizante durante la hibridación, como formamida, por ejemplo, formamida al 50 % (v/v) con albúmina de suero bovino (BSA) al 0,1 %/Ficol al 0,1 %/ polivinilpirrolidona (PVP) al 0,1 %/50 mM de tampón de fosfato de sodio con pH 6,5 con 750 mM de cloruro de sodio, 75 mM de citrato de sodio a 42 °C, o (c) emplean formamida al 50 %, 5x de SSC (0,75 M de NaCl, 0,075 M de citrato de sodio), 50 mM de fosfato de sodio (pH 6,8), 0,1 % de pirofosfato de sodio, 5x de solución Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1 %, y sulfato de dextrano al 10 % a 42 °C con lavados a (1) 42 °C en 0,2x de SSC, (2) a 55 °C en formamida al 50 %, y (3) a 55 °C en 0,1x de SSC (preferiblemente con EDTA). Una proporción de señal a sonido de x2 o de x2,5-x5 que se observó para una sonda sin relación en el ensayo de hibridación concreto indica una detección de una hibridación específica. La detección de al menos una hibridación rigurosa entre dos secuencias en el contexto de la presente invención indica una similitud estructural relativamente fuerte o una homología con un ácido nucleico de la invención.

Vectores, células y métodos para fabricar polipéptidos de variantes de proteasas de la invención

[0119] En el ámbito de especialización se conoce una variedad de métodos que son adecuados para generar polinucleótidos modificados de la invención que codifican variantes de proteasas de la invención (como proteasas de agua fría de la invención), entre los que se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., mutagénesis de saturación de sitio, mutagénesis de rastreo, mutagénesis de inserción, mutagénesis de delección, mutagénesis aleatoria, mutagénesis de sitio dirigido y evolución dirigida, así como otros varios enfoques de recombinación. Entre los métodos para fabricar polinucleótidos y proteínas modificadas (por ejemplo, variantes de proteínas) se incluyen metodologías de barajado de ADN (véase, por ejemplo, Stemmer WP, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(22):10747-51 (1994)); métodos basados en la recombinación no homóloga de genes, por ejemplo, ITCHY (Ostermeier et al., Bioorg. Med. Chem. 7:2139-44 [1999]); SCRATCHY (Lutz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:11248-53 [2001]); SHIPREC (Sieber et al., Nat. Biotechnol. 19:456-60 [2001]); NRR (Bittker et al., Nat. Biotechnol. 20:1024-9 [2001]; Bittker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:7011-6 [2004]); métodos que se basan en el uso de oligonucleótidos para insertar inserciones, delecciones y/o mutaciones aleatorias y dirigidas (Ness et al., Nat. Biotechnol. 20:1251-5 [2002]; Coco et al., Nat. Biotechnol. 20:1246-50 [2002]; Zha et al., Chembiochem. 4:34-9 [2003]; Glaser et al., J. Immunol. 149:3903-13 [1992]); véase también Arkin & Youvan, Biotechnology 10:297-300 (1992); Reidhaar-Olson et al., Methods Enzymol. 208:564-86 (1991).

[0120] En un aspecto, un polinucleótido original de longitud completa está ligado a un plásmido de expresión apropiado, y el siguiente método de mutagénesis se utiliza para facilitar la construcción de la proteasa modificada de la presente invención, aunque pueden utilizarse otros métodos. El método está basado en el descrito por Pisarchik et al. (Pisarchik et al., Prot. Eng. Des. Select. 20:257-265 [2007]). En un aspecto, se proporciona una ventaja añadida en que la enzima de restricción se escinde fuera de su secuencia de reconocimiento, lo que permite la digestión de prácticamente cualquier secuencia de nucleótidos e impide la formación de una cicatriz de sitio de restricción.

[0121] En un enfoque, un gen de origen natural que codifica una proteasa de longitud completa se obtiene y se secuencia y se examina para identificar uno o más puntos en los que se desea hacer una mutación (por ejemplo, delección, inserción, sustitución) en uno o más aminoácidos. La mutación del gen para cambiar su secuencia para conformar la secuencia deseada se consigue mediante una extensión del cebador de acuerdo con procedimientos conocidos en general. Los fragmentos a la izquierda y a la derecha del punto(s) deseado(s) de la mutación se amplifican por PCR y para incluir el sitio de restricción *Eam*1104I. Los fragmentos a la izquierda y a la derecha se digieren con *Eam*1104I para generar una pluralidad de fragmentos que presentan salientes de tres bases complementarias, que luego se acumulan y se ligan para generar una biblioteca de secuencias modificadas conteniendo una o más mutaciones. Este método evita la ocurrencia de desplazamientos del marco de lectura. Este método también simplifica el proceso de mutagénesis porque todos los oligonucleótidos pueden sintetizarse para tener el mismo sitio de restricción, y no son necesarios enlazadores sintéticos para crear los sitios de restricción, tal como se requiere en algunos otros métodos.

[0122] En otro aspecto, la invención proporciona un vector que comprende un ácido nucleico o polinucleótido de la invención. El vector puede ser un vector de expresión o casete de expresión en el que una secuencia polinucleotídica de la invención que codifica una variante de proteasa de la invención se encuentra ligada de forma operativa a uno o más segmento(s) de ácido nucleico necesario(s) para una expresión génica eficaz (p. ej.,

un promotor ligado de forma operativa al polinucleótido de la invención que codifica una variante de proteasa de la invención). Un vector puede incluir un terminador de la transcripción y/o un gen de selección, como un gen de resistencia a los antibióticos que permite el mantenimiento continuo en el cultivo de células huésped infectadas con plásmidos mediante el cultivo en medios antimicrobianos.

- 5 **[0123]** Un vector de expresión se puede derivar de ADN plasmídico o viral o, en aspectos alternativos, contener elementos de ambos. Algunos ejemplos de vectores incluyen, sin carácter limitativo, pXX, pC194, pJH101, pE194, pHP13 (Harwood & Cutting (eds.)), Molecular Biological Methods for *Bacillus*, John Wiley & Sons (1990), véase, p. ej., en el capítulo 3; los plásmidos de replicación adecuados para *B. subtilis* incluyen los listados en la pág. 92; Perego, M. (1993) Integrational Vectors for Genetic Manipulations in *Bacillus subtilis*, págs. 615-624; A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, & R. Losick (ed.), *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

- 15 **[0124]** Para la expresión y la producción de una proteína de interés (p. ej., variante de proteasa) en una célula, al menos un vector de expresión que comprende al menos una copia de un polinucleótido que codifica la proteasa modificada, y que preferiblemente comprende múltiples copias, se transforma en la célula en condiciones adecuadas para la expresión de la proteasa. En un aspecto, una secuencia polinucleotídica que codifica la variante de proteasa (así como otras secuencias incluidas en el vector) se integra en el genoma de la célula huésped, mientras que en otro aspecto, un vector plasmídico que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una variante de proteasa permanece como elemento extracromosómico autónomo en el interior de la célula. La invención proporciona tanto elementos de ácido nucleico extracromosómico como secuencias nucleotídicas entrantes que están integradas en el genoma de la célula huésped. Los vectores descritos en el presente documento resultan útiles para la producción de las variantes de proteasa de la invención. En un aspecto, un constructo polinucleotídico que codifica la variante de proteasa se encuentra presente en un vector de integración que permite la integración y, opcionalmente, la amplificación del polinucleótido que codifica la variante de proteasa en el cromosoma bacteriano. Los ejemplos de sitios de integración son ampliamente conocidos por los expertos en la materia. En un aspecto, la transcripción de un polinucleótido que codifica una variante de proteasa de la invención la lleva a cabo un promotor que es el promotor natural para la proteasa precursora seleccionada. En algunos otros aspectos, el promotor es heterólogo a la proteasa precursora, pero funcional en la célula huésped. Concretamente, entre los ejemplos de promotores adecuados para su uso en células huésped bacterianas se incluyen, a modo de ejemplo y sin carácter limitativo, los promotores amyE, amyQ, amyL, pstS, sacB, pSPAC, pAprE, pVeg, pHpall, el promotor del gen de amilasa maltogénica de *B. stearothermophilus*, el gen de amilasa (BAN) de *B. amyloliquefaciens*, el gen de proteasa alcalina de *B. subtilis*, el gen de proteasa alcalina de *B. clausii*, el gen de xilosidasa de *B. pumilis*, el cryIIIA de *B. thuringiensis* y el gen de alfa-amilasa de *B. licheniformis*. Entre los promotores adicionales se incluyen, sin carácter limitativo, el promotor A4, así como los promotores P_R o P_L de fago lambda, y los promotores lac trp o tac de *E. coli*.

- 35 **[0125]** Las variantes de proteasas de la invención se pueden producir en células huésped de cualquier microorganismo grampositivo adecuado, incluidos hongos y bacterias. Por ejemplo, en un aspecto, la variante de proteasa se produce en células huésped de origen fúngico y/o bacteriano. En un aspecto, las células huésped son *Bacillus sp.*, *Streptomyces sp.*, *Escherichia sp.* o *Aspergillus sp.* En algunos modos de realización, las variantes de proteasas son producidas por células huésped de *Bacillus sp.* Entre los ejemplos de células huésped de *Bacillus sp.* que son de utilidad en la producción de variantes de proteasas de la invención se incluyen, sin carácter limitativo, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. pumilis*, *B. thuringiensis*, *B. clausii*, *B. megaterium*, así como otros organismos del género *Bacillus*. En un aspecto, las células huésped de *B. subtilis* se utilizan para la producción de polipéptidos de serina proteasa. Las patentes de los Estados Unidos con número 45 5,264,366 y 4,760,025 (RE 34,606) describen varias cepas huésped de *Bacillus* que pueden utilizarse para producir variantes de proteasas de la invención, aunque puede utilizarse otras cepas adecuadas.

- [0126]** Varias cepas bacterianas industriales que pueden utilizarse para producir variantes de proteasas de la invención incluyen cepas de *Bacillus sp.* no recombinantes (esto es, naturales), así como variantes de cepas de origen natural y/o cepas recombinantes. En un aspecto, la cepa huésped es una cepa recombinante, donde un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés se ha introducido en el huésped. En un aspecto, la cepa huésped es una cepa huésped de *B. subtilis* y, en particular, una cepa huésped de *Bacillus subtilis* recombinante. Se conocen numerosas cepas de *B. subtilis*, entre las que se incluyen, a modo de ejemplo y sin carácter limitativo, las cepas 1A6 (ATCC 39085), 168 (1A01), SB19, W23, Ts85, B637, PB1753 a PB1758, PB3360, JH642, 1A243 (ATCC 39,087), ATCC 21332, ATCC 6051, M113, DE100 (ATCC 39,094), GX4931, PBT 110 y PEP 211 (véase, p. ej., Hoch et al., Genetics 73:215-228 (1973)) (véase también las patentes estadounidenses n.º 4,450,235 y 4,302,544, y el documento EP 0134048). El uso de *B. subtilis* como células huésped de expresión resulta muy conocido en la técnica (véase, p. ej., Palva et al., Gene 19:81-87 (1982); Fahnestock & Fischer, J. Bacteriol. 165:796-804 (1986); y Wang et al., Gene 69:39-47 (1988)).

- 60 **[0127]** En un aspecto, la célula huésped de *Bacillus* es un *Bacillus sp.* que incluye una mutación o delección en al menos uno de los siguientes genes: *degU*, *degS*, *degR* y *degQ*. La mutación puede ser en un gen *degU*, y en algunos ejemplos la mutación puede ser *degU(Hy)32*. Véase, p. ej., Msadek et al., J. Bacteriol. 172:824-834 (1990) y Olmos et al., Mol. Gen. Genet. 253:562-567 (1997)). Una cepa huésped habitual es una *Bacillus subtilis*

que porta una mutación *degU32(Hy)*. El huésped *Bacillus* puede comprender una mutación de aminoácidos (por ejemplo, sustitución) o delección en el *scoC4* (véase, por ejemplo, Caldwell et al., J. Bacteriol. 183:7329-7340 (2001)); *spoIIIE* (véase, por ejemplo, Arigoni et al., Mol. Microbiol. 31:1407-1415 (1999)); y/o *oppA* u otros genes del operón *opp* (véase, por ejemplo, Perego et al., Mol. Microbiol. 5:173-185 (1991)). De hecho, se contempla que cualquier mutación en el operón *opp* que cause el mismo fenotipo que una mutación en el gen *oppA* se utilizará en un aspecto de la cepa de *Bacillus* alterada de la invención. Tales mutaciones pueden darse por sí solas o pueden estar presentes en combinaciones de mutaciones. En un aspecto, una cepa de células huésped de *Bacillus* alteradas que puede utilizarse para producir una variante de proteasa de la invención es una cepa huésped de *Bacillus* que ya incluye una mutación en uno o más de los genes mencionados anteriormente. Además, son de utilidad las células huésped de *Bacillus* sp. que comprenden mutaciones y/o delecciones de genes de proteasa endógenos. La célula huésped de *Bacillus* puede comprender una delección de los genes *aprE* y *nprE*. La célula huésped de *Bacillus* sp. puede comprender una delección de 5 genes de proteasa, o la célula huésped de *Bacillus* sp. puede comprender una delección de 9 genes de proteasa (véase, p. ej., el documento de solicitud de patente estadounidense N.º 2005/0202535).

[0128] Las células huésped se transforman con al menos un ácido nucleico que codifica al menos una variante de proteasa de la invención utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Tanto si el ácido nucleico se incorpora en un vector como si se utiliza sin la presencia de ADN plasmídico, este se introduce normalmente en un microorganismo, en un aspecto, preferiblemente una célula de *E. coli* o una célula de *Bacillus* competente. Se conocen métodos para introducir un ácido nucleico (p. ej., ADN) en células de *Bacillus* o células de *E. coli* utilizando vectores o constructos de ADN plasmídico y transformando dichos vectores o constructos de ADN plasmídico en dichas células. En un aspecto, los plásmidos se aíslan posteriormente de células de *E. coli* y se transforman en células de *Bacillus*. No obstante, no es esencial utilizar microorganismos de intervención como *E. coli*, y en un aspecto, un vector o constructo de ADN se introduce directamente en un huésped de *Bacillus*.

[0129] Los expertos en la materia están bien informados de métodos adecuados para introducir secuencias de ácidos nucleicos o polinucleotídicas de la invención en células de *Bacillus* (véase, p. ej., Ferrari et al., «Genetics», en Harwood et al. (ed.), *Bacillus*, Plenum Publishing Corp. (1989), pp. 57-72; Saunders et al., J. Bacteriol. 157:718-726 (1984); Hoch et al., J. Bacteriol. 93:1925 -1937 (1967); Mann et al., Current Microbiol. 13:131-135 (1986); y Holubova, Folia Microbiol. 30:97 (1985); Chang et al., Mol. Gen. Genet. 168:11-115 (1979); Vorobjeva et al., FEMS Microbiol. Lett. 7:261-263 (1980); Smith et al., Appl. Env. Microbiol. 51:634 (1986); Fisher et al., Arch. Microbiol. 139:213-217 (1981); and McDonald, J. Gen. Microbiol. 130:203 (1984)). De hecho, dichos métodos como la transformación, incluyendo la transformación y la congregación de protoplastos, la transducción y la fusión de protoplastos, son ampliamente conocidos y adecuados para su utilización en la presente invención. Se utilizan métodos de transformación para introducir un vector o constructo de ADN que comprende un ácido nucleico que codifica una variante de proteasa de la invención en una célula huésped. Los métodos que se conocen en la técnica para transformar células de *Bacillus* incluyen métodos tales como la transformación de rescate de marcador plasmídico, que implica la absorción de un plásmido donador por parte de células competentes que portan un plásmido residente parcialmente homólogo (Contente et al., Plasmid 2:555-571 (1979); Haima et al., Mol. Gen. Genet. 223:185-191 (1990); Weinrauch et al., J. Bacteriol. 154:1077-1087 (1983); and Weinrauch et al., J. Bacteriol. 169:1205-1211 (1987)). En este método, el plásmido donante entrante se recombina con la región homóloga del plásmido «auxiliar» residente en un proceso que imita la transformación cromosómica.

[0130] Además de los métodos utilizados normalmente, en un aspecto, las células huésped se transforman directamente con un vector o constructo de ADN que comprende un ácido nucleico que codifica una variante de proteasa de la invención (esto es, no se utiliza una célula intermedia para amplificar o procesar, de otro modo, el vector o constructo de ADN antes de su introducción en la célula huésped). La introducción del vector o constructo de ADN de la invención en la célula huésped incluye los métodos físicos y químicos conocidos en el ámbito de especialización para introducir una secuencia de ácido nucleico (p. ej., secuencia de ADN) en una célula huésped sin inserción en un plásmido o vector. Dichos métodos incluyen, sin carácter limitativo, precipitación con cloruro de calcio, electroporación, ADN desnudo, liposomas y similares. En aspectos adicionales, el vector o los constructos de ADN se cotransforman con un plásmido sin insertarse en el plásmido. En aspectos adicionales, se deleciona un marcador selectivo de la cepa de *Bacillus* modificada utilizando métodos conocidos en la técnica (véase Stahl et al., J. Bacteriol. 158:411-418 (1984); y Palmeros et al., Gene 247:255 -264 (2000)).

[0131] En un aspecto, las células transformadas de la presente invención se cultivan en medios nutritivos convencionales. Las condiciones de cultivo específicas adecuadas, como la temperatura, el pH y similares son conocidas por los expertos en la materia. Además, algunas condiciones de cultivo pueden encontrarse en la literatura científica, como en Hopwood (2000) Practical Streptomyces Genetics, John Innes Foundation, Norwich UK; Hardwood et al., (1990) Molecular Biological Methods for Bacillus, John Wiley y de la American Type Culture Collection (ATCC). En un aspecto, la invención proporciona un cultivo (p. ej., cultivo celular) que comprende al menos una variante de proteasa o al menos un ácido nucleico de la invención. También se proporciona una composición que comprende al menos un ácido nucleico, vector o constructo de ADN de la invención.

[0132] Las células huésped transformadas con al menos una secuencia polinucleotídica que codifica al menos una variante de proteasa de la invención puede cultivarse en un medio nutritivo adecuado en condiciones que permiten la expresión de la proteasa presente, tras lo cual se recupera la proteasa resultante del cultivo. El medio utilizado para cultivar las células comprende cualquier medio convencional adecuado para el cultivo de las células huésped, como medios complejos o mínimos que contienen suplementos apropiados. Los medios adecuados han sido comercializados por proveedores comerciales o pueden prepararse de acuerdo con las fórmulas publicadas (p. ej., en catálogos de la American Type Culture Collection). La proteasa producida por las células puede recuperarse del medio de cultivo por procedimientos convencionales, incluyendo, sin carácter limitativo, p. ej., separar las células huésped del medio por centrifugación o filtración, precipitar los componentes proteínicos del sobrenadante o filtrado mediante una sal (p. ej., sulfato de amonio), purificación cromatográfica (p. ej., intercambio de iones, filtración por gel, afinidad, etc.). Puede utilizarse cualquier método adecuado para recuperar o purificar una variante de proteasa de la invención.

[0133] En un aspecto, una variante de proteasa producida por una célula huésped recombinante se secreta en el medio de cultivo. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una purificación que facilita la purificación puede utilizarse para facilitar la purificación de proteínas solubles. Un vector o constructo de ADN que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una variante de proteasa puede comprender también una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un dominio que facilita la purificación para facilitar la purificación de la variante de proteasa (véase, p. ej., Kroll, D.J. et al., *DNA Cell Biol.* 12:441-53 (1993)). Dichos dominios que facilitan la purificación incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., péptidos quelantes de metal como módulos histidina-triptófano que permiten la purificación en metales inmovilizados (Porath J., *Protein Expr. Purif.* 3:263-281 (1992)), dominios de proteína A que permiten la purificación en inmunoglobulina inmovilizada, y el dominio utilizado en el sistema de purificación por afinidad/extensión FLAGS (Immunex Corp., Seattle, WA). La inclusión de una secuencia de enlace escindible como un Factor XA o enteroquinasa (Invitrogen, San Diego, CA) entre el dominio de purificación y la proteína heteróloga también resulta de utilidad para facilitar la purificación.

[0134] Los ensayos para detectar y medir la actividad enzimática de una enzima, como una variante de proteasa de la invención, resultan ampliamente conocidos. También son ampliamente conocidos por los expertos en la materia varios ensayos para detectar y medir la actividad de las proteasas, como, p. ej., las variantes de proteasas de la invención. En concreto, se dispone de ensayos para medir la actividad de proteasa que se basan en la liberación de péptidos solubles en ácido de caseína o hemoglobina, medida como absorbancia a 280 nm o de forma colorimétrica utilizando el método de Folin (véase, p. ej., Bergmeyer et al., «*Methods of Enzymatic Analysis*» vol. 5, *Peptidases, Proteinases and their Inhibitors*, Verlag Chemie, Weinheim (1984)). Otros ensayos de ejemplo conllevan la solubilización de sustratos cromogénicos (véase, por ejemplo, Ward, «*Proteinases*», en Fogarty (ed.), *Microbial Enzymes and Biotechnology*, Applied Science, London, (1983), pp. 251-317). Otros ejemplos de ensayos incluyen, sin carácter limitativo, el ensayo con succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-para nitroanilida (SAAPFpNA) y el ensayo con ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfónico (ensayo TBNS). Existen numerosas referencias adicionales conocidas por los expertos en la materia que proporcionan métodos adecuados (véase, p. ej., Wells et al., *Nucleic Acids Res.* 11:7911-7925 (1983); Christianson et al., *Anal. Biochem.* 223:119 -129 (1994); y Hsia et al., *Anal Biochem.* 242:221-227 (1999)).

[0135] Puede utilizarse una variedad de métodos para determinar el nivel de producción de una proteasa madura (p. ej., variante de proteasa madura de la invención) en una célula huésped. Dichos métodos incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., métodos que utilizan anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para la proteasa. Entre los ejemplos de métodos se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., los ensayos de inmunoabsorción enzimática (ELISA, por sus siglas en inglés), los radioinmunoensayos (RIA, por sus siglas en inglés), los inmunoensayos fluorescentes (FIA, por sus siglas en inglés) y la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés). Estos y otros ensayos se conocen en la técnica (véase, p. ej., Maddox et al., *J. Exp. Med.* 158:1211 (1983)).

[0136] En otro aspecto, la invención ofrece métodos para elaborar o producir una variante de proteasa madura de la invención. Una variante de proteasa madura no incluye un péptido señal ni una secuencia propeptídica. Algunos de dichos métodos comprenden la elaboración o producción de una variante de proteasa de la invención en una célula huésped bacteriana recombinante, como, p. ej., una célula de *Bacillus sp.* incluyendo, p. ej., una célula de *Bacillus subtilis*. En un aspecto, la invención proporciona un método para producir una variante de proteasa de la invención, comprendiendo el método el cultivo de una célula huésped recombinante que comprende un vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica una variante de proteasa de la invención en condiciones propicias para la producción de la variante de proteasa. Algunos de dichos métodos comprenden, además, la recuperación de la variante de proteasa del cultivo.

[0137] En un aspecto, la invención proporciona un método para producir una variante de proteasa de la invención, comprendiendo el método: (a) introducir un vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica una variante de proteasa de la invención en una población de células (p. ej., células bacterianas, tales como células de *B. subtilis*); y (b) cultivar las células en un medio de cultivo en condiciones propicias para producir la variante de proteasa codificada por el vector de expresión. Algunos de dichos métodos comprenden, además: (c) aislar la variante de proteasa de las células o del medio de cultivo.

[0138] Además de la producción recombinante, los polipéptidos de las variantes de proteasa de la invención pueden producirse mediante una síntesis de péptidos directa utilizando técnicas en fase sólida (véase, por ejemplo, Stewart et al. (1969) Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co, San Francisco; Merrifield (1963) J. Am. Chem. Soc 85:2149-2154). La síntesis de péptidos puede llevarse a cabo utilizando técnicas manuales o automatizadas. La síntesis automatizada puede conseguirse, por ejemplo, utilizando el Sintetizador de Péptidos 431A de Applied Biosystems (Perkin Elmer, Foster City, Calif.) de conformidad con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Por ejemplo, las subsecuencias pueden sintetizarse químicamente por separado y combinarse utilizando métodos químicos para proporcionar variantes de proteasas o fragmentos funcionales de los mismos. De manera alternativa, tales secuencias de variantes de polipéptidos pueden pedirse de cualquier número de empresas que se especializan en la producción de polipéptidos. Más comúnmente, los polipéptidos de la invención se producen mediante la expresión de ácidos nucleicos codificantes y la recuperación de polipéptidos, por ejemplo, tal como se ha descrito anteriormente y en los Ejemplos.

[0139] En otro aspecto, la invención proporciona un método para producir una variante de proteasa, comprendiendo el método cultivar una célula huésped recombinante de la invención, comprendiendo dicha célula huésped un vector de expresión que comprende al menos un ácido nucleico de la invención, en condiciones propicias para producir la variante. El método puede comprender además la recuperación de la variante de proteasa del cultivo.

[0140] En otro aspecto, la invención incluye un método para producir una variante de proteasa de la invención, comprendiendo el método: (a) introducir el vector de expresión recombinante de la invención en una población celular; y (b) cultivar las células en un medio de cultivo en condiciones propicias para producir la subtilisina proteasa codificada por el vector de expresión. El método puede comprender además (c) aislar la variante de las células o del medio de cultivo.

[0141] En otro aspecto, la invención proporciona métodos para producir una variante de serina proteasa de una serina proteasa de *Bacillus*, comprendiendo: transformar una célula huésped con un vector de expresión comprendiendo un ácido nucleico que codifica la variante de serina proteasa; y cultivar la célula huésped transformada en condiciones adecuadas para la producción de la variante de serina proteasa. En un aspecto, los métodos comprenden además el paso de recolectar la variante de serina proteasa producida. En un aspecto, la célula huésped es una célula de *Bacillus*, y en un subconjunto de estos aspectos, la célula de *Bacillus* es una célula de *B. subtilis*. Asimismo, la presente invención proporciona métodos de limpieza, comprendiendo el paso de poner en contacto una superficie y/o un artículo que comprende un tejido con una composición de limpieza que comprende una variante de serina proteasa. En algunos métodos alternativos, la presente invención proporciona métodos de limpieza, comprendiendo el paso de poner en contacto una superficie y/o un artículo que comprende artículos de vajilla con una composición de limpieza que comprende una variante de serina proteasa.

Composiciones de la invención

[0142] La invención incluye una composición que comprende al menos un polipéptido (por ejemplo, al menos una variante de proteasa) de la invención. Dichas composiciones pueden comprender al menos un excipiente, portador, ingrediente auxiliar, u otro sustituyente, componente o material.

[0143] Por ejemplo, en un aspecto, la invención incluye una composición que comprende al menos una variante de proteasa y al menos un excipiente, portador, ingrediente auxiliar, u otro sustituyente, componente, o material. Dicha al menos una proteasa puede ser una variante de proteasa BNP'. Por ejemplo, una composición de la invención puede ser una variante de proteasa BNP', como BPN'-v36 (SEQ ID NO:6). Dicha composición puede ser un producto de cuidado del hogar y de tejidos o una composición para el cuidado del hogar y de tejidos.

[0144] Una composición según la invención puede comprender una enzima adicional seleccionada del grupo que consiste en hemicelulasa, celulasa, amilasa, peroxidasa, proteasa, xilanas, lipasa, fosfolipasa, esterasa, cutinasa, pectinasa, pectato liasa, mananasa, queratinasa, reductasa, oxidasa, fenoloxidasa, lipoxigenasa, ligninasa, pululanasa, tanasa, pentosanasa, malanasa, β -glucanasa, arabinosidasa, hialuronidasa, condroitinasa y lacasa. Una composición según el decimoséptimo aspecto de la invención puede comprender dos o más enzimas adicionales seleccionadas del grupo que consiste en hemicelulasa, celulasa, amilasa, peroxidasa, proteasa, xilanas, lipasa, fosfolipasa, esterasa, cutinasa, pectinasa, pectato liasa, mananasa, queratinasa, reductasa, oxidasa, fenoloxidasa, lipoxigenasa, ligninasa, pululanasa, tanasa, pentosanasa, malanasa, β -glucanasa, arabinosidasa, hialuronidasa, condroitinasa y lacasa.

[0145] Una composición según la invención puede comprender fosfato o puede no comprender fosfato. Una composición según la invención puede comprender al menos un mejorador y/o al menos un tensioactivo.

[0146] Tal como se analiza en otro lugar del presente documento, los polipéptidos de la invención, entre los que se incluyen las variantes de proteasas de la invención, son de utilidad en una variedad de aplicaciones de limpieza, incluidas aplicaciones de limpieza de la colada, aplicaciones de lavado de la vajilla automático, aplicaciones de lavado de la vajilla a mano, aplicaciones de limpieza de superficies duras, aplicaciones de cuidado personal, y otras aplicaciones descritas en el presente documento. En consecuencia, por ejemplo, en un aspecto, la invención proporciona composiciones de limpieza que comprenden al menos un polipéptido (p. ej., variante de proteasa) de la invención. Como se ha indicado previamente, dichas composiciones de limpieza

incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., composiciones detergentes para el lavado de la vajilla de forma automática y manual, composiciones detergentes para la colada (incluyendo, p. ej., composiciones detergentes para la colada líquidas y en polvo), composiciones de limpieza de tejidos, composiciones de limpieza para superficies duras (incluyendo, sin carácter limitativo, p. ej., superficies duras de un artículo que no sea un artículo de vajilla, un artículo que no sea un artículo de mesa, una mesa, un tablero, un mueble, una pared, el suelo, el techo, etc.). Dichas composiciones de limpieza, que son útiles en métodos para limpiar un artículo o una superficie que sea necesario limpiar, pueden comprender, p. ej., sin carácter limitativo, al menos un excipiente o portador y/u otro sustituyente, componente o material.

[0147] En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende cualquier polipéptido de la invención (por ejemplo, cualquier variante de proteasa o variantes de subtilisina de la invención) descrito en la presente memoria, donde dicha composición es una composición para el cuidado del hogar y de tejidos o un producto de cuidado del hogar y de tejidos.

[0148] En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende cualquier polipéptido de la invención (por ejemplo, cualquier variante de proteasa o variantes de subtilisina de la invención) descrito en la presente memoria, donde dicha composición no es una composición para el cuidado del hogar y de tejidos ni un producto de cuidado del hogar y de tejidos. Una composición de la invención comprendiendo una variante de proteasa de la invención puede comprender además al menos un material adjunto seleccionado de encapsulado de perfume; L agente matificante de tejidos; blanqueador soluble en agua fría; un catalizador de blanqueo que puede comprender un material seleccionado de entre un catión de iminio, un polión de iminio, zwitterión de iminio; amina modificada; óxido de amina modificada; N-sulfonil iminas; N-fosfonil iminas; N-acil iminas; dióxidos de tiadiazol; perfluoroiminas; cetonas de azúcar cíclico; lipasa de primer lavado; celulasa bacteriana de limpieza; tensioactivos no iónicos de Guerbet; y mezclas de cualquiera de los mismos. Las composiciones de la invención pueden comprender además al menos una proteasa adicional no inmunoequivalente seleccionada de entre subtilisinas (EC 3.4.21.62); proteasas similares a la tripsina o quimiotripsina; metaloproteasas; y mezclas de las mismas.

[0149] Las composiciones de la invención pueden comprender además al menos una proteasa adicional no inmunoequivalente seleccionada de: subtilisinas (EC 3.4.21.62) derivadas de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* y *B. gibsonii*; proteasas tripsina y/o proteasas quimiotripsinas derivadas de *Cellulomonas*; metaloproteasas derivadas de *B. amyloliquefaciens*; y mezclas de las mismas.

[0150] Las composiciones de la invención comprenden además una enzima adicional seleccionada de entre lipasas de primer lavado; alfa-amilasas; celulasas bacterianas de limpieza; y mezclas de las mismas.

[0151] Una composición de la invención puede comprender además al menos uno de los siguientes: un encapsulado que comprende un perfume comprende una microcápsula de perfume; un agente matificante que comprende un material seleccionado de entre tintes poliméricos, directos, hidrofóbicos, ácidos y básicos, y conjugados de tinte presentando una longitud de onda de absorción máxima de 550 nm a 650 nm y mezclas de los mismos; un tensioactivo detergente que comprende un material seleccionado de entre tensioactivos detergentes aniónicos, tensioactivos detergentes no iónicos, tensioactivos detergentes catiónicos, tensioactivos detergentes zwitteriónicos y tensioactivos detergentes anfotéricos y mezclas de los mismos; un mejorador que comprende un material seleccionado de entre zeolitas, fosfatos y mezclas de los mismos; una sal de silicato que comprende un material seleccionado de entre silicato de sodio, silicato de potasio, y mezclas de los mismos; un blanqueador que comprende un material seleccionado de entre blanqueadores solubles en agua fría y mezclas de los mismos; un polímero de carboxilato comprendiendo un material seleccionado de entre un copolímero aleatorio de maleato/acrilato o un homopolímero de poliácilato y mezclas de los mismos; un polímero de liberación de la suciedad comprendiendo un material seleccionado de un polímero de tereftalato y mezclas de los mismos; un polímero celulósico comprendiendo un material seleccionado de entre alquilcelulosa, alquil alcoxilalquilcelulosa, carboxialquil celulosa, alquil carboxialquilcelulosa, y mezclas de los mismos; un catalizador blanqueante comprendiendo un material seleccionado de entre un catión de iminio, polión de iminio; zwitterión de iminio; amina modificada; óxido de amina modificado; N-sulfonil imina; N-fosfonil imina; N-acil imina; dióxido de tiadiazol; perfluoroimina; cetona de azúcar cíclico, y mezclas de los mismos; un activador de blanqueo comprendiendo un material seleccionado de dodecanoil oxibenceno sulfonato, decanoil oxibenceno sulfonato, ácido decanoil oxibenzoico o sales de los mismos, sulfonato de 3,5,5-trimetilhexano oxibenceno, tetraacetilendiamina (TAED), sulfonato de nonanoiloxibenceno (NOBS), y mezclas de los mismos; una fuente de peróxido de hidrógeno comprendiendo un material seleccionado de sales perhidratadas inorgánicas, incluyendo sales de metal alcalino como sales de sodio de perborato (normalmente mono o tetrahidratadas), sales de percarbonato, persulfato, perfosfato, persilicato y mezclas de las mismas; un quelante comprendiendo un material seleccionado de DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético), HEDP (ácido hidroxietanodifosfónico), DTPMP (ácido dietilentriaminopenta(metilenfosfónico)), ácido etilendiaminodisuccínico (EDDS), hidrato de sal disódica de ácido 1,2-dihidroxibenceno-3,5-disulfónico, derivados de dichos quelantes; y mezclas de los mismos.

[0152] Una composición de la invención puede comprender un agente matificante de tejidos seleccionado del grupo que consiste en un tinte; conjugado de tinte-arcilla comprendiendo al menos un tinte básico-catiónico y una arcilla esméctica; y cualquier mezcla de los mismos.

[0153] Una composición de la invención puede comprender un agente matificante de tejidos seleccionado de entre un tinte de molécula pequeña, un tinte polimérico y cualquier mezcla de los mismos; conjugado de tinte-arcilla comprendiendo al menos un tinte básico-catiónico y una arcilla esméctica; y cualquier mezcla de los mismos.

5 **[0154]** Una composición que comprende una proteasa de la invención puede proporcionarse en dosis unitarias con un único compartimento o con múltiples compartimentos. La composición puede ser una dosis unitaria con múltiples compartimentos, en la que la variante de proteasa está en un compartimento diferente de cualquier fuente de peróxido de hidrógeno y/o quelante y/o enzima adicional. Una composición que comprende al menos una variante de proteasa o polipéptido de la invención puede comprender una solución de lavado.

10 **[0155]** Una composición que comprende al menos una variante de proteasa de la invención puede comprender uno o más de los siguientes ingredientes (en función del peso total de la composición): de aproximadamente 0,0005 % en peso a aproximadamente 0,1 % en peso, de aproximadamente 0,001 % en peso a aproximadamente 0,05 % en peso, o incluso de aproximadamente 0,002 % en peso a aproximadamente 0,03 % en peso de dicha variante de proteasa; y uno o más de los siguientes: de aproximadamente 0,00003 % en peso a aproximadamente 0,1 % en peso de agente matificante de tejidos; de aproximadamente 0,001 % en peso a aproximadamente 5 % en peso de cápsulas de perfume; de aproximadamente 0,001 % en peso a aproximadamente 1 % en peso, blanqueadores solubles en agua fría; de aproximadamente 0,00003 % en peso a aproximadamente 0,1 % en peso de catalizadores de blanqueo; de aproximadamente 0,00003 % en peso a aproximadamente 0,1 % en peso de lipasas del primer lavado; de aproximadamente 0,00003 % en peso a aproximadamente 0,1 % en peso de celulasas limpiadoras de bacterias; y/o de aproximadamente 0,05 % en peso a aproximadamente 20 % en peso de tensioactivos no iónicos de Guerbet.

[0156] Una composición puede ser un detergente para la colada en gránulos o en polvo que comprende una proteasa de agua fría o que comprende una variante de proteasa que no es una proteasa de agua fría.

25 **[0157]** Una composición de la invención puede proporcionarse en cualquier forma adecuada, incluido un fluido o sólido. La composición puede estar en forma de bolsas de dosis unitarias, en concreto cuando está en forma de líquido, y la composición puede estar al menos en parte, o incluso por completo, contenida en una bolsa soluble en agua. Además, la composición puede tener cualquier combinación de parámetros y/o características detalladas anteriormente.

30 **[0158]** A no ser que se indique otra cosa, todos los niveles de componentes o de composiciones que se proporcionan en el presente documento se elaboran en referencia al nivel activo de ese componente o composición, y no incluyen impurezas, como, por ejemplo, subproductos o disolventes residuales, que pueden estar presentes en fuentes disponibles en el mercado. Los pesos de los componentes enzimáticos ese basan en la proteína activa total. Todos los porcentajes y proporciones se calculan en peso a no ser que se indique de otro modo. Todos los porcentajes y proporciones se calculan en función de la composición total a no ser que se indique de otro modo. En las composiciones detergentes ejemplificadas, los niveles de enzimas se expresan por enzima pura en peso de la composición total y, a menos que se indique otra cosa, los componentes detergentes se expresan en peso de las composiciones totales.

40 **[0159]** Tal como se indica en el presente documento, en un aspecto, las composiciones de limpieza de la presente invención pueden comprender también uno o más materiales o ingredientes adjuntos entre los que se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., uno o más tensioactivos, mejoradores, blanqueadores, activadores del blanqueado, catalizadores del blanqueado, otras enzimas, sistemas de estabilizadores de enzimas, quelantes, abrillantadores ópticos, polímeros quitamanchas, agentes de transferencia de tintes, dispersantes, supresores de jabonaduras, tintes, perfumes, cápsulas de perfumes, colorantes, sales de relleno, hidrotropos, fotoactivadores, fluorescentes, suavizantes de tejidos, acondicionadores de tejidos, tensioactivos hidrolizables, conservantes, 45 antioxidantes, agentes contra el encogimiento, agentes contra la formación de arrugas, germicidas, fungicidas, motas de color, agentes para el cuidado de la plata, contra la pérdida de lustre y/o contra la corrosión, fuentes de alcalinidad, agentes solubilizantes, portadores, excipientes, coadyuvantes de elaboración, pigmentos, abrillantador (p. ej., un abrillantador que contenga al menos un tensioactivo para evitar la formación de gotas de agua haciendo que el agua se drene de la superficie del artículo que se está limpiando en una fina lámina, en lugar de formando gotas), disolventes, y/o agentes de control del pH (véase, p. ej., las patentes estadounidenses n.º 6,610,642, 6,605,458, 5,705,464, 5,710,115, 5,698,504, 5,695,679, 5,686,014 y 5,646,101, todas las cuales se incorporan en el presente documento). A continuación, se ejemplifican de forma detallada algunos aspectos de los materiales de composición de limpieza específicos. Si algún material(es) de limpieza adjunto(s) no es compatible con una variante de proteasa de la presente invención en una composición de limpieza deseada, se 55 utiliza un método adecuado para mantener separados el material de limpieza adjunto y la(s) variante(s) de proteasa(s) (esto es, sin estar en contacto entre sí) hasta que la combinación de los dos componentes sea apropiada. Dichos métodos de separación incluyen cualquier método adecuado conocido en la técnica (p. ej., cápsulas, encapsulación, comprimidos, separación física, etc.).

60 **[0160]** Las composiciones de limpieza de la presente invención se emplean, de forma ventajosa, por ejemplo, en aplicaciones de lavado de la colada, aplicaciones de limpieza de superficies duras, aplicaciones de lavado de la vajilla de forma manual o a mano, aplicaciones de lavado de la vajilla de forma automática, aplicaciones de

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

[0161] Las variantes de proteasas de la presente invención también son de utilidad en composiciones de productos de limpieza aditivos. En un aspecto, una variante de proteasa de la invención es útil en métodos y aplicaciones de limpieza con solución a baja temperatura. En un aspecto, la invención proporciona composiciones de productos aditivos de limpieza que incluyen al menos una enzima de variante de proteasa de la presente invención y que son ideales para su inclusión en un proceso de lavado cuando se desea una efectividad de blanqueado adicional. Dichos ejemplos incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., aplicaciones de limpieza con solución a baja temperatura. En un aspecto, la composición de producto aditivo se encuentra en su forma más simple, esto es, una o más variantes de proteasas de la invención. En un aspecto, la composición de producto aditivo se envasa en forma de dosis para su adición en un proceso de limpieza. En un aspecto, la composición de producto aditivo se envasa en forma de dosis para su adición en un proceso de limpieza donde se emplea una fuente de peróxígeno y se desea una efectividad de blanqueado incrementada. Puede utilizarse cualquier forma de unidad de dosis única adecuada, incluyendo, sin carácter limitativo, p. ej., píldoras, pastillas, cápsulas u otra unidad de dosis única, como líquidos o polvos medidos previamente. En consecuencia, en un aspecto, la invención proporciona una composición de producto de limpieza que comprende al menos una variante de proteasa de la invención, donde el producto se formula en de forma adecuada (p. ej., como un líquido, un sólido en polvo, una píldora, una pastilla, una cápsula u otra forma adecuada) en una unidad de dosis única adecuada de forma que se proporcione una dosis única de la variante de proteasa. Dichos productos de limpieza son útiles en una variedad de métodos y aplicaciones de limpieza, entre los que se incluyen, sin carácter limitativo, métodos y aplicaciones de lavado de la colada a máquina o a mano, métodos y aplicaciones de lavado de la vajilla a mano o de forma automática, etc. Dichos métodos y aplicaciones de limpieza pueden llevarse a cabo a una temperatura baja o en condiciones de pH bajo. En un aspecto, se incluye al menos un material portador y/o al menos un material de relleno para incrementar el volumen de dichas composiciones. Entre los materiales portadores o de relleno se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., varias sales de sulfato, carbonato y silicato, así como talco, arcilla y similares. Entre los materiales portadores o de relleno adecuados para composiciones líquidas se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., agua o alcoholes primarios y secundarios de bajo peso molecular que incluyen polioles y dioles. Entre los ejemplos de dichos alcoholes se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., metanol, etanol, propanol e isopropanol. En un aspecto, las composiciones contienen desde aproximadamente un 5 % hasta aproximadamente un 90 % de dichos materiales portadores o de relleno. Pueden incluirse materiales de relleno ácidos en dichas composiciones para reducir el pH de la solución resultante en el método o la aplicación de limpieza. De forma alternativa, en un aspecto, el aditivo de limpieza incluye uno o más componentes adjuntos, como se describe de forma más completa posteriormente.

[0162] Las presentes composiciones de limpieza y aditivos de limpieza requieren una cantidad efectiva de al menos una variante de proteasa de la invención, sola o en combinación con otras proteasas y/o enzimas adicionales. El nivel requerido de enzima se obtiene mediante la adición de una o más variantes de proteasas de la invención. Normalmente, una composición de limpieza comprende al menos aproximadamente un 0,0001 por ciento en peso hasta aproximadamente un 20 por ciento en peso, desde aproximadamente un 0,0001 hasta aproximadamente un 10 por ciento en peso, desde aproximadamente un 0,0001 hasta aproximadamente un 1 por ciento en peso, desde aproximadamente un 0,001 hasta aproximadamente un 1 por ciento en peso, o desde aproximadamente un 0,01 hasta aproximadamente un 0,1 por ciento en peso de al menos una variante de proteasa de la invención. En un aspecto, una composición de la invención (p. ej., composición de limpieza de la invención) comprende desde aproximadamente 0,01 miligramos (mg) hasta aproximadamente 10 mg, aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 5 mg, aproximadamente 0,01 mg hasta aproximadamente 2 mg, aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 1 mg, aproximadamente 0,5 mg hasta aproximadamente 10 mg, aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 5 mg, aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 4 mg, aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 3 mg, aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 2 mg, aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 1 mg, aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 10 mg, aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 5 mg, aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 4 mg, aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 3 mg, aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 2 mg, aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 2 mg, aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 1 mg, aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 0,5 mg de al menos una variante de proteasa activa de la invención por gramo de la composición.

[0163] La invención incluye una composición de limpieza comprendiendo una cantidad de variante de proteasa de la invención (comprendiendo dicha composición de manera opcional uno o más ingredientes auxiliares) de manera que cuando la composición de limpieza se añade al agua de lavado, la concentración de proteasas resultante en la solución de lavado resultante es de 0,01 ppm a 10 ppm, que incluye, por ejemplo, 0,1 ppm a 1 ppm, 0,1 a 5 ppm, 1 a 5 ppm, 1 ppm a 10 ppm, 5 ppm a 10 ppm, 5 ppm a 7 ppm.

[0164] Las composiciones de limpieza de la invención se formulan normalmente de forma que, durante su uso en operaciones de limpieza acuosa, el agua de lavado tenga un pH desde aproximadamente 5.0 hasta aproximadamente 11.5 o incluso desde aproximadamente 7.5 hasta aproximadamente 10.5. Las formulaciones o composiciones de producto líquido se formulan normalmente para tener un pH puro desde aproximadamente 3.0 hasta aproximadamente 9.0 o desde aproximadamente 3.0 a aproximadamente 5.0. Las composiciones de producto de lavado para la colada granulado se formulan normalmente para tener un pH desde aproximadamente 9 hasta aproximadamente 11. Las composiciones detergentes de lavado de vajilla de forma automática y a mano se formulan normalmente para tener un pH desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 11.5, entre los que se incluyen, sin carácter limitativo, rangos de pH de aproximadamente 8 hasta aproximadamente 10, desde aproximadamente 9 hasta aproximadamente 11.5, y desde aproximadamente 9.5 hasta aproximadamente 11.5 dependiendo del método y de la aplicación específica. Las técnicas para controlar el pH en los niveles de uso recomendados incluyen el uso de tampones, álcalis, ácidos, etc., y resultan muy conocidas para los expertos en la materia.

[0165] Las composiciones de limpieza con pH bajo adecuadas tienen normalmente un pH puro desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 5 y no suelen contener tensioactivos que se hidrolicen en tal entorno de pH. Dichos tensioactivos incluyen tensioactivos de alquil sulfato de sodio que comprenden al menos una fracción de óxido de etileno o incluso desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 16 moles de óxido de etileno. Dichas composiciones de limpieza comprenden normalmente una cantidad suficiente de un modificador de pH, como hidróxido sódico, monoetanolamina o ácido clorhídrico, para proporcionar a dicha composición de limpieza un pH puro desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 5. Dichas composiciones comprenden normalmente al menos una enzima estable en ácido. En un aspecto, las composiciones son líquidas, mientras que en otros aspectos, estas son sólidas. El pH de dichas composiciones líquidas se mide normalmente como un pH puro. El pH de dichas composiciones sólidas se mide como un 10 % de solución de sólidos de dicha composición donde el disolvente es agua destilada. En estos aspectos, todas las mediciones del pH se toman a 20 °C, a menos que se indique otra cosa.

[0166] En un aspecto, cuando la(s) variante(s) de proteasa(s) de la invención se emplea(n) en una composición granulada o líquida, se desea que la variante de proteasa se encuentre en la forma de una partícula encapsulada para proteger la variante de proteasa de otros componentes de la composición granulada durante su almacenamiento. Además, la encapsulación también es también un medio para controlar la disponibilidad de la variante de proteasa durante el proceso de limpieza. En un aspecto, la encapsulación potencia la eficacia del/de la(s) variante(s) de proteasas y/o enzimas adicionales. En este sentido, las variantes de proteasas de la presente invención se encapsulan con cualquier material de encapsulación adecuado que se conozca en la técnica. En un aspecto, el material de encapsulación normalmente encapsula al menos parte del catalizador para la(s) variante(s) de proteasa(s) de la invención. Normalmente, el material de encapsulación es hidrosoluble y/o dispersable en agua. En un aspecto, el material de encapsulación posee una temperatura de transición vítrea (Tg) de 0 °C o superior. La temperatura de transición vítrea se describe con mayor detalle en el documento WO 97/11151. El material de encapsulación se suele seleccionar entre el grupo que consiste en carbohidratos, gomas naturales o sintéticas, quitina, quitosano, celulosa y derivados de celulosa, silicatos, fosfatos, boratos, alcohol de polivinilo, polietilenglicol, ceras de parafina y combinaciones de estos. Cuando el material de encapsulación es un carbohidrato, este se selecciona normalmente de entre monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos y combinaciones de los mismos. En algunos aspectos típicos, el material de encapsulación es un almidón (véase, p. ej., los documentos de patente EP 0 922 499; las patentes estadounidenses n.º 4,977,252, 5,354,559, y 5,935,826). En un aspecto, el material de encapsulación es una microesfera hecha de plástico, como termoplásticos, acrilonitrilo, metacrilonitrilo, poliácrlonitrilo, polimetacrilonitrilo y mezclas de los mismos; entre las microesferas comercializadas que se pueden utilizar se encuentran, sin carácter limitativo, las suministradas por EXPANCEL® (Stockviksverken, Suecia) y PM 6545, PM 6550, PM 7220, PM 7228, EXTENDOSPHERES®, LUXSIL®, Q-CEL® y SPHERICEL® (PQ Corp., Valley Forge, Pensilvania).

[0167] Como se describe en el presente documento, las variantes de proteasas de la invención son de especial utilidad en los métodos y aplicaciones de limpieza, entre los que se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., composiciones detergentes para el lavado de la vajilla de forma automática, el lavado de la vajilla a mano, la colada y la limpieza. Estas aplicaciones someten las enzimas a varios niveles de exigencia ambiental. Las variantes de proteasas de la invención proporcionan ventajas con respecto a muchas enzimas utilizadas en la actualidad en tales aplicaciones de limpieza debido a su actividad proteolítica y estabilidad en varias condiciones.

[0168] Existen varias condiciones de lavado, entre las que se incluyen formulaciones detergentes, volúmenes de agua de lavado, temperaturas del agua de lavado y extensiones de tiempo de lavado variables, a las que se exponen las proteasas empleadas en el lavado. Además, las formulaciones detergentes utilizadas en áreas geográficas distintas tienen distintas concentraciones de sus componentes pertinentes presentes en el agua de lavado. Por ejemplo, los detergentes europeos tienen aproximadamente 4500-5000 partes por millón (ppm) de componentes detergentes en el agua de lavado, mientras que los detergentes japoneses tienen aproximadamente 667 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado. En América del Norte, concretamente en los Estados Unidos, los detergentes tienen normalmente aproximadamente 975 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado.

[0169] Un sistema de baja concentración de detergente incluye los detergentes en los que menos de aproximadamente 800 ppm de componentes detergentes se encuentran presentes en el agua de lavado. Los detergentes japoneses suelen adscribirse al sistema de baja concentración de detergente, dado que tienen aproximadamente 667 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado.

5 **[0170]** Una concentración de detergente media incluye detergentes en los que entre aproximadamente 800 ppm y aproximadamente 2000 ppm de los componentes detergentes están presentes en el agua de lavado. Los detergentes norteamericanos se adscriben, por lo general, a los sistemas de concentración de detergente media, dado que tienen aproximadamente 975 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado. Brasil tiene normalmente aproximadamente 1500 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado.

10 **[0171]** Un sistema de alta concentración de detergente incluye los detergentes en los que más de aproximadamente 2000 ppm de componentes detergentes se encuentran presentes en el agua de lavado. Los detergentes europeos se adscriben, por lo general, a los sistemas de alta concentración de detergente, dado que tienen aproximadamente 4500-5000 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado.

15 **[0172]** Los detergentes latinoamericanos son generalmente detergentes con mejoradores de fosfato con altos niveles de jabonadura, y la gama de detergentes utilizada en Latinoamérica puede adscribirse tanto a las concentraciones de detergente medias como a las altas, dado que las mismas varían entre 1500 ppm y 6000 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado. Como se ha mencionado anteriormente, Brasil tiene normalmente aproximadamente 1500 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado. Sin embargo, otras zonas geográficas con detergentes con mejoradores de fosfato con altos niveles de jabonadura, no limitadas a otros países de Latinoamérica, pueden tener sistemas de alta concentración de detergente de hasta 20 aproximadamente 6000 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado.

25 **[0173]** En vista de lo anterior, es evidente que las concentraciones de composiciones detergentes en las soluciones típicas de lavado en todo el mundo varían desde menos de aproximadamente 800 ppm de composición detergente («zonas geográficas con baja concentración de detergente»), por ejemplo, aproximadamente 667 ppm en Japón, hasta entre aproximadamente 800 ppm y aproximadamente 2000 ppm («zonas geográficas con concentración de detergente media»), por ejemplo, aproximadamente 975 ppm en EE. UU. y aproximadamente 1500 ppm en Brasil, hasta más de aproximadamente 2000 ppm («zonas geográficas con alta concentración de detergente»), por ejemplo, de aproximadamente 4500 ppm a aproximadamente 5000 ppm en Europa y de aproximadamente 6000 ppm en zonas geográficas con mejoradores de fosfato con altos 30 niveles de jabonadura.

[0174] Las concentraciones de las soluciones típicas de lavado se determinan de forma empírica. Por ejemplo, en los EE.UU., una máquina lavadora típica soporta un volumen de aproximadamente 64,4 l de solución de lavado. Por consiguiente, para obtener una concentración de aproximadamente 975 ppm de detergente en la solución de lavado hay que añadir aproximadamente 62,79 g de composición detergente a los 64,4 l de solución 35 de lavado. Esta cantidad es la cantidad típica introducida en el agua de lavado por el usuario al utilizar la cubeta de medida proporcionada con el detergente.

[0175] Como ejemplo adicional, distintas zonas geográficas utilizan distintas temperaturas de lavado. La temperatura del agua de lavado en Japón es normalmente inferior a la utilizada en Europa. Por ejemplo, la temperatura del agua de lavado en América del Norte y Japón se encuentra normalmente entre 40 aproximadamente 10 y aproximadamente 30 °C (p. ej., aproximadamente 20 °C), mientras que la temperatura del agua de lavado en Europa se encuentra normalmente entre aproximadamente 30 y aproximadamente 60 °C (p. ej., aproximadamente 40 °C). No obstante, en aras de ahorrar energía, muchos consumidores están pasando a utilizar el lavado en agua fría. Además, en algunas otras regiones, normalmente se emplea agua fría para la colada, así como para aplicaciones de lavado de la vajilla. En un aspecto, el «lavado en agua fría» de la presente 45 invención utiliza lavado a temperaturas desde aproximadamente 4 °C hasta aproximadamente 10 °C, desde aproximadamente 10 °C hasta aproximadamente 40 °C, o desde aproximadamente 20 °C hasta aproximadamente 30 °C, desde aproximadamente 15 °C hasta aproximadamente 25 °C, desde aproximadamente 10 °C hasta aproximadamente 20 °C, desde aproximadamente 14 °C hasta aproximadamente 18 °C, así como cualquier otra combinación en el rango que va desde aproximadamente 15 °C hasta 50 aproximadamente 35 °C, y todos los rangos que se encuentran dentro de 10 °C y 40°C, y aproximadamente 16 °C.

[0176] Como ejemplo adicional, distintas zonas geográficas tienen normalmente distinta dureza del agua. La dureza del agua suele describirse en términos de granos por galón de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mezclados. La dureza es una medida de la cantidad de calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}) en el agua. La mayoría del agua en Estados Unidos es dura, aunque el grado de dureza varía. El agua moderadamente dura (60-120 ppm) a dura (121-181 ppm) tiene 55 de 60 a 181 partes por millón (partes por millón convertido a granos por galón estadounidense es N.º de ppm dividido entre 17,1 da como resultado granos por galón) de minerales de dureza.

Agua	Granos por galón	Partes por millón
Blanda	inferior a 1,0	menos de 17

Agua	Granos por galón	Partes por millón
Ligeramente dura	1,0 a 3,5	de 17 a 60
Moderadamente dura	de 3,5 a 7,0	de 60 a 120
Dura	7,0 a 10,5	de 120 a 180
Muy dura	más de 10,5	más de 180

[0177] La dureza del agua europea es normalmente mayor que 10,5 (p. ej., aproximadamente de 10,5 hasta aproximadamente 20,0) granos por galón de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mezclados (p. ej., aproximadamente 15 granos por galón de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mezclados). La dureza del agua norteamericana es normalmente mayor que la dureza del agua japonesa, pero menor que la dureza del agua europea. Por ejemplo, la dureza del agua del agua norteamericana puede ser de entre aproximadamente 3 hasta aproximadamente 10 granos, aproximadamente 3 hasta aproximadamente 8 granos, o aproximadamente 6 granos. La dureza del agua japonesa suele ser menor que la dureza del agua norteamericana, normalmente menor que aproximadamente 4, por ejemplo aproximadamente 3 granos por galón de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mezclados.

[0178] Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona variantes de proteasas que muestran una eficacia de lavado sorprendente en al menos un conjunto de condiciones de lavado (p. ej., temperatura del agua, dureza del agua y/o concentración de detergente). En un aspecto, las variantes de proteasas de la invención son comparables en eficacia de lavado con otras subtilisina proteasas. En un aspecto, las variantes de proteasas de la presente invención exhiben una eficacia de lavado potenciada en comparación con las subtilisina proteasas comercializadas en la actualidad. En consecuencia, en un aspecto de la invención, las variantes de proteasas proporcionadas en el presente documento exhiben una estabilidad oxidativa potenciada, una estabilidad térmica potenciada, capacidades de limpieza potenciadas en varias condiciones y/o estabilidad quelante potenciada. Además, las variantes de proteasas de la invención son de utilidad en composiciones de limpieza que no incluyan detergentes, de nuevo por sí solas o en combinación con mejoradores y estabilizadores.

[0179] En un aspecto, la invención proporciona una composición de limpieza que comprende al menos una variante de proteasa de la presente invención que está presente a un nivel desde aproximadamente un 0,00001 % hasta aproximadamente un 10 % en peso de la composición con el resto (p. ej., aproximadamente un 99,999 % hasta aproximadamente un 90,0 %) comprendiendo uno o más materiales de limpieza adjuntos en peso de la composición. En otro aspecto, la invención proporciona una composición de limpieza que comprende al menos una variante de proteasa de la invención que está presente a un nivel desde aproximadamente un 0,0001 % hasta aproximadamente un 10 %, aproximadamente 0,001 % hasta aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 0,001 % hasta aproximadamente un 2 %, o aproximadamente un 0,005 % hasta aproximadamente un 0,5 % en peso de la composición con el resto de la composición de limpieza (p. ej., aproximadamente un 99,9999 % hasta aproximadamente un 90,0 %, aproximadamente un 99,999 % hasta aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99,995 % hasta aproximadamente un 99,5 % en peso) comprendiendo uno o más materiales de limpieza adjuntos.

[0180] En un aspecto, una composición de limpieza de la invención comprende, además de al menos una variante de proteasa de la invención, una o más enzimas adicionales, que proporcionan beneficios de eficacia de limpieza y/o cuidado de tejidos y/o lavado de la vajilla de forma manual o a mano y/o lavado de la vajilla de forma automática. Entre los ejemplos de enzimas adecuadas se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., hemicelulasas, celulasas, peroxidases, xilanasas, lipasas, fosfolipasas, esterases, perhidrolasas, cutinasas, pectinasas, pectato liasas, mananasas, queratinasas, reductasas, oxidasas, fenoloxidasas, lipoxigenasas, ligninasas, pululaninas, tanasas, pentosanasas, malanasas, β -glucanasas, arabinosidasas, hialuronidasas, condroitinasas, lacasa y/o amilasas, enzimas de metaloproteasa neutra (abreviadas como «nprE»), o mezclas de cualesquiera de las mismas. En un aspecto, la composición de limpieza comprende, además de al menos una variante de proteasa de la invención, una combinación de enzimas adicionales (esto es, un «cóctel») que comprende enzimas aplicables convencionales como, p. ej., al menos una proteasa, lipasa, cutinasa, celulosa y/o amilasa adicional.

[0181] Además de las variantes de proteasas proporcionadas en el presente documento, cualquier otra proteasa adecuada puede ser de utilidad e incluirse en una composición de la invención. En un aspecto, la invención proporciona una composición (p. ej., composición de limpieza) que comprende al menos una variante de proteasa de la invención y al menos una proteasa adicional. Entre las proteasas adecuadas se incluyen las de origen animal, vegetal o microbiano. En un aspecto, puede incluirse una proteasa microbiana. Puede incluirse un mutante de una proteasa modificado genética o químicamente. En un aspecto, la al menos una proteasa adicional es una serina proteasa, preferiblemente una proteasa microbiana alcalina o una proteasa similar a la tripsina. Entre los ejemplos de proteasas alcalinas se incluyen las subtilisinas, especialmente las derivadas de *Bacillus* (p. ej., subtilisina, subtilisina de *B. lentus* (esto es, GG36), subtilisina de *B. amyloliquefaciens* (esto es, BPN'), subtilisina Carlsberg, subtilisina 309, subtilisina 147, PB92, y subtilisina 168). Otros ejemplos adicionales incluyen las proteasas mutantes (es decir, variantes de proteasas) descritas en las patentes estadounidenses N.º RE 34,606, 5,955,340, 5,700,676, 6,312,936, y 6,482,628. Entre las proteasas adicionales se incluyen, aunque sin carácter limitativo, la tripsina (p. ej., de origen porcino o bovino) y la proteasa de *Fusarium* descrita en el

documento WO 89/06270. Una composición de la invención que comprende al menos una variante de proteasa de la invención también puede comprender al menos una enzima de proteasa comercializada. Las enzimas de proteasa comercializadas que son de utilidad en las composiciones de la invención incluyen, sin carácter limitativo, MAXATASE®, MAXACAL™, MAXAPEM™, OPTICLEAN®, OPTIMASE®, PROPERASE®, PURAFECT®, PURAFECT® OXP, PURAMAX™, EXCELLASE™, y PURAFAST™ (Genencor); ALCALASE®, SAVINASE®, PRIMASE®, DURAZYM™, POLARZYME®, OVOZYME®, KANNASE®, LIQUANASE®, NEUTRASE®, RELEASE® y ESPERASE® (Novozymes); subtilisina de *Bacillus alkalophilus* KAP con A230V+S256G+S259N (Kao); y proteasa de *B. lentus* BLAP™, BLAP X y BLAP S ((Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien, Düsseldorf, Alemania). Entre las proteasas adicionales que pueden incluirse en las composiciones de la invención se incluyen las descritas en los documentos de patente WO95/23221, WO 92/21760, la patente estadounidense n.º 2008/0090747, y en los documentos de patente estadounidense N.º 5,801,039, 5,340,735, 5,500,364, 5,855,625, RE 34,606, 5,955,340, 5,700,676, 6,312,936, y 6,482,628, y varias otras patentes. Pueden incluirse metaloproteasas en las composiciones de la invención. Entre dichas metaloproteasas se incluye, sin carácter limitativo, la enzima de metaloproteasa neutra (nprE) descrita en el documento WO 07/044993.

[0182] En un aspecto, la invención proporciona una composición (p. ej., composición de limpieza) que comprende al menos una variante de proteasa de la invención y al menos una lipasa. Entre las lipasas adecuadas se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., las de origen bacteriano o fúngico. En la composición de la invención, puede incluirse un mutante de una lipasa modificada genética o químicamente. Entre los ejemplos de lipasas útiles se incluyen la lipasa de *Humicola lanuginosa* (véase, p. ej., EP 258 068, y EP 305 216), la lipasa de *Rhizomucor miehei* (véase, p. ej., EP 238 023), la lipasa de *Candida*, tal como la lipasa de *C. antarctica* (p. ej., la lipasa A o B de *C. antarctica*; véase, p. ej., EP 214 761), las lipasas de *Pseudomonas*, tales como la lipasa de *P. alcaligenes* y la lipasa de *P. pseudoalcaligenes* (véase, p. ej., EP 218 272), la lipasa de *P. cepacia* (véase, p. ej., EP 331 376), la lipasa de *P. stutzeri* (véase, p. ej., GB 1,372,034), la lipasa de *P. fluorescens*, la lipasa de *Bacillus* (p. ej., la lipasa de *B. subtilis* (Dartois et al., Biochem. Biophys. Acta 1131:253-260); la lipasa de *B. stearrowthermophilus* [véase, p. ej., JP 64/744992]; y la lipasa de *B. pumilus* [véase, p. ej., WO 91/16422]).

[0183] Además, un número de lipasas clonadas son de utilidad en composiciones (p. ej., composiciones de limpieza) de la presente invención, entre las que se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., la lipasa de *Penicillium camembertii* (Yamaguchi et al., Gene 103:61-67 (1991)), la lipasa de *Geotricum candidum* (Schimada et al., J. Biochem. 106:383-388 (1989)), y varias lipasas de *Rhizopus*, como la lipasa de *R. delemar* (Hass et al., Gene 109:117-113 (1991)), una lipasa de *R. niveus* (Kugimiya et al., Biosci. Biotech. Biochem. 56:716-719 (1992)) y la lipasa de *R. oryzae*.

[0184] Otros tipos de enzimas lipolíticas, como las cutinasas, también son de utilidad en un aspecto de la presente invención, entre los que se incluyen, pero sin carácter limitativo, la cutinasa derivada de *Pseudomonas mendocina* (véase el documento WO 88/09367) y la cutinasa derivada de *Fusarium solani pisi* (véase el documento WO 90/09446).

[0185] Las lipasas adecuadas adicionales incluyen lipasas comercializadas como M1 LIPASE™, LUMA FAST™ y LIPOMAX™ (Genencor); LIPOLASE® y LIPOLASE® ULTRA (Novozymes); y LIPASE P™ «Amano» (Amano Pharmaceutical Co. Ltd., Japón).

[0186] En un aspecto, la invención proporciona composiciones (p. ej., composiciones de limpieza) que comprenden al menos una variante de proteasa de la invención y al menos una lipasa que está presente a un nivel de aproximadamente un 0,00001 % hasta aproximadamente un 10 % de lipasa adicional en peso de la composición y el resto de uno o más materiales de limpieza adjuntos en peso de la composición. En un aspecto, una composición de limpieza de la presente invención comprende, además de al menos una variante de proteasa de la invención, al menos una lipasa a un nivel de aproximadamente un 0,0001 % hasta aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 0,001 % hasta aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 0,001 % hasta aproximadamente un 2 % o aproximadamente un 0,005 % hasta aproximadamente un 0,5 % de lipasa en peso de la composición de limpieza.

[0187] También se incluye una composición (p. ej., composición de limpieza) que comprende al menos una variante de la invención y al menos una amilasa. Cualquier amilasa (p. ej., alfa y/o beta) adecuada para su utilización en soluciones alcalinas puede ser útil para su inclusión en tal composición. Entre las amilasas adecuadas se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., las de origen bacteriano o fúngico. Puede incluirse un mutante de una amilasa modificado genética o químicamente. Entre las amilasas que son de utilidad en composiciones de la invención se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., las alfa-amilasas obtenidas de *B. licheniformis* (véase, p. ej., el documento GB 1,296,839). Entre las amilasas comercializadas que son de utilidad en composiciones de la invención se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., DURAMYL®, TERMAMYL®, FUNGAMYL®, STAINZYME®, STAINZYME PLUS®, STAINZYME ULTRA® y BAN™ (Novozymes), así como POWERASE™, RAPIDASE® y MAXAMYL® P (Genencor).

[0188] En un aspecto, la invención proporciona una composición de limpieza que comprende al menos una variante de proteasa o al menos una amilasa, donde la amilasa está presente a un nivel de aproximadamente un 0,00001 % hasta aproximadamente un 10 % de amilasa adicional en peso de la composición y el resto de uno o

más materiales de limpieza adjuntos en peso de la composición. En otro aspecto, la invención incluye una composición de limpieza que comprende al menos una variante de proteasa y al menos una amilasa que está presente a un nivel de aproximadamente un 0,0001 % hasta aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 0,001 % hasta aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 0,001 % hasta aproximadamente un 2 %, aproximadamente un 0,005 % hasta aproximadamente un 0,5 % de amilasa en peso de la composición.

[0189] Cualquier celulasa adecuada puede ser de utilidad en una composición de limpieza de la presente invención. En un aspecto, la invención proporciona una composición de limpieza que comprende al menos una variante de proteasa de la invención y una o al menos una celulasa. Entre las celulastas adecuadas se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., las de origen bacteriano o fúngico. En una composición de la invención, puede incluirse un mutante de una celulasa modificada genética o químicamente. Las celulastas adecuadas incluyen, aunque sin carácter limitativo, p. ej., celulastas de *Humicola insolens* (véase, p. ej., la patente estadounidense n.º 4,435,307) y las celulastas que presentan beneficios para el cuidado del color (véase, p. ej., el documento EP 0 495 257). En el ámbito de especialización, se conocen celulastas adecuadas adicionales. Entre las celulastas comercializadas que son de utilidad y que pueden incluirse en una composición de la invención se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., CELLUZYME®, CAREZYME® (Novozymes) y KAC-500(B)TM (Kao Corporation), Puradax 7000L, Puradax HA 4000G (Genencor). En un aspecto, las celulastas se incorporan como partes o fragmentos de celulastas naturales maduras o variantes de celulastas maduras, donde se delecciona una parte del N-terminal (véase, p. ej., la patente estadounidense n.º 5,874,276). En un aspecto, una composición de limpieza de la invención comprende al menos una variante de proteasa de la invención y al menos una celulasa a un nivel desde aproximadamente un 0,00001 % hasta aproximadamente un 10 % de celulasa adicional en peso de la composición y el resto de uno o más materiales de limpieza adjuntos en peso de la composición. En otro aspecto, la invención proporciona una composición de limpieza que comprende al menos una variante de proteasa de la invención y al menos una celulasa a un nivel de aproximadamente un 0,0001 % hasta aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 0,001 % hasta aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 0,001 % hasta aproximadamente un 2 %, aproximadamente un 0,005 % hasta aproximadamente un 0,5 % de celulasa en peso de la composición.

[0190] Cualquier mananasa adecuada para su utilización en composiciones detergentes también es de utilidad y, por tanto, puede incluirse en una composición de limpieza de la invención. En un aspecto, la invención proporciona una composición de limpieza que comprende al menos una variante de proteasa de la invención y al menos una mananasa. Entre las mananastas adecuadas se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., las de origen bacteriano o fúngico. En una composición de la invención, puede incluirse un mutante de una mananasa modificado genética o químicamente. Se conocen varias mananastas que son útiles y pueden incluirse en una composición de la invención (véase, p. ej., las mananastas descritas en las patentes estadounidenses n.º 6,566,114, 6,602,842, y 6,440,991). En un aspecto, la invención proporciona una composición de limpieza que comprende al menos una variante de proteasa de la invención y al menos una mananasa a un nivel desde aproximadamente un 0,00001 % hasta aproximadamente un 10 % de mananasa adicional en peso de la composición y el resto de uno o más materiales de limpieza adjuntos en peso de la composición. En algunas de dichas composiciones de limpieza, cada mananasa está presente a un nivel de aproximadamente un 0,0001 % hasta aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 0,001 % hasta aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 0,001 % hasta aproximadamente un 2 % o aproximadamente un 0,005 % hasta aproximadamente un 0,5 % de mananasa en peso de la composición.

[0191] Puede utilizarse una peroxidasa en combinación con peróxido de hidrógeno o una fuente del mismo (p. ej., un percarbonato, perborato o persulfato) en una composición de la invención. En una composición de la invención, puede utilizarse una oxidasa en combinación con oxígeno. Ambos tipos de enzimas se utilizan para «blanquear la solución» (esto es, para evitar la transferencia de un tinte textil de un tejido tintado a otro tejido cuando los tejidos se lavan juntos en una solución de lavado), preferiblemente junto con un agente potenciador (véanse, p. ej., los documentos WO 94/12621 y WO 95/01426). Entre las peroxidastas/oxidastas adecuadas que pueden incluirse en composiciones de la invención se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., las de origen bacteriano, fúngico o vegetal. En una composición de la invención, puede incluirse un mutante de una peroxidasa u oxidasa modificado genética o químicamente. En un aspecto, la invención proporciona una composición de limpieza que comprende al menos una variante de proteasa de la invención y al menos una enzima oxidasa y/o al menos una peroxidasa. Cada dicha peroxidasa u oxidasa puede estar presente en la composición a un nivel desde aproximadamente un 0,00001 % hasta aproximadamente un 10 % de peroxidasa u oxidasa adicional en peso de la composición y el resto de uno o más materiales de limpieza adjuntos en peso de la composición. En otro aspecto, la invención proporciona una composición de limpieza que comprende al menos una variante de proteasa de la invención y al menos una enzima oxidasa y/o al menos una peroxidasa, donde cada dicha peroxidasa u oxidasa está presente a un nivel de aproximadamente un 0,0001 % hasta aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 0,001 % hasta aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 0,001 % hasta aproximadamente un 2 %, o aproximadamente un 0,005 % hasta aproximadamente un 0,5 % de enzima oxidasa o peroxidasa en peso de la composición.

[0192] En un aspecto, la invención proporciona una composición (p. ej., composición de limpieza) que comprende al menos una variante de proteasa de la invención y una o más enzimas adicionales son de utilidad, entre las que se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., una o más perhidrolasas (véase, p. ej., WO 05/056782).

5 **[0193]** En otro aspecto, la invención proporciona una composición (p. ej., composición de limpieza) que comprende al menos una variante de proteasa de la invención y abarca una o más mezclas de las enzimas anteriormente mencionadas, como, p. ej., una o más proteasas, amilasas, lipasas, mananastas y/o celulasas adicionales. De hecho, se contempla que varias mezclas de estas enzimas serán de utilidad en composiciones de la presente invención. También se contempla que los niveles variables de la(s) variante(s) de proteasa(s) y una o más enzimas adicionales pueden variar de forma independiente hasta aproximadamente un 10 %, constituyendo uno o más materiales de limpieza adjuntos el resto de la composición de limpieza. La selección específica de un material de limpieza adjunto se realiza fácilmente teniendo en cuenta la superficie o el artículo (p. ej., artículo de vajilla, artículo de mesa o artículo de tejido) o el tejido que se va a limpiar, y la forma deseada de la composición para las condiciones de limpieza durante su uso (p. ej., uso en detergente para el lavado de la vajilla de forma automática o a mano).

15 **[0194]** En un aspecto, la invención proporciona una composición (p. ej., composición de limpieza) que comprende al menos una variante de proteasa de la invención (y, opcionalmente, al menos una enzima adicional, si así se desea) y uno o más materiales de limpieza adjuntos. Entre los ejemplos de materiales de limpieza adjuntos se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., tensioactivos, mejoradores, blanqueadores, activadores del blanqueado, catalizadores del blanqueado, otras enzimas, sistemas de estabilizadores de enzimas, quelantes, 20 abrillantadores ópticos, polímeros quitamanchas, agentes de transferencia de tintes, agentes inhibidores de la transferencia de tintes, materiales catalíticos, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, perácidos preformados, agentes dispersantes poliméricos, agentes de eliminación de la suciedad de arcilla, agentes elastificantes de la estructura, dispersantes, supresores de jabonaduras, tintes, perfumes, colorantes, sales de relleno, hidrótopos, perfume, cápsula de perfume, fotoactivadores, fluorescentes, suavizantes de 25 tejidos, portadores, hidrótopos, coadyuvantes de elaboración, disolventes, pigmentos, tensioactivos hidrolizables, conservantes, antioxidantes, agentes contra el encogimiento, agentes contra la formación de arrugas, germicidas, fungicidas, motas de color, agentes para el cuidado de la plata, contra la pérdida de lustre y/o contra la corrosión, fuentes de alcalinidad, agentes solubilizantes, portadores, coadyuvantes de elaboración, pigmentos y/o agentes de control del pH (véase, p. ej., las patentes estadounidenses n.º 6,610,642, 6,605,458, 30 5,705,464, 5,710,115, 5,698,504, 5,695,679, 5,686,014 y 5,646,101). A continuación, se ejemplifican de forma detallada algunos aspectos de los materiales de composición de limpieza específicos. Como se ha indicado anteriormente, si un material de limpieza adjunto no es compatible con una variante de proteasa de la presente invención incluida en una composición de limpieza deseada, se utiliza un método adecuado para mantener separados el/los material(es) de limpieza adjunto(s) y la(s) proteasa(s) (esto es, no en contacto entre sí) hasta 35 que la combinación de los componentes sea apropiada. Dichos métodos de separación incluyen cualquier método adecuado conocido en el ámbito de especialización (p. ej., cápsula, encapsulación, pastillas, separación física, etc.).

[0195] En un aspecto, una composición (p. ej., composición de limpieza) de la invención comprende una cantidad efectiva de al menos una variante de proteasa de la invención que es útil o efectiva para limpiar una 40 superficie de la que sea necesario quitar una mancha proteínica. Dichas composiciones de limpieza incluyen composiciones de limpieza para aplicaciones como limpiar superficies duras, la colada, tejidos, platos, artículos de mesa o artículos de vajilla (p. ej., mediante el lavado de la vajilla de forma automática o el lavado de la vajilla de forma manual o a mano). De hecho, en un aspecto, la presente invención proporciona composiciones de limpieza de tejidos, mientras que, en otro aspecto, la invención proporciona composiciones de limpieza que no 45 son para tejidos. Especialmente, la invención también proporciona composiciones de limpieza que comprenden al menos una variante de proteasa de la invención, donde dichas composiciones de limpieza son adecuadas para el cuidado personal, incluido el cuidado bucal (que incluye dentífricos, pastas de dientes, enjuagues bucales, etc., así como composiciones de limpieza de dentaduras), adecuadas para la limpieza de la piel y el cabello, y adecuadas para la limpieza de gafas. Se pretende que la presente invención abarque composiciones 50 detergentes en cualquier forma (esto es, líquidas, granuladas, en barras, sólidas, semisólidas, en gel, emulsiones, pastillas, cápsulas, etc.).

[0196] Más abajo y a modo de ejemplo, se describen en mayor detalle varias composiciones de limpieza donde las variantes de proteasas de la invención son de utilidad. En un aspecto en el que las composiciones de limpieza de la invención están formuladas como composiciones adecuadas para su uso en métodos de lavado en 55 máquinas lavarropa, las composiciones de la invención contienen preferiblemente al menos un tensioactivo y al menos un compuesto mejorador, así como uno o más materiales de limpieza adjuntos, incluido, p. ej., uno o más materiales de limpieza adjuntos seleccionados del grupo de compuestos poliméricos orgánicos, agentes blanqueantes, enzimas adicionales, supresores de jabonaduras, dispersantes, jabones de cal, agentes de suciedad en suspensión y contra la redeposición e inhibidores de la corrosión. En un aspecto, las 60 composiciones para la colada también contienen uno o más agentes suavizantes (esto es, como materiales de limpieza adjuntos adicionales). En los ejemplos que se exponen más abajo, se presentan ejemplos adicionales

de formulaciones y composiciones de limpieza de tejidos y de la colada a las que puede añadirse una o más variantes de proteasas de la invención.

[0197] Las composiciones de la invención también son de utilidad como productos detergentes aditivos en forma líquida o sólida. Dichos productos aditivos tienen por objeto suplementar y/o potenciar la eficacia de las composiciones detergentes convencionales y se pueden añadir en cualquier fase del proceso de limpieza. En un aspecto, la densidad de la composición detergente para la colada varía desde aproximadamente 400 hasta aproximadamente 1200 g/litro, mientras que en otros aspectos, varía desde aproximadamente 500 hasta aproximadamente 950 g/litro de composición medida a 20 °C.

[0198] En un aspecto, la invención proporciona composiciones de limpieza como las que se describen en el documento de patente estadounidense n.º 6,605,458, comprendiendo al menos una variante de proteasa de la invención. En un aspecto, la composición que comprende al menos una variante de proteasa de la invención es una composición de limpieza de tejidos granulada compacta, mientras que en otros modos de realización, la composición es una composición de limpieza de tejidos granulada útil para el lavado de tejidos de color; en otro aspecto, la composición es una composición de limpieza de tejidos granulada que proporciona suavizado a través de la capacidad de lavado. En otro aspecto, la composición es una composición para la limpieza de tejidos líquida de uso intensivo. En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende al menos una variante de proteasa de la invención, donde la composición es una composición de limpieza de tejidos como la descrita en las patentes estadounidenses n.º 6,610,642 y 6,376,450. También se proporcionan composiciones detergentes para la colada granuladas que son de especial utilidad en las condiciones de lavado de Europa o Japón (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6,610,642, que comprenden al menos una variante de proteasa de la invención).

[0199] En un aspecto, la invención proporciona composiciones de limpieza para superficies duras que comprenden al menos una variante de proteasa proporcionada en el presente documento. Algunas de dichas composiciones comprenden composiciones de limpieza para superficies duras como las descritas en las patentes de los Estados Unidos con número 6,610,642, 6,376,450, y 6,376,450 que incluyen al menos una de estas variantes de proteasa.

[0200] La invención incluye composiciones detergentes para el lavado de la vajilla de forma automática o el lavado de la vajilla a mano que comprenden al menos una variante de proteasa proporcionada en el presente documento. Algunas de dichas composiciones comprenden composiciones de limpieza para superficies duras como las descritas en las patentes estadounidenses n.º 6,610,642 y 6,376,450.

[0201] En un aspecto, la invención proporciona composiciones de limpieza para su uso en métodos de lavado de la vajilla de forma manual o a mano o de lavado de la vajilla de forma automática que comprenden al menos una variante de proteasa de la invención y/o al menos un tensioactivo y/o al menos un material de limpieza adjunto adicional seleccionado del grupo de componentes poliméricos orgánicos, agentes potenciadores de jabonaduras, iones metálicos de grupo II, disolventes, hidrótrofos y enzimas adicionales.

[0202] En un aspecto en el que las composiciones de limpieza de la invención están formuladas como composiciones adecuadas para su uso en métodos con lavavajillas automático, las composiciones de la invención contienen normalmente al menos un tensioactivo y/o al menos un componente mejorador y puede contener uno o más materiales de limpieza adjuntos seleccionados preferiblemente de compuestos poliméricos orgánicos, agentes blanqueantes, enzimas adicionales, supresores de jabonaduras, dispersantes, dispersantes de jabones de cal, agentes de suciedad en suspensión y contra la redeposición e inhibidores de la corrosión. En los ejemplos que se exponen más abajo, se presentan ejemplos adicionales de formulaciones y composiciones para el lavado de la vajilla a las que puede añadirse una o más variantes de proteasas de la invención.

[0203] En otro aspecto, la invención proporciona composiciones de cuidado bucal que comprenden al menos una variante de proteasa de la presente invención que son útiles para el cuidado bucal (p. ej., limpieza de dientes y dentaduras); entre los componentes de composiciones de cuidado bucal que pueden ser útiles e incluirse en dichas composiciones se incluyen los descritos en la patente estadounidense n.º 6,376,450. Las composiciones de la invención pueden incluir también componentes y materiales de limpieza adjuntos descritos en las patentes estadounidenses n.º 6.376.450, 6.605.458, y 6.610.642.

[0204] Las composiciones de limpieza de la invención se formulan en cualquier forma adecuada y se preparan mediante cualquier proceso seleccionado por el formulador; ejemplos no limitativos de ello se describen en las patentes de los Estados Unidos n.º 5,879,584, 5,691,297, 5,574,005, 5,569,645, 5,565,422, 5,516,448, 5,489,392, y 5,486,303. Cuando se desea una composición de limpieza con un pH bajo, el pH de dicha composición se ajusta mediante la adición de un material como monoetanolamina o un material ácido como cloruro de hidrógeno (HCl).

[0205] Aunque no son esenciales a los efectos de la presente invención, los adjuntos ilustrados con carácter no limitativo en lo sucesivo son adecuados para su utilización en las composiciones de limpieza instantánea. En un aspecto, estos adjuntos se incorporan, por ejemplo, para potenciar la eficacia de limpieza, o contribuir a la misma, para el tratamiento del sustrato que se va a limpiar o para modificar la estética de la composición de limpieza, como en el caso de los perfumes, los colorantes, los tintes o similares. Se entiende que dichos

auxiliares son un añadido a las variantes de proteasas de la presente invención. La naturaleza concreta de estos componentes adicionales, así como los niveles de incorporación de los mismos, dependerá de la forma física de la composición y de la naturaleza de la operación de limpieza para la cual se vaya a utilizar. Entre los materiales adjuntos adecuados se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., los tensioactivos, los mejoradores, los agentes quelantes, los agentes inhibidores de la transferencia de tintes, los coadyuvantes de deposición, los dispersantes, las enzimas adicionales y los estabilizadores de enzimas, los materiales catalíticos, los activadores del blanqueado, los potenciadores del blanqueado, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, perácidos preformados, agentes dispersantes poliméricos, agentes de eliminación de la suciedad de arcilla/contra la redeposición, blanqueadores, supresores de jabonaduras, tintes, perfumes, agentes elastificantes de la estructura, suavizantes de telas, vehículos, hidrótrofos, auxiliares de procesamiento y/o pigmentos. Además de en la exposición que se presenta más abajo, pueden encontrarse ejemplos adecuados de dichos otros adjuntos y niveles de uso en las patentes de los Estados Unidos con número 5,576,282, 6,306,812, y 6,326,348. Los componentes adjuntos mencionados con anterioridad pueden constituir el resto de las composiciones de limpieza de la presente invención.

[0206] En un aspecto, las composiciones de limpieza de la invención comprenden al menos un tensioactivo y/o un sistema tensioactivo, donde el tensioactivo se selecciona de tensioactivos no iónicos, tensioactivos aniónicos, tensioactivos catiónicos, tensioactivos anfóteros, tensioactivos zwitteriónicos, tensioactivos no iónicos semipolares y mezclas de los mismos. En algunos aspectos de composiciones limpiadoras con un pH bajo (por ejemplo, composiciones que presenten un pH puro de 3 aproximadamente a 5 aproximadamente), la composición no contiene normalmente sulfato de alquilo etoxilado, puesto que se cree que dicho tensioactivo puede estar hidrolizado por medio de dichas composiciones los contenidos ácidos. En un aspecto, el tensioactivo está presente a un nivel de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 60 %, mientras que en aspectos alternativos, el nivel va de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 50 %, mientras que en otros aspectos más, el nivel va de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 40 % en peso de la composición limpiadora.

[0207] En un aspecto, las composiciones de limpieza de la invención comprenden uno o más mejoradores detergentes o sistemas de mejoradores. En algunas de dichas composiciones que incorporan al menos un mejorador, las composiciones de limpieza comprenden al menos aproximadamente un 1 %, desde aproximadamente un 3 % hasta aproximadamente un 60 % o incluso desde aproximadamente un 5 % hasta aproximadamente un 40 % de mejorador en peso de la composición de limpieza. Entre los mejoradores se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., sales de polifosfatos de alcanolamónio, amonio y metales alcalinos; silicatos metálicos alcalinos, carbonatos de metales alcalinos y alcalinotérreos, aluminosilicatos, compuestos de policarboxilato, éter hidroxipolicarboxilatos, copolímeros de anhídrido maleico con etileno o vinilmetiléter, ácido 1, 3, 5-trihidroxi benceno-2, 4, 6-trisulfónico y ácido carboximetiloxisuccínico, las diversas sales de metal alcalino, las sales de amonio y de amonio sustituido de ácidos poliacéticos como el ácido tetraacético de etilendiamina y el ácido nitrilotriacético, así como policarboxilatos como ácido melítico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido oxidisuccínico, ácido polimaleico, ácido de benceno 1,3,5-tricarboxílico, ácido carboximetiloxisuccínico y sales solubles de estos. Se contempla que cualquier mejorador adecuado será de utilidad en varias composiciones de la invención.

[0208] En algunas de dichas composiciones, los mejoradores forman complejos con iones de dureza solubles en agua (p. ej., mejoradores secuestrantes), como citratos y polifosfatos (p. ej., tripolifosfato de sodio y tripolifosfato de sodio hexahidratado, tripolifosfato de potasio y tripolifosfato con mezcla de sodio y potasio, etc.). Se contempla que se podrá utilizar cualquier mejorador adecuado en la presente invención, incluyendo los que se conocen en la técnica (véase, p. ej., EP 2 100 949).

[0209] Algunas composiciones de limpieza de la invención comprenden al menos un agente quelante además de al menos una variante de proteasa. Entre los agentes quelantes adecuados se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., los agentes quelantes de cobre, hierro y/o manganeso y mezclas de los mismos. En los aspectos en los que se utiliza al menos un agente quelante, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden desde aproximadamente un 0,1 % hasta aproximadamente un 15 % o incluso desde aproximadamente un 3 % hasta aproximadamente un 10 % de agente quelante en peso de la composición de limpieza en cuestión.

[0210] Algunas composiciones de limpieza proporcionadas en el presente documento comprenden al menos un coadyuvante de deposición además de al menos una variante de proteasa. Entre los coadyuvantes de deposición adecuados se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., polietilenglicol, polipropilenglicol, policarboxilato, polímeros quitamanchas como ácido politereftálico, arcillas como caolinita, montmorillonita, atapulgita, illita, bentonita, halloysita y mezclas de estos.

[0211] Como se indica en el presente documento, en un aspecto, los agentes antirredeposición se pueden utilizar en un aspecto de la presente invención. En un aspecto, se utilizan tensioactivos no iónicos. Estos tensioactivos no iónicos también se utilizan para prevenir la redeposición de suciedad. En un aspecto, el agente antirredeposición es un tensioactivo no iónico según se conoce en la técnica (véase, p. ej., EP 2 100 949).

[0212] En un aspecto, las composiciones de limpieza de la presente invención incluyen uno o más agentes inhibidores de transferencia de tintes. Los agentes inhibidores de transferencia de tintes poliméricos adecuados

incluyen, sin carácter limitativo, polímeros de polivinilpirrolidona, polímeros de N-óxido de poliamina, copolímeros de N-vinilpirrolidona y N-vinilimidazol, poliviniloxazolidonas y polivinilimidazoles o mezclas de los mismos. En aspectos en los que se usa al menos un inhibidor de la transferencia de tinte, las composiciones limpiadoras de la presente invención comprenden de 0,0001 % aproximadamente a 10 % aproximadamente, de 0,01 % aproximadamente a 5 % aproximadamente, o incluso de 0,1 % aproximadamente a 3 % aproximadamente en peso de la composición limpiadora.

[0213] En un aspecto, se incluyen silicatos en las composiciones de la presente invención. En algunos de dichos aspectos, se utilizan silicatos de sodio (p. ej., disilicato de sodio, metasilicato de sodio y filosilicatos cristalinos). En un aspecto, los silicatos están presentes a un nivel de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 20 %. En un aspecto, los silicatos están presentes a un nivel de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 15 % en peso de la composición.

[0214] En un aspecto, las composiciones de limpieza de la invención también comprenden dispersantes. Entre los materiales orgánicos solubles en agua adecuados se incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., los ácidos homopoliméricos o copoliméricos o sus sales, en los que el ácido policarboxílico comprende al menos dos radicales carboxilo separados entre sí por no más de dos átomos de carbono.

[0215] En un aspecto, las enzimas (p. ej., las variantes de proteasas de la invención u otras enzimas adicionales) utilizadas en las composiciones de limpieza se estabilizan con cualquier técnica adecuada. En un aspecto, las enzimas empleadas en el presente documento se estabilizan mediante la presencia de fuentes solubles en agua de iones calcio y/o magnesio en las composiciones finalizadas que aportan dichos iones a las enzimas. En un aspecto, los estabilizadores de enzimas incluyen oligosacáridos, polisacáridos y sales metálicas divalentes inorgánicas, incluidos metales alcalinotérreos, como sales de calcio. Se contempla que se utilizarán diversas técnicas para la estabilización enzimática en la presente invención. Por ejemplo, en un aspecto, las enzimas empleadas en el presente documento se estabilizan mediante la presencia de fuentes hidrosolubles de iones zinc (II), calcio (II) y/o magnesio (II) en las composiciones acabadas que aportan dichos iones a las enzimas, así como otros iones metálicos (por ejemplo, bario (II), escandio (II), hierro (II), manganeso (II), aluminio (III), estaño (II), cobalto (II), cobre (II), níquel (II) y oxovanadio (IV)). Los cloruros y los sulfatos también son de utilidad en un aspecto de la presente invención. En la técnica, se conocen ejemplos de oligosacáridos y polisacáridos adecuados (p. ej., dextrinas) (véase, p. ej., el documento WO 07/145964). En un aspecto, también son de utilidad los inhibidores de proteasas reversibles, como los compuestos que contienen boro (p. ej., borato, ácido fenil borónico, ácido 4-formil fenil borónico, otros derivados de ácido fenil borónico, inhibidores peptídicos, y similares) y/o un tripéptido aldehído en composiciones de la invención para mejorar la estabilidad de forma adicional, según se desee.

[0216] En un aspecto, se incluyen uno o más blanqueadores, activadores del blanqueado y/o catalizadores del blanqueado en las composiciones de la invención. En un aspecto, las composiciones de limpieza de la invención comprenden componentes blanqueadores orgánicos y/o inorgánicos. Entre los blanqueadores inorgánicos se incluyen, sin carácter limitativo, las sales perhidratadas (p. ej., sales de perborato, percarbonato, perfosfato, persulfato y persilicato). En un aspecto, las sales perhidratadas inorgánicas son sales de metales alcalinos. En un aspecto, se incluyen sales perhidratadas inorgánicas como sólido cristalino, sin protección adicional, aunque, en algunos otros aspectos, la sal se encuentra cubierta. Cualquier sal adecuada conocida en el ámbito de especialización es de utilidad en las composiciones de la invención (véase, p. ej., EP 2 100 949).

[0217] En un aspecto, se utilizan activadores del blanqueado en las composiciones de la invención. Los activadores de blanqueo son normalmente precursores de perácidos orgánicos que potencian la acción blanqueante durante la limpieza con temperaturas de 60 °C e inferiores. Entre los activadores del blanqueo adecuados para su uso según el presente documento se incluyen los compuestos que, en condiciones de perhidrólisis, proporcionan ácidos peroxicarboxílicos alifáticos que tienen preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10 átomos de carbono, en concreto desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 4 átomos de carbono y/u opcionalmente ácido perbenzoico sustituido. En el ámbito de especialización, se conocen activadores del blanqueado adicionales que son de utilidad en la composición de la invención (véase, p. ej., EP 2 100 949).

[0218] Además, en un aspecto y como se describe también en el presente documento, las composiciones de limpieza de la invención comprenden también al menos un catalizador del blanqueado. En un aspecto, son de utilidad el triazaciclonoano de manganeso y otros complejos relacionados, así como complejos de cobalto, cobre, manganeso y hierro. En la presente invención son de utilidad catalizadores de blanqueo adicionales (véanse, p. ej., US 4,246,612, 5,227,084, 4,810410, WO 99/06521 y EP 2 100 949).

[0219] En un aspecto, las composiciones de limpieza de la invención comprenden uno o más complejos metálicos catalíticos. En un aspecto, se utiliza un catalizador blanqueante que contiene metal. En algunos aspectos, el catalizador blanqueante metálico comprende un sistema catalizador que comprende un catión de metal de transición de actividad catalítica blanqueante definida (por ejemplo, cationes de cobre, hierro, titanio, rutenio, wolframio, molibdeno o manganeso), un catión de metal auxiliar que presenta una actividad catalítica blanqueante mínima o nula (p. ej., cationes de zinc o aluminio) y un secuestrante que presenta unas constantes de estabilidad definidas para los cationes de metal catalíticos y auxiliares, en concreto ácido

etilendiaminotetraacético, ácido etilendiaminotetra (ácido metilénfosfónico) y sales solubles en agua de los mismos (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4,430,243). En un aspecto, las composiciones de limpieza de la invención se catalizan por medio de un compuesto de manganeso. Dichos compuestos y niveles de uso son ampliamente conocidos en el ámbito de especialización (véase, p. ej., la patente estadounidense n.º 5,576,282). En aspectos adicionales, son de utilidad catalizadores del blanqueado de cobalto y se incluyen las composiciones de limpieza de la invención. En la técnica, se conocen diversos catalizadores blanqueantes de cobalto (véanse, p. ej., las patentes estadounidenses n.º 5,597,936 y 5,595,967), y se preparan fácilmente mediante procedimientos conocidos.

[0220] En un aspecto, las composiciones limpiadoras de la presente invención incluyen un complejo de metal de transición de un ligando macropolicíclico rígido (MRL, por sus siglas en inglés). En la práctica, y sin carácter limitativo, en un aspecto, las composiciones y los procesos de limpieza proporcionados por la invención se ajustan para proporcionar del orden de al menos una parte por cada cien millones de la especie de MRL activa en el medio de lavado acuoso, y en un aspecto, proporcionar desde aproximadamente 0,005 ppm hasta aproximadamente 25 ppm, desde aproximadamente 0,05 ppm hasta aproximadamente 10 ppm, y desde aproximadamente 0,1 ppm hasta aproximadamente 5 ppm del MRL en el baño de lavado.

[0221] En un aspecto, los metales de transición en el catalizador del blanqueado metálico de transición instantáneo incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., el manganeso, el hierro y el cromo. Los MRL preferidos también incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., ligandos ultrarrígidos especiales que son de puente cruzado (p. ej., 5,12-dietil-1,5,8,12-tetraazabicyclo(6.6.2)hexadecano). Los MRL de metal de transición adecuados se preparan con facilidad mediante procedimientos conocidos (véanse, por ejemplo, los documentos WO 2000/32601 y U.S. 6,225,464).

[0222] En un aspecto, la invención proporciona una composición detergente para el lavado de la vajilla de forma automática formulada como una pastilla detergente. Dicha pastilla comprende al menos una variante de proteasa de la invención y un mejorador, como, p. ej., una sal mejoradora. Algunas de dichas pastillas tienen una alcalinidad al menos equivalente a 3 gramos (g) de hidróxido de sodio por cada 100 gramos de la composición en pastilla y una densidad de al menos 1,4 gramos/centímetro cúbico. La sal mejoradora puede comprender una mezcla de una sal de silicato y una sal de fosfato, preferiblemente con más silicato (p. ej., metasilicato sódico) que fosfato (p. ej., tripolifosfato sódico). Algunas de dichas pastillas no llevan materiales tensioactivos y están especialmente adaptadas para su utilización en lavavajillas automáticos.

[0223] En un aspecto, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden agentes para el cuidado de los metales. Los agentes para el cuidado de los metales son útiles para evitar y/o reducir la pérdida de lustre, la corrosión y/o la oxidación de metales, incluidos el aluminio, el acero inoxidable y materiales no ferrosos (p. ej., plata y cobre). Entre los agentes adecuados para el cuidado de metales se incluyen los descritos en EP 2 100 949, WO 94/26860 y WO 94/26859. En algunas de dichas composiciones de limpieza, el agente para el cuidado de los metales es una sal de zinc. Algunas de dichas composiciones de limpieza comprenden desde aproximadamente un 0,1 % hasta aproximadamente un 5 % en peso de uno o más agentes para el cuidado de los metales.

[0224] Tal como se ha indicado anteriormente, las composiciones de limpieza de la presente invención se formulan en cualquier forma adecuada y se preparan mediante cualquier proceso seleccionado por el formulador; ejemplos no limitativos de ello se describen en las patentes de los Estados Unidos n.º 5,879,584, 5,691,297, 5,574,005, 5,569,645, 5,516,448, 5,489,392, y 5,486,303. En un aspecto en el que se desea una composición de limpieza con un pH bajo, el pH de dicha composición se ajusta mediante la adición de un material ácido como cloruro de hidrógeno (HCl).

[0225] Las composiciones de limpieza expuestas en el presente documento son de utilidad en la limpieza de un sitio (p. ej., una superficie, vajilla, artículos de mesa o tejidos). Normalmente, al menos una parte del sitio se pone en contacto con una composición de limpieza presente de la invención en estado puro o diluida en un baño de lavado, y posteriormente, de forma opcional, el sitio se lava y/o enjuaga. A efectos de la presente invención, «lavar» y «lavado» incluyen, sin carácter limitativo, p. ej., restregar o agitación mecánica. En un aspecto, las composiciones de limpieza se emplean en concentraciones desde aproximadamente 550 ppm hasta aproximadamente 15 000 ppm en solución. Cuando el disolvente de lavado es agua, la temperatura del agua varía normalmente desde aproximadamente 5 °C hasta aproximadamente 90 °C y cuando el sitio comprende un tejido, la relación entre la masa del agua y de tejido es normalmente desde aproximadamente 1:1 hasta aproximadamente 30:1.

Procesos de elaboración y uso de las composiciones

[0226] Las composiciones de la presente invención descritas en y a lo largo del presente documento incluyendo, por ejemplo, composiciones de limpieza, pueden formularse de cualquier manera adecuada y prepararse mediante cualquier proceso elegido por el formulador (véanse, p. ej., las patentes estadounidenses n.º 5,879,584, 5,691,297, 5,574,005, 5,569,645, 5,565,422, 5,516,448, 5,489,392, 5,486,303, 4,515,705, 4,537,706, 4,515,707, 4,550,862, 4,561,998, 4,597,898, 4,968,451, 5,565,145, 5,929,022, 6,294,514 y 6,376,445).

[0227] En un aspecto, las composiciones de limpieza de la invención se proporcionan en forma de dosis unitaria, lo que incluye pastillas, cápsulas, sobres, bolsas y bolsas con múltiples compartimentos. En un aspecto, el formato monodosis está diseñado para ofrecer una liberación controlada de los ingredientes que se encuentran en el interior de una bolsita con múltiples compartimentos (u otro formato monodosis). Los formatos monodosis y de liberación controlada adecuados se conocen en la técnica (véase, p. ej., los documentos EP 2 100 949, WO 02/102955, la patente estadounidense n.º 4,765,916 y 4,972,017, y WO 04/111178 para materiales adecuados para su uso en formatos monodosis y de liberación controlada). En un aspecto, el formato monodosis se proporciona en pastillas envueltas con una película hidrosoluble o bolsitas solubles en agua. En el documento EP 2 100 947, se proporcionan varios formatos para dosis unitarias, y estos son conocidos en el ámbito de especialización.

[0228] Se describen aspectos adicionales de la invención en relación con los procesos de elaboración y el uso de las composiciones en otro lugar del presente documento.

Métodos de la invención

[0229] La invención proporciona métodos para limpiar o lavar un artículo o superficie (p. ej., superficie dura) que necesita limpiarse, incluidos, sin carácter limitativo, p. ej., métodos para limpiar o lavar un artículo de vajilla, un artículo de mesa, un artículo de tejido, un artículo de colada, un artículo de cuidado personal, gafas, etc., o similares, y métodos para limpiar o lavar una superficie dura o blanda, como, p. ej., una superficie dura de un artículo.

[0230] En un aspecto, la invención proporciona un método para limpiar un artículo, un objeto o una superficie que necesite limpiarse, comprendiendo el método poner en contacto el artículo o la superficie (o una parte del artículo o la superficie que se desee limpiar) con una variante de proteasa de cualquiera de las de la invención o una composición de la invención durante un tiempo suficiente y/o en condiciones adecuadas o efectivas para limpiar el artículo, el objeto o la superficie hasta un nivel deseado. Algunos de dichos métodos comprenden también enjuagar el artículo, el objeto o la superficie con agua. Para algunos de dichos métodos, la composición de limpieza es una composición detergente para el lavado de la vajilla y el artículo o el objeto que se va a limpiar es un artículo de vajilla o un artículo de mesa. Un artículo de vajilla es un artículo utilizado generalmente para servir o comer alimentos. Un artículo de vajilla puede ser, sin carácter limitativo, p. ej., un plato, un plato llano, un plato hondo, una copa, etc., y similares. Artículo de mesa es un término más amplio que incluye, sin carácter limitativo, p. ej., platos, cubiertos, cuchillos, tenedores, cucharas, palillos chinos, artículos de cristal, jarras, salseras, recipientes para beber, etc., y similares; un artículo de mesa incluye cualquiera de estos artículos para servir o comer alimentos, o artículos similares. Para algunos de dichos métodos, la composición de limpieza es una composición detergente para el lavado de la vajilla de forma automática o una composición detergente para el lavado de la vajilla a mano y el artículo o el objeto que se va a limpiar es un artículo de vajilla o un artículo de mesa. Para algunos de dichos métodos, la composición de limpieza es una composición detergente para la colada, como, p. ej., una composición detergente para la colada en polvo o una composición detergente para la colada líquida, y el artículo que se va a limpiar es un artículo de tejido.

PARTE EXPERIMENTAL

[0231] En la exposición experimental, se aplican las siguientes abreviaturas: PI (índice de rendimiento), ppm (partes por millón); M (molar); mM (milimolar); μ M (micromolar); nM (nanomolar); mol (moles); mmol (milimoles); μ mol (micromoles); nmol (nanomoles); gm (gramos); mg (miligramos); μ g (microgramos); pg (picogramos); L (litros); ml y mL (mililitros); μ l y μ L (microlitros); cm (centímetros); mm (milímetros); μ m (micrómetros); nm (nanómetros); U (unidades); V (voltios); MW (peso molecular); seg (segundos); min(s) (minuto/minutos); h(s) y hr(s) (hora/horas); °C (grados centígrados); QS (cantidad suficiente); ND (sin hacer); rpm (revoluciones per minute); GH (grados de dureza alemana); H₂O (agua); dH₂O (agua desionizada); HCl (ácido clorhídrico); aa (aminoácido); bp (par de base); kb (kilobase); kD (kilodaltons); ADNc (ADN complementario o copia); ADN (ácido desoxirribonucleico); ADNmc (ADN monocatenario); ADNbc (ADN bicatenario); dNTP (desoxirribonucleótido trifosfato); ARN (ácido ribonucleico); MgCl₂ (cloruro de magnesio); NaCl (cloruro de sodio) w/v (peso/volumen); v/v (volumen/volumen); w/w (peso/peso); g (gravedad); OD (densidad óptica); ppm (partes por millón); solución amortiguadora de fosfato de Dulbecco (DPBS); SOC (2% Bacto-Triptona, 0,5% extracto de levadura Bacto, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl); Terrific Broth (TB; 12 g/l Bacto-Triptona, 24 g/l glicerol, 2,31 g/l KH₂PO₄, y 12,54 g/l K₂HPO₄); OD₂₈₀ (densidad óptica a 280 nm); OD₆₀₀ densidad óptica a 600 nm); A₄₀₅ (absorbancia a 405 nm); Vmax (la velocidad inicial máxima de una reacción catalizada enzimática); PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida); PBS (solución tampón de fosfatos [150 mM NaCl, 10 mM de tampón fosfato de sodio, pH 7,2]), PBST (PBS+TWEEN®-20 al 0,25 %); PEG (polietilenglicol); PRC (reacción en cadena de la polimerasa); RT-PCR (PCR con transcriptasa inversa); SDS (dodecilsulfato de sodio); Tris (tris(hidroximetil)aminometano); HEPES (N-[2-Hidroxietil]piperazina-N-[ácido 2-etanesulfónico]); HBS (solución tampón de HEPES); Tris-HCl (clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano); Tricine (N-[tris(hidroximetil)-metil]-glicina); CHES (ácido 2-(N-ciclo-hexilamino) etanosulfónico); TAPS (ácido 3-[[tris(hidroximetil)-metil]-amino]-propanesulfónico); CAPS (ácido 3-(ciclo-hexilamino)-propano-sulfónico); DMSO (dimetilsulfoxido); DTT (1,4-ditio-DL-treitol); SA (ácido sinapínico (ácido 5,5-dimetoxi-4-hidroxí cinámico); TCA (ácido tricloroacético); Glut y GSH (glutación reducido); GSSG (glutación oxidado); TCEP (fosfina de Tris[2-carboxietilo]); Ci (Curios); mCi (miliCurios); μ Ci (microCurios);

HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento); RP-HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa); TLC (cromatografía en capa fina); MALDI-TOF (láser de desorción/ionización asistido por matriz— tiempo de vuelo); Ts (tosilo); Bn (bencilo); Ph (fenilo); Ms (mesilo); Et (etilo); Me (metilo); Taq (ADN-polimerasa de *Thermus aquaticus*); Klenow (fragmento (Klenow) grande de ADN-polimerasa I); EGTA (ácido etilenglicol-bis (β-aminoetil éter); N, N, N', N'-tetraacético); EDTA (ácido etilendiaminotetraacético); bla (β-lactamasa o gen de resistencia a la ampicilina); HDL (líquido de uso intensivo); HDD (detergente en polvo de uso intensivo); HSG (detergente granulado con altos niveles de jabonadura); CEE (Europa Central y Oriental); WE (Europa Occidental); NA, cuando se utiliza en referencia a detergentes (Norteamérica); Japón y JPN, cuando se utilizan en referencia a detergentes (Japón); MTP (placa de microtitulación); MJ Research (MJ Research, Reno, Nevada); Baseclear (Baseclear BV, Inc., Leiden, Países Bajos); PerSeptive (PerSeptive Biosystems, Framingham, Massachusetts); ThermoFinnigan (ThermoFinnigan, San José, California); Argo (Argo BioAnalytica, Morris Plains, Nueva Jersey); Seitz EKS (SeitzSchenk Filtersystems GmbH, Bad Kreuznach, Alemania); Pall (Pall Corp., East Hills, Nueva York y Bad Kreuznach, Alemania); Spectrum (Spectrum Laboratories, Dominguez Rancho, California); Molecular Structure (Molecular Structure Corp., Woodlands, Texas); Accelrys (Accelrys, Inc., San Diego, California); Chemical Computing (Chemical Computing Corp., Montreal, Canadá); New Brunswick (New Brunswick Scientific, Co., Edison, Nueva Jersey); CFT (Center for Test Materials, Vlaardingen, Países Bajos); P&G y Procter & Gamble (Procter & Gamble, Inc., Cincinnati, Ohio); GE Healthcare (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido); DNA2.0 (DNA2.0, Menlo Park, California); OXOID (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido); Megazyme (Megazyme International Ireland Ltd., Bray Business Park, Bray, Co., Wicklow, Irlanda); Finnzymes (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia); Kelco (CP Kelco, Wilmington, Delaware); Corning (Corning Life Sciences, Corning, Nueva York); NEN (NEN Life Science Products, Boston, Massachusetts); Pharma AS (Pharma AS, Oslo, Noruega); Dynal (Dynal, Oslo, Noruega); Bio-Synthesis (Bio-Synthesis, Lewisville, Texas); ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland); Gibco/BRL (Gibco/BRL, Grand Island, Nueva York); Sigma (Sigma Chemical Co., San Luis, Misuri); Pharmacia (Pharmacia Biotech, Piscataway, Nueva Jersey); NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica de EE.UU.); Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, California); BD Biosciences y/o Clontech (BD Biosciences CLONTECH Laboratories, Palo Alto, California); Operon Technologies (Operon Technologies, Inc., Alameda, California); MWG Biotech (MWG Biotech, High Point, Carolina del Norte); Oligos Etc (Oligos Etc. Inc, Wilsonville, Oregón); Bachem (Bachem Bioscience, Inc., King of Prussia, Pensilvania); Difco (Difco Laboratories, Detroit, Michigan); Mediatech (Mediatech, Herndon, Virginia); Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California); Oxoid (Oxoid Inc., Ogdensburg, Nueva York); Worthington (Worthington Biochemical Corp., Freehold, Nueva Jersey); GIBCO BRL o Gibco BRL (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, Maryland); Millipore (Millipore, Billerica, Massachusetts); Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, California); Invitrogen (Invitrogen Corp., San Diego, California); NEB (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts); Sigma (Sigma Chemical Co., San Luis, Misuri); Pierce (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois); Takara (Takara Bio Inc. Otsu, Japón); Roche (Hoffmann-La Roche, Basilea, Suiza); Gene Oracle (Gene Oracle, Inc., Mountain View, California); EM Science (EM Science, Gibbstown, Nueva Jersey); Qiagen (Qiagen, Inc., Valencia, California); Biodesign (Biodesign Intl., Saco, Maine); Aptagen (Aptagen, Inc., Herndon, Virginia); Sorvall (Sorvall brand, de Kendro Laboratory Products, Asheville, Carolina del Norte); Molecular Devices (Molecular Devices, Corp., Sunnyvale, California); R&D Systems (R&D Systems, Mineápolis, Minesota); Siegfried Handel (Siegfried Handel AG, Zofingen, Suiza); Stratagene (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, California); Marsh (Marsh Biosciences, Rochester, Nueva York); Geneart (Geneart GmbH, Ratisbona, Alemania); Bio-Tek (Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont); Biacore (Biacore, Inc., Piscataway, Nueva Jersey); PeproTech (PeproTech, Rocky Hill, Nueva Jersey); SynPep (SynPep, Dublín, California); New Objective (New Objective brand; Scientific Instrument Services, Inc., Ringoes, Nueva Jersey); Waters (Waters, Inc., Milford, Massachusetts); Matrix Science (Matrix Science, Boston, Massachusetts); Dionex (Dionex, Corp., Sunnyvale, California); Monsanto (Monsanto Co., San Luis, Misuri); Wintershall (Wintershall AG, Kassel, Alemania); BASF (BASF Co., Florham Park, Nueva Jersey); Huntsman (Huntsman Petrochemical Corp., Salt Lake City, Utah); Shell Chemicals (Shell Chemicals, Inc., Londres, Reino Unido); Stepan (Stepan, Northfield, Illinois); Clariant (Clariant, Sulzbach, Alemania); Industrial Zeolite (Industrial Zeolite Ltd., Grays, Essex, Reino Unido); Jungbunzlauer (Jungbunzlauer, Basilea, Suiza); Solvay (Solvay, Bruselas, Bélgica); 3V Sigma (3V Sigma, Bérn, Italia); Innospec (Innospec, Ellesmere Port, Reino Unido); Thermphos (Thermphos, Vlissingen-Ost, Países Bajos); Ciba Specialty (Ciba Specialty Chemicals, Basilea, Suiza); Dow Corning (Dow Corning, Barry, Reino Unido); Enichem (Enichem Iberica, Barcelona, España); Fluka Chemie AG (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza); Gist-Brocades (Gist-Brocades, NV, Delft, Países Bajos); Dow Corning (Dow Corning Corp., Midland, Michigan); Mettler-Toledo (Mettler-Toledo Inc, Columbus, Ohio); RB (Reckitt-Benckiser, Slough, Reino Unido); y Microsoft (Microsoft, Inc., Redmond, Washington).

[0232] En las composiciones detergentes de ejemplo proporcionadas en el presente documento, los niveles enzimáticos se expresan en enzima pura en peso de la composición total y, salvo que se especifique de otro modo, los ingredientes del detergente se expresan en peso de las composiciones totales. Las identificaciones de componentes abreviadas en la presente memoria tienen los siguientes significados:

Abreviatura	Ingrediente
LAS	: Alquilbencenosulfonato C ₁₁₋₁₃ lineal de sodio

Abreviatura	Ingrediente
NaC16-17HSAS	: Alquilsulfato C ₁₆₋₁₇ de sodio altamente soluble
TAS	: Sulfato de alquilo de sebo de sodio
CxyAS	: Alquilsulfato C _{1x} - C _{1y} de sodio
CxyEz	: alcohol primario C _{1x} - C _{1y} predominantemente lineal condensado con una media de z moles de óxido de etileno.
CxyAEzS	: Alquilsulfato de sodio C _{1x} - C _{1y} condensado con un promedio de z moles de óxido de etileno Nombre de molécula añadido en los ejemplos.
No iónico	: alcohol graso etoxilado/propoxilado mixto, por ejemplo, Plurafac LF404, siendo un alcohol con un grado medio de etoxilación de 3.8 y un grado medio de propoxilación de 4,5.
QAS	: R ₂ .N ⁺ (CH ₃) ₂ (C ₂ H ₄ OH) con R ₂ = C ₁₂ -C ₁₄
Silicato	: silicato de sodio amorfo (proporción de SiO ₂ :Na ₂ O = 1,6-3,2:1)
Metasilicato	: metasilicato de sodio (proporción de SiO ₂ :Na ₂ O = 1,0)
Zeolita A	: Aluminosilicato hidratado de fórmula Na ₁₂ (AlO ₂ SiO ₂) ₁₂ .27H ₂ O
SKS-6	: silicato laminar cristalino de fórmula δ-Na ₂ Si ₂ O ₅
Sulfato	: sulfato sódico anhidro
STPP	: Tripolifosfato de sodio
MA/AA	: Copolímero aleatorio de 4:1 de acrilato/maleato, peso molecular promedio de aproximadamente 70 000-80 000
AA	: Polímero de poliácido de sodio de peso molecular (PM) promedio de 4 500
Policarboxilato	: copolímero que comprende una mezcla de monómeros carboxilados como acrilato, maleato y metacrilato con un PM que oscila entre 2 000-80 000 como Sokolan, comercializado por BASF, siendo un copolímero de ácido acrílico de PM 4 500.
BB1	: 3-(3,4-Dihidroisoquinolinio)propano sulfonato
BB2	: 1-(3,4-Dihidroisoquinolinio)-decano-2-sulfato
PB1	: Perborato de sodio monohidratado
PB4	: Perborato de sodio tetrahidrato de fórmula nominal NaBO ₃ .4H ₂ O
Percarbonato	: Percarbonato de sodio de fórmula nominal 2Na ₂ CO ₃ .3H ₂ O ₂
TAED	: Tetraacetililenodiamina
NOBS	: Nonanoiloxibenceno sulfonato en forma de sal de sodio
DTPA	: Ácido dietilentriaminopentaacético
HEDP	: ácido 1,1-hidroxietanodifosfónico
DETPMP	: penta(metilen)fosfonato de dietiltriaina (metileno), comercializado por Monsanto con el nombre comercial Dequest 2060
EDDS	: Ácido etilendiamino-N,N'-disuccínico, isómero (S,S) en forma de su sal sódica
Diamina	: Dimetilaminopropilamina; 1,6-hexanodiamina; 1,3-propanodiamina; 2-metil-1,5-pentanodiamina; 1,3-pentanodiamina; 1-metildiaminopropano
DETBCHD	: dicloruro de 5, 5, 12- dietil-1,5,8, 12-tetraazabicyclo [6,6,2] hexadecano, sal de Mn(II)
PAAC	: Sal de cobalto (III) de acetato de pentaamina
Parafina	: Aceite de parafina vendido con el nombre comercial de Winog 70 por Wintershall.
Sulfonato de parafina	: Un aceite o cera de parafina donde algunos de los átomos de hidrógeno se han reemplazado por grupos sulfonato
Aldosa oxidasa	: Enzima oxidasa vendida con el nombre comercial Aldose Oxidase por Novozymes A/S.

Abreviatura	Ingrediente
Galactosa oxidasa	: Galactosa oxidasa de Sigma.
nprE	: La forma recombinante de la metaloproteasa neutra expresada en <i>Bacillus subtilis</i> (véase, p. ej., el documento WO 07/044993)
PMN	: Metaloproteasa neutra purificada de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .
Amilasa	: Una enzima amilolítica adecuada, como las vendidas con los nombres comerciales PURAFECT® Ox descritas en los documentos WO 94/18314, WO96/05295 y vendida por Genencor; NATALASE®, TERMAMYL®, FUNGAMYI® y DURAMYL™, todas disponibles de Novozymes A/S.
Lipasa	: Una enzima lipolítica adecuada como las vendidas con los nombres comerciales LIPEX®, LIPOLEASE®, LIPOLEASE® Ultra de Novozymes A/S y Lipomax™ de Gist-Brocades
Celulasa	: Una enzima celulolítica adecuada como las vendidas con los nombres comerciales CAREZYME®, CELLUZYME® y/o ENDOLASE® de Novozymes A/S.
Pectina liasa	: Una pectina liasa adecuada, como las vendidas con los nombres comerciales XPECT®, PECTAWAY® y PECTAWASH® disponibles de Novozymes A/S.
PVP	: Polivinilpirrolidona con un peso molecular medio de 60 000.
PVNO	: N-óxido de polivinilpiridina, con un peso molecular promedio de 50 000
PVPVI	: Copolímero de vinilimidazol y vinilpirrolidona, con un peso molecular promedio de 20 000
Blanqueador 1	: 4,4'-bis(2-sulfoestiril)bifenilo de disodio
Antiespumante de silicona	: Regulador de la espuma de polidimetilsiloxano con un copolímero de siloxano-oxialquileno como agente dispersante, con una proporción de dicho regulador de espuma con respecto a dicho dispersante de 10:1 a 100:1
Supresor de jabonaduras	: 12 % de silicona/sílice, 18 % de alcohol estearílico, 70 % de almidón en forma granulada
SRP 1	: poliésteres de extremo terminado aniónicamente
PEG X	: polietilenglicol, de peso molecular x
PVP K60 ®	: Homopolímero de vinilpirrolidona (MW medio 160 000)
Jeffamine® ED-2001	: Polietilenglicol con terminación de Huntsman
Isachem® AS	: Alquilsulfato de alcohol ramificado de Enichem
MME PEG (2000)	: Monometileterpolietilenglicol (PM 2000) de Fluka Chemie AG
DC3225C	: Supresor de jabonaduras de silicona, mezcla de aceite de silicona y sílice de Dow Corning
TEPAE	: Etoxilato de tetraetilenpentaamina
BTA	: Benzotriazol
Betaína	: $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$
Azúcar	: D-glucosa de calidad industrial o azúcar de calidad alimentaria
CFAA	: Alquilo C ₁₂ -C ₁₄ -N-metilglucamida
TPKFA	: Ácidos grasos de fracción completa descabezada C ₁₂ -C ₁₄
Arcilla	: Un silicato de aluminio hidratado en una fórmula general $\text{Al}_2\text{O}_3\cdot\text{SiO}_2\cdot x\text{H}_2\text{O}$. Tipos: Caolinita, montmorillonita, atapulgita, illita, bentonita, halloysita
pH	: medido en solución al 1 % en agua destilada a 20 °C.

[0233] Para los detergentes para la colada líquidos de uso intensivo (HDL) de Norteamérica (NA) y Europa Occidental (WE) la inactivación por calor de las enzimas presentes en detergentes comercializados se realiza poniendo detergente líquido medido previamente (en una botella de vidrio) en un baño de agua a 95 °C durante 2

horas. El tiempo de incubación para la inactivación por calor de los detergentes para lavar la vajilla de forma automática (ADW, por sus siglas en inglés) de NA y WE de 8 horas. Tanto los detergentes calentados como los no calentados se someten a ensayo a los 5 minutos tras la disolución del detergente para determinar de forma precisa el porcentaje desactivado. La actividad enzimática se evalúa mediante el ensayo de AAPF.

- 5 [0234] Para someter a prueba la actividad enzimática en detergentes inactivados por calor, se elaboran soluciones de trabajo de los detergentes a partir de soluciones madre inactivadas por calor. Se añaden cantidades apropiadas de dureza del agua (p. ej., 6 gpg o 12 gpg) y de tampón a las soluciones detergentes para cumplir con las condiciones deseadas. Las soluciones se mezclan mediante agitación vorticial o inversión de las botellas. La siguiente tabla proporciona información respecto a algunos de los detergentes disponibles en el mercado y condiciones de ensayo utilizadas en el presente documento. En algunos experimentos, se pueden utilizar detergentes adicionales y/o disponibles comercialmente en los siguientes Ejemplos.

Tabla 1.1. Condiciones para el lavado de la vajilla y de la colada							
Región	Forma	Dosis	Detergente*	Tampón	gpg	pH	T (°C)
Colada (granulado y líquido para uso intensivo)							
NA	HDL	0,78 g/l	P&G TIDE® 2X	5 mM de HEPES	6	8,0	20
WE	HDL	5,0 g/l	Henkel PERSIL™	5 mM de HEPES	12	8,2	40
WE	HDG	8,0 g/L	P&G ARIEL®	2 mM de Na ₂ CO ₃	12	10,5	40
JPN	HDG	0,7 g/L	P&G TIDE®	2 mM de Na ₂ CO ₃	6	10,0	20
NA	HDG	1,0 g/L	P&G TIDE®	2 mM de Na ₂ CO ₃	6	10,0	20
Lavado de vajilla automático							
WE	ADW	3,0 g/L	RB CALGONIT™	2 mM de Na ₂ CO ₃	21	10,0	40
NA	ADW	3,0 g/L	P&G CASCADE®	2 mM de Na ₂ CO ₃	9	10,0	40

[0235] En algunos aspectos adicionales, son de utilidad las siguientes soluciones:

Tabla 1-2: Soluciones detergentes de trabajo					
Detergente	Temp (°C)	Detergente (g/L)	pH	Tampón	gpg
TIDE® 2X Cold	16	0,98	8	5mM de HEPES	6
TIDE® 2X Cold	32	0,98	8	5mM de HEPES	6
TIDE® 2X Cold	16	0,98	7	5mM de MOPS	6

- 15 [0236] Los ejemplos, que pretenden servir puramente de ejemplo de la invención y por tanto no deberían considerarse que limitan la invención de ningún modo, también describen y detallan aspectos y modos de realización de la invención dados a conocer anteriormente. Los ejemplos y la descripción detallada anterior se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación. No todas las variantes descritas son modos de realización de la invención.

20 Tabla de detergentes

[0237] Las composiciones de los detergentes utilizados en los ensayos de los Ejemplos se muestran en la Tabla 1-3. Las muestras de variantes de proteína BPN' se añadieron a las composiciones detergentes tal como se describe en el Ejemplo 1 para someter a ensayo las varias propiedades evaluadas.

- 25 [0238] Las siguientes son composiciones detergentes para la colada líquidas adecuadas para lavadoras de carga superior (1, 2 y 4) y para lavadoras con carga lateral (3).

Tabla 1-3. Composición de detergentes utilizada en los ensayos para analizar variantes de BPN'				
Ingrediente	Composición (% en peso de composición)			
	1	2	3	4
Alquiletoxi(1.8)sulfato C ₁₂₋₁₅	14,7	11,6		16,31
Sulfonato de alquilbenceno C _{11,8}	4,3	11,6	8,3	7,73

Tabla 1-3. Composición de detergentes utilizada en los ensayos para analizar variantes de BPN'

Ingrediente	Composición (% en peso de composición)			
	1	2	3	4
Alquilsulfato C ₁₆₋₁₇ ramificado	1,7	1,29		3,09
Alquil -9-etoxilato C ₁₂₋₁₄	0,9	1,07		1,31
Óxido de dimetilamina C ₁₂	0,6	0,64		1,03
Ácido cítrico	3,5	0,65	3	0,66
Ácido graso C ₁₂₋₁₈	1,5	2,32	3,6	1,52
Borato sódico (Borax)	2,5	2,46	1,2	2,53
Alquiletoxi-3-sulfato de sodio C _{12/-14}			2,9	
Alquil 7-etoxilato C ₁₄₋₁₅			4,2	
Alquil -7-etoxilato C ₁₂₋₁₄			1,7	
Formiato de Ca	0,09	0,09		0,09
Un compuesto que presenta la siguiente estructura general: bis((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) <i>n</i>)(CH ₃)-N ⁺ -C _x H _{2x} -N ⁺ -(CH ₃)-bis((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) <i>n</i>), donde <i>n</i> = de 20 a 30, y <i>x</i> = de 3 a 8, o variantes sulfatadas o sulfonadas de los mismos.			1,2	
Copolímero de injerto aleatorio ¹		1,46	0,5	
Polietilenimina etoxilada ²	1,5	1,29		1,44
Ácido dietilentriaminopentaacético	0,34	0,64		0,34
Ácido dietilentriaminopenta(metilenfosfónico)			0,3	
Tinopal AMS-GX		0,06		
Tinopal CBS-X	0,2	0,17		0,29
Polímero de limpieza de grasa alcoxilado anfifílico ³	1,28	1	0,4	1,93
Etanol	2	1,58	1,6	5,4
Propilenglicol	3,9	3,59	1,3	4,3
Dietilenglicol	1,05	1,54		1,15
Polietilenglicol	0,06	0,04		0,1
Monoetanolamina	3,05	2,41	0,4	1,26
NaOH	2,44	1,8		3,01
Cumenosulfato de sodio			1	
Formiato de sodio		0,11		0,09
Agua, Estética (Tintes, perfumes) y Trazas (enzimas, disolventes, estructurantes)	Resto	Resto	Resto	

¹ Un copolímero de injertos aleatorios es un copolímero de óxido de polietileno con un injerto de acetato de polivinilo presentando una cadena principal de óxido de polietileno y múltiples cadenas laterales de acetato de polivinilo. El peso molecular de la cadena principal de óxido de polietileno es de 6000 y la proporción del peso del óxido de polietileno en relación con el acetato de polivinilo es de aproximadamente 40 a 60, y no más de 1 punto de injerto por 50 unidades de óxido de etileno.

² Polietilenimina (MW = 600) con 20 grupos etoxilados por -NH.

³ Un polímero de limpieza de grasa alcoxilado anfifílico es una polietilenimina (MW = 600) con 24 grupos etoxilados por -NH y 16 grupos propoxilados por -NH.

EJEMPLO 1**Ensayos**

[0239] Se utilizaron varios ensayos tal como se exponen a continuación. Cualquier desviación de los protocolos proporcionados a continuación se indica en los siguientes Ejemplos.

5 **A. Ensayo TCA para determinar el contenido proteínico en placas de microtitulación de 96 pocillos**

[0240] Para BPN' y variantes de BPN', este ensayo se inició utilizando un sobrenadante de cultivo bacteriano de *B. subtilis* filtrado de placas de microtitulación cultivado durante 3-4 días a 33-37 °C con agitación a 230-250 rpm y aeración humidificada. Se utilizó una placa de microtitulación (MTP, por sus siglas en inglés) nueva de fondo plano con 96 pocillos para el ensayo. Primero, se colocó 100 µL/pocillo de 0,25 N HCl en cada pocillo. Luego, se
10 añadió 25 µL de caldo de cultivo filtrado. La absorbancia/dispersión de luz a 405 nm (utiliza un mezclador de 5 segundos en el lector de placas) se determinó después a fin de proporcionar la lectura «en blanco». Para el análisis, se colocó 100 µL/pocillo de ácido tricloroacético (TCA) al 30 % (w/v) en las placas y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se determinó la absorbancia/dispersión de luz a 405 nm (utiliza un mezclador de 5 segundos en el lector de placas). El equipo usado fue un Biomek FX Robot (Beckman Coulter) y un lector de MTP SpectraMAX (tipo 340; Molecular Devices); las MTP fueron de Costar (tipo 9017).
15

[0241] Los cálculos se realizaron al sustraer el blanco (sin TCA) a la lectura del ensayo con TCA para proporcionar una medición relativa del contenido de proteínas en las muestras. Si se desea, puede crearse una curva patrón al calibrar las lecturas del TCA con los ensayos de AAPF de clones con factores de conversión conocidos. No obstante, los resultados del TCA son lineares respecto a la concentración de proteínas de 250 a
20 2500 microgramos de proteína por ml (ppm) y por tanto puede representarse directamente frente al rendimiento de la enzima para el propósito de elegir variantes con un buen rendimiento. El aumento en la difusión de la luz/turbidez de las muestras tiene relación con la cantidad total de proteína precipitable en el sobrenadante del cultivo.

B. Ensayo de proteasa AAPF placas de microtitulación de 96 pocillos

[0242] A fin de determinar la actividad de proteasa de las proteasas y las variantes de las mismas de la presente invención, se midió la hidrólisis de la N-succinil-L-alanil-L-alanil-L-prolil-L-fenil-p-nitroanilida (suc-AAPF-pNA). Las soluciones de reactivo utilizadas fueron: Tris/HCl 100 mM, pH 8,6, que contiene TWEEN®-80 al 0,005 % (tampón de dilución de Tris); tampón Tris 100 mM, pH 8,6, que contiene CaCl₂ 10 mM y TWEEN®-80 al 0,005 % (tampón de Tris/Ca); y 160 mM de suc-AAPF-pNA en DMSO (solución madre suc-AAPF-pNA) (Sigma: S-7388). Para
30 preparar una solución de trabajo de suc-AAPF-pNA, se añadió 1 ml de solución madre suc-AAPF-pNA a 100 ml de tampón Tris/Ca y se mezcló bien durante al menos 10 segundos. El ensayo se realizó mediante la adición de 10 µl de solución de proteasa diluida a cada pocillo, inmediatamente seguida de la adición de 190 µl de solución de trabajo de suc-AAPF-pNA a 1 mg/ml. Las soluciones se mezclaron durante 5 segundos y se realizó la lectura del cambio de absorbancia en el modo cinético (25 lecturas en 5 minutos) a 405 nm en un lector de MTP, a
35 25 °C. La actividad de la proteasa se expresó como AU (actividad = AOD·min⁻¹ ml⁻¹).

C. Ensayo de micromuestras de BMI

[0243] Se obtuvieron micromuestras manchadas de sangre, leche y tinta (BMI, por sus siglas en inglés) de 5,5 milímetros de diámetro circular del CFT. Antes de cortar las muestras, el tejido (EMPA 116) se lavó con agua. Se colocó una micromuestra en cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos no vinculante (Corning 3641). Los detergentes utilizados para los ensayos incluían la Composición detergente 1, la Composición detergente 2 y la Composición detergente 4. Los detergentes se diluyeron en agua Milli-Q (desionizada) hasta una concentración de fuerza de trabajo de 0,788 g/L. Estos detergentes se tamponaron con 5 mM de HEPES a pH 8,2 o pH 7,2, que tras la adición de detergente, se tampona a pH 8 o pH 7, respectivamente. De manera adicional, se añadió agua con una dureza de 6 granos por galón (gpg) (3:1 Ca:Mg - CaCl₂: MgCl₂·6H₂O). La
45 solución detergente se equilibró previamente en un baño de agua con hielo para ensayos a 16 °C (a temperatura ambiente para ensayos a 32 °C) y se bombeó hacia un depósito circulante (Beckman FX). A continuación, se añadieron 190 µl de solución de detergente deseada a cada pocillo de la MTP que contuviera micromuestras. A esta mezcla se le añadió 10 µl de solución de dilución maestra de enzima diluida, proporcionando una concentración de enzima aproximada de 0,4-0,5 µg/mL. La dilución maestra se preparó a partir de los sobrenadantes del cultivo a 8 µg/mL, donde las concentraciones de enzimas aproximadas de los sobrenadantes del cultivo y los controles de BPN'-v3 o BPN'-v36 originales se determinaron utilizando el ensayo de actividad de la proteasa AAPF, con base en la concentración en un estándar de concentración conocida de BPN'-v3 o BPN'-v36 purificada. La MTP se selló con cinta y se colocó en el incubador/agitador iEMS (Thermo/Labsystems) preajustado a 16 °C en un recipiente de lácteos refrigerado o a 32 °C en la mesa de trabajo durante 20 minutos,
55 con una agitación de 1400 rpm. Tras la incubación en las condiciones adecuadas, se retiró la cinta de sellado de cada placa y se transfirieron 125 µl (150 µl si se pipetea a mano para un cribado menor) de la solución de cada pocillo a una MTP nueva (Corning 9017). Se realizó la lectura de la nueva MTP que contiene 125 µl - 150 µl de solución/pocillo a 600 nm (con 5 seg en modo de mezclador en el lector de placa) utilizando un lector de MTP SpectraMax (tipo 340; Molecular Devices). También se incluyeron ensayos en blanco que contienen una micromuestra y detergente, pero sin enzimas. El valor de absorbancia obtenido se corrigió para el valor en
60

blanco (sustrato sin enzima), proporcionando una medición de la actividad hidrolítica. Se calculó el índice de rendimiento para cada muestra (variante) tal como se describirá más adelante. A este ensayo de micromuestras de BMI, llevado a cabo a 60 °F (16 °C) y pH 8, se le hace referencia como el «Método de prueba».

D. Ensayo de micromuestras de huevo

- 5 **[0244]** Se obtuvieron micromuestras de algodón manchado de pigmento con yema de huevo envejecida CS38 de 5,5 milímetros de diámetro circular del CFT. Estas muestras no se aclararon previamente en agua. Se colocó una micromuestra en cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos no vinculante (Corning 3641). La Composición detergente 4 se diluyó en agua Milli-Q (desionizada) hasta una concentración de fuerza de trabajo de 0,788 g/L. Los detergentes se tamponaron con 5 mM de HEPES a pH 8,2, que tras la adición de detergente, se tampona a pH 8. De manera adicional, se añadió agua con una dureza de 6 granos por galón (gpg) (3:1 Ca:Mg - CaCl₂: MgCl₂·6H₂O). La solución detergente se equilibró previamente en un baño de agua con hielo para ensayos a 16 °C (a temperatura ambiente para ensayos a 32 °C) y se bombeó hacia un depósito circulante (Beckman FX). A continuación, se añadieron 185 µl de la solución detergente deseada a cada pocillo de la MTP que contenía micromuestras. A esta mezcla se le añadió 15 µl de solución de dilución maestra de enzima diluida, proporcionando una concentración de enzima aproximada de 0.6 µg/mL en la reacción. La dilución maestra se preparó a partir de los sobrenadantes del cultivo a 8 µg/mL, donde la concentración de enzimas aproximadas de los sobrenadantes del cultivo y el control de BPN'-v3 o BPN'-v36 originales se determinaron utilizando el ensayo de actividad de la proteasa AAPF, con base en la concentración en un estándar de concentración conocida de BPN'-v3 o BPN'-v36 purificada. La MTP se selló con cinta y se colocó en el incubador/agitador iEMS (Thermo/Labsystems) preajustado a 16 °C en un recipiente de lácteos refrigerado o a 32 °C en la mesa de trabajo durante 30 minutos, con una agitación de 1400 rpm. Tras la incubación en las condiciones adecuadas, se retiró la cinta de sellado de cada placa y se transfirieron 125 µl (150 µl si se pipetea a mano para un cribado menor) de la solución de cada pocillo a una MTP nueva (Corning 9017). Se realizó la lectura de la nueva MTP que contiene 125 µl - 150 µl de solución/pocillo a 405 nm (con 5 seg en modo de mezclado en el lector de placa) utilizando un lector de MTP SpectraMax (tipo 340; Molecular Devices). También se incluyeron ensayos en blanco que contienen una micromuestra y detergente, pero sin enzimas. El valor de absorbancia obtenido se corrigió para el valor en blanco (sustrato sin enzima), proporcionando una medición de la actividad hidrolítica. Se calculó el índice de rendimiento para cada muestra (variante) tal como se describirá más adelante.

E. Ensayo de micromuestras de hierba

- 30 **[0245]** Se obtuvieron muestras de hierba restregada en algodón tejido Warwick Equest de Warwick. Estas muestras se cortaron en micromuestras de 5,5 milímetro de diámetro circular utilizando una máquina perforadora de 96 pocillos fabricada a medida que coloca una micromuestra en cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillo no vinculante (Corning 3641). Tras cortar las muestras, el tejido se lavó en los pocillos (aclarados previamente) con 100 µL por pocillo de Composición detergente 4 con una fuerza de trabajo del 50 % diluida en agua. Tras 20 minutos de aclarar previamente los 100 µL del enjuague de detergente al 50 % se retiró cuidadosamente pipeteando a mano. La Composición detergente 4 se diluyó en agua Milli-Q (desionizada) hasta una concentración de fuerza de trabajo de 0,788 g/L. Estos detergentes se tamponaron con 5 mM de HEPES a pH 8,2, que tras la adición de detergente, se tampona a pH 8. De manera adicional, se añadió agua con una dureza de 6 granos por galón (gpg) (3:1 Ca:Mg - CaCl₂: MgCl₂·6H₂O). La solución detergente se equilibró previamente en un baño de agua con hielo para ensayos a 16 °C (a temperatura ambiente para ensayos a 32 °C). A continuación, se añadieron 180 µl de solución de detergente deseada a cada pocillo de la MTP que contuviera las micromuestras, inmediatamente después de que el aclarado previo se hubiera completado. A esta mezcla se le añadió 20 µl de solución de dilución maestra de enzima diluida, elaborando la enzima aproximada en la reacción a 0,8 µg/mL. La dilución maestra se preparó a partir de los sobrenadantes del cultivo a 8 µg/mL, donde la concentración de enzimas aproximadas de los sobrenadantes del cultivo y el control de BPN'-v36 originales se determinaron utilizando el ensayo de actividad de la proteasa AAPF, basando la concentración en un estándar de concentración conocida de BPN'-v36 purificada. La MTP se selló con cinta y se colocó en el incubador/agitador iEMS (Thermo/Labsystems) preajustado a 16 °C en un recipiente de lácteos refrigerado o a 32 °C en la mesa de trabajo durante 30 minutos, con una agitación de 1400 rpm. Tras la incubación en las condiciones adecuadas, se retiró la cinta de sellado de cada placa y se transfirieron 125 µl (150 µl si se pipetea a mano para un cribado menor) de la solución de cada pocillo a una MTP nueva (Corning 9017). Se realizó la lectura de la nueva MTP que contiene 125 µl - 150 µl de solución/pocillo a 430nm y a 670 nm (con 5 seg en modo de mezclado en el lector de placa) utilizando un lector de MTP SpectraMax (tipo 340; Molecular Devices). También se incluyeron ensayos en blanco que contienen una micromuestra y detergente, pero sin enzimas. El valor de absorbancia obtenido se corrigió para el valor en blanco (sustrato sin enzima), proporcionando una medición de la actividad hidrolítica. Se calculó el índice de rendimiento para cada muestra (variante) tal como se describirá más adelante.

F. Ensayo de estabilidad

- 60 **[0246]** La estabilidad de las variantes de proteasas se determinó con la presencia de la Composición detergente 3 concentrada al 40 % diluida en agua. Los reactivos utilizados fueron la Composición detergente 3 diluida al 50 % en agua Milli-Q, 10 mM de MES, tampón de dilución maestra con pH 5,8-TWEEN® al 0,01 %, reactivos

AAPF: véase el protocolo del ensayo AAPF. El equipamiento empleado fue MTP con base plana (Corning 9017) para la dilución o enzima diluida en detergente así como para placas de suc-AAPF-pNA, Biomek FX (Beckman Coulter), lector de MTP Spectramax Plus 384 (Molecular Devices), incubadora/agitador iEMS (1 mm de amplitud) de Thermo Electron Corporation, cinta de sellado: Nunc (236366), depósito circulante (Beckman Fx).

- 5 **[0247]** La Composición detergente 3 se diluyó inicialmente al 50 % en agua. Este detergente se mantuvo a temperatura ambiente y se sometió a ciclos a través del depósito circulante. Las incubadoras/agitadores iEMS (Thermo/Labsystems) se ajustaron a 43 °C. Los sobrenadantes del cultivo se diluyeron en placas que contenían tampón de dilución maestra en una concentración de ~ 20 ppm (placa de dilución maestra). Después, se añadieron 40 µl de muestra de la placa de dilución maestra a placas que contenían 160 µl de Composición detergente 3 al 50 % para obtener una concentración de incubación final de 4 ppm. Los contenidos se mezclaron y se mantuvieron a temperatura ambiente y se llevaron a cabo ensayos de AAPF triplicados inmediatamente en estas placas y se registraron como lecturas sin tensión. El ensayo AAPF se modificó de manera que 20 µL de muestra del paso anterior se añadió a 190 µL de solución de suc-AAPF-pNA de trabajo. Las placas se cubrieron de inmediato con cinta de sellado y se situaron en agitadores iEMS a 43 °C durante 30 minutos a 650 rpm. Tras 30 minutos de incubación, los ensayos de AAPF triplicados se llevaron a cabo en estas placas sometidas a tensiones y se registraron como lecturas sometidas a tensiones. La estabilidad de las muestras se determinó calculando la relación de la actividad de AAPF residual e inicial de la siguiente forma: Actividad residual (%) = [mDO.min⁻¹ sometida a tensiones]*100 / (mDO. min⁻¹ no sometida a tensiones). Se calculó el índice de rendimiento para cada muestra (variante) tal como se describirá más adelante.

20 G. Ensayo de estabilidad de LAS/EDTA

- [0248]** La estabilidad de las variantes de proteasas en presencia de un tensioactivo aniónico representativo (LAS=sulfonato de alquilbenceno lineal, en concreto, dodecilbencenosulfonato de sodio-DOBS) y EDTA disódico se midió tras la incubación en condiciones definidas y se determinó la actividad residual mediante el ensayo de AAPF. Los reactivos utilizados fueron dodecilbencenosulfonato, sal de sodio (DOBS, Sigma n.º D-2525), TWEEN®-80 (Sigma n.º P-8074), EDTA disódico (Siegfried Handel, n.º 164599-02), HEPES (Sigma n.º H-7523), tampón no sometido a tensiones: 50 mM de HEPES (11,9 g/l) + TWEEN®-80 al 0,005 %, a pH 8,0, tampón sometido a tensiones: 50 mM de HEPES (11,9 g/l), DOBS al 0,1 % (p/v) (1 g/l), 10 mM de EDTA (3,36 g/l), a pH 8,0, sobrenadantes de cultivo de proteasa de referencia y variante de proteasa, con 200 - 400 µg/ml de proteína. El equipamiento empleado fue MTP con base en forma de V o de U como placas de dilución (Greiner 651101 y 650161, respectivamente), MTP con base plana (Corning 9017) para tampón no sometido a tensiones y tampón LAS/EDTA así como para placas de suc-AAPF-pNA, Biomek FX (Beckman Coulter), lector de MTP Spectramax Plus 384 (Molecular Devices), incubadora/agitador iEMS (1 mm de amplitud) (Thermo Electron Corporation), cinta de sellado Nunc (236366).

- [0249]** La incubadora/agitador iEMS (Thermo/Labsystems) se ajustó a 29 °C. Los sobrenadantes del cultivo se diluyeron en placas que contenían tampón no sometido a tensiones en una concentración de ~ 25 ppm (placa de dilución maestra). Luego, se añadieron 20 µl de muestra de la placa de dilución maestra a placas que contenían 180 µl de tampón no sometido a tensiones para proporcionar una concentración de incubación final de 2,5 ppm. Los contenidos se mezclaron y se mantuvieron a temperatura ambiente, y se realizó un ensayo de AAPF en esta placa. Después, también se añadieron 20 µl de muestra de la placa de dilución maestra a placas que contenían 180 µl de tampón sometido a tensiones (50 mM de HEPES (11,9 g/l), 0,1 % (w/v) DOBS (1 g/l), 10 mM de EDTA (3,36 g/l), a pH 8,0). Las soluciones se mezclaron y se pusieron inmediatamente en el agitador iEMS a 29 °C durante 30 minutos a 400 rpm. Tras 30 minutos de incubación, se realizó un ensayo de AAPF en la placa sometida a tensiones. La estabilidad de las muestras se determinó calculando la relación de la actividad de AAPF residual e inicial de la siguiente forma: Actividad residual (%) = [mDO.min⁻¹ sometida a tensiones]*100 / [mDO. min⁻¹ no sometida a tensiones]. Se calculó el índice de rendimiento para cada muestra (variante) tal como se describirá más adelante.

Índice de rendimiento

- [0250]** El índice de rendimiento proporciona una comparación del rendimiento de una variante (valor real) y una enzima de proteasa de referencia o estándar (valor teórico) en la misma concentración de proteínas. Los valores teóricos pueden calcularse utilizando los parámetros de una curva de respuesta a la dosis de rendimiento (es decir, utilizando una ecuación de Langmuir para generar la curva de rendimiento) de la proteasa de referencia/estándar. Un índice de rendimiento (PI) que es mayor que 1 (PI>1) identifica una mejor variante en comparación con la proteasa estándar o de referencia (que puede ser, por ejemplo, una proteasa natural u otra variante de proteasa), mientras que un PI de 1 (PI=1) identifica una variante con el mismo rendimiento que la proteasa de referencia o estándar, y un PI menor que 1 (PI<1) identifica una variante con un peor rendimiento que la proteasa de referencia o estándar. Por lo tanto, el PI identifica ganadores (por ejemplo, variantes que presentan una actividad proteolítica potenciada en comparación con la de la proteasa estándar/de referencia) así como variantes que pueden ser menos deseables para su uso en determinadas circunstancias (por ejemplo, variantes que presentan una actividad proteolítica más baja que la actividad proteolítica de la proteasa estándar/de referencia).

[0251] Sin embargo, es importante destacar que las variantes de proteasa que presentan valores del índice de rendimiento menores que los de una proteasa estándar o de referencia son útiles en las aplicaciones y métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, las variantes de proteasa que tienen valores del índice de rendimiento menores que los de una proteasa estándar o de referencia presentan actividad proteolítica y por tanto son útiles en las composiciones de la invención, como por ejemplo, pero sin carácter limitativo, composiciones de limpieza (que incluyen, pero sin carácter limitativo, por ejemplo, composiciones detergentes de limpieza) para limpiar una variedad de superficies y artículos, incluyendo, pero sin carácter limitativo, por ejemplo, la colada, tejidos, y artículos de vajilla, y en aplicaciones de cuidado personal y composiciones tal como se describe en el presente documento; tales variantes de proteasa también son útiles en productos de cuidado del hogar y de tejidos descritos en algún otro lugar del presente documento y en métodos de la invención, incluyendo, pero sin carácter limitativo, por ejemplo, métodos de limpieza, métodos para el cuidado personal, etc., descritos en algún otro lugar del presente documento.

[0252] Se utilizan varios términos expuestos a continuación para describir la variante: las variantes no perjudiciales tienen un PI de $>0,05$; las variantes perjudiciales tienen un PI menor o igual que $0,05$; las variantes combinables son aquellas para las que la variante presenta un índice de rendimiento mayores o iguales que $0,2$ para al menos una propiedad, y $>0,05$ para todas las propiedades. Las variantes combinables son mutaciones que pueden combinarse para suministrar proteínas con índices de rendimiento adecuados para una o más propiedades deseadas. Estos datos son útiles para la modificación de cualquier subtilisina/subtilasa o proteasa. Aunque la subtilasa o proteasa que se ha de modificar tenga un aminoácido diferente al de la subtilisina BPN' en una o más posiciones concretas, estos datos pueden utilizarse para identificar sustituciones de aminoácidos que alteren las propiedades deseadas mediante la identificación de la mejor sustitución, incluyendo sustituciones del aminoácido natural de BPN'.

EJEMPLO 2

Construcción de una biblioteca de BPN' y rendimiento de limpieza de las variantes de BPN'

a) Descripción del casete de expresión de BPN'-v3 utilizado para la construcción de la biblioteca

[0253] El casete de expresión de BPN'-v3 (proteasa BPN' que contiene las sustituciones G097A-G128A-Y217Q) utilizado para la construcción de la biblioteca combinatoria se generó utilizando el casete de expresión de BPN' que comprende la secuencia líder híbrida aprE-BPN' (es decir, la secuencia señal), la BPN' pro y la secuencia madura de BPN' de *B. amyloliquefaciens*. La secuencia de ADN se muestra a continuación como la SEQ ID NO:1 y codifica la proteína precursora de BPN' que se muestra a continuación como la SEQ ID NO:168.

GTGAGAAGCAAAAAATTGTGGATCAGTTTGCTGTTTGCTTTAGCGTTAATCTTTACGATGGC
 GTTCGGCAGCACATCCTCTGCCCAGGCGGCAGGGAAATCAAACGGGGAAAAGAAATATATT
 GTCGGGTTTAAACAGACAATGAGCACGATGAGCGCCGCTAAGAAGAAAGATGTCATTTCTG
 AAAAAGGCGGGAAAGTGCAAAAGCAATTCAAATATGTAGACGCAGCTTCAGCTACATTAA
 CGAAAAAGCTGTAAAAGAATTGAAAAAAGACCCGAGCGTCGCTTACGTTGAAGAAGATCAC
 GTAGCACATGCGTACGCGCAGTCCGTGCTTACGGCGTATCACAATTAAGCCCTGC
 TCTGCACTCTCAAGGCTACACTGGATCAAATGTTAAAGTAGCGGTTATCGACAGCGGT
 ATCGACTCGAGCCATCCAGATCTTAAAGTCGCTGGAGGGGCTTCTATGGTGCCGTCCG
 AAACAAACCCGTTTCAAGATAACAATTCTCATGGCACACACGTCGCAGGAACGGTTGC
 GGCGTTAAACAATTCTATTGGCGTGCTTGGTGTTAGCCCCGTCTGCTTCGCTCTACGCC
 GTTAAAGTTCTTGGCGCAGACGGATCAGGCCAATACTCATGGATTATCAACGGCATCG
 AATGGGCCATCGCGAATAACATGGATGTAATCAACATGAGCCTGGGAGGACCAAGCG
 GCAGTGCGGCACTTAAAGCAGCAGTTGATAAAGCTGTTGCATCTGGTGTCGTCGTAGT
 AGCGGCAGCTGGGAATGAGGGAACATCCGGATCATCGAGTACCGTCGGTTATCCAGG
 CAAGTACCCTTCAGTGATTGCAGTGGGCGCTGTAGACTCTTCAAATCAACGTGCCTCT
 TTTTCCTCCGTGGGACCGGAGCTGGATGTCATGGCCCCTGGCGTTTCTATTCAATCGA
 CGCTTCCAGGGAACAAGTATGGTGCGTATAACGGGACTTCCATGGCCTCGCCGCATGT
 AGCTGGGGCGGCCGATTGATTCTTTCTAAGCACCCGAACCTGGACAAACACTCAAGTC
 CGCAGCAGTTTAGAAAACACCACTACAAAACCTTGGTGATTCTTTCTACTATGGAAAAG
 GGCTGATCAACGTACAGGCGGCAGCTCAG (SEQ ID NO:1)

[0254] En la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 1, la secuencia de ADN que codifica la proteasa madura se muestra en negrita, la secuencia nucleotídica que codifica la secuencia líder (la secuencia líder híbrida aprE-BPN') se muestra en texto estándar (sin subrayar), y la secuencia nucleotídica que codifica la secuencia pro

(BPN') está subrayada. En la secuencia de aminoácidos (secuencia líder híbrida aprE-BPN', secuencia pro BPN', y secuencia de proteína madura BPN') de la proteína BPN' precursora expuesta en la SEQ ID NO:168, la parte en negrita indica la subtilisina proteasa de BPN' madura.

VRSKKLWISLLFALALIFTMAFGSTSSAQAGKSNGEKKYIVGFKQTMSTMSAAKKKDVISEKG
GKVQKQFKYVDAASATLNEKAVKELKKDPSVAYVEEDHVAHAYAQSVPYGVSQIKAPALHS
QGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGASMVPSETNPFQDNNSHGTHVAGTVAALNNSI
GVLGVAPSASLYAVKVLGADGSGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSLGGPSGSAALKA**AVD**
KAVASGVVVVAAAGNEGTS**SGSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQ****RAFSSVGPELDV****MAP**
G**VS****IQSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSLENTTTKLGD****SFY**
YGKGLINVQAAAQ (SEQ ID NO:168)

- 5 **[0255]** Por tanto, la secuencia de aminoácidos de la subtilisina proteasa BPN' madura es:

AQSVPYGVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGASMVPSETNPFQDNNSH
GTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPSASLYAVKVLGADGSGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSLG
GPSGSAALKAAVDKAVASGVVVVAAAGNEGTS**SGSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQ****RAFSS**
SVGPELDV**MAPG****VS****IQSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSLENTT**
TKLGD**SFY****YGKGLINVQAAAQ** (SEQ ID NO:2)

[0256] La secuencia nucleotídica del gen BPN'-v3 maduro se muestra a continuación (la secuencia señal y secuencia de polipéptidos utilizadas en el casete de expresión de BPN'-v3 son las mismas que la de la BPN' que se muestra en la SEQ ID NO:1):

GCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAAATTAAAGCCCCTGCTCTGCACTCTCAAGGCTA
CACTGGATCAAATGTTAAAGTAGCGGTTATCGACAGCGGTATCGACTCGAGCCATCCAGAT
CTTAAAGTCGCTGGAGGGGCTTCTATGGTGCCGTCCGAAACAAACCCGTTTCAAGATAACA
ATTCTCATGGCACACACGTCCGAGGAACGGTTGCGGCGTTAAACAATTCTATTGGCGTGCTT
GGTGTAGCCCCGTCTGCTTCGCTCTACGCCGTTAAAGTTCTTGCAGCAGACGGATCAGGCCA
ATACTCATGGATTATCAACGGCATCGAATGGGCCATCGCGAATAACATGGATGTAATCAAC
ATGAGCCTGGGAGACCAAGCGGCAGTGCGGCACTTAAAGCAGCAGTTGATAAAGCTGTTG
CATCTGGTGTCTGTCGTAGTAGCGGCAGCTGGGAATGAGGGAACATCCGGATCATCGAGTAC
CGTCGGTTATCCAGGCAAGTACCCTTCAGTGATTGCAGTGGGCGCTGTAGACTCTTCAAATC
AACGTGCCTCTTTTTCCTCCGTGGGACCGGAGCTGGATGTCATGGCCCCTGGCGTTTCTATTC
AATCGACGCTTCCAGGGAACAAGTATGGTGCGCAAAACGGGACTTCCATGGCCTCGCCGCA
TGTAGCTGGGGCGGCCGATTGATTCTTTCTAAGCACCCGAAGTGGACAAACACTCAAGTCC
GCAGCAGTTTAGAAAACACCACTACAAAACCTTGGTGATTCTTTCTACTATGGAAAAGGGCTG
ATCAACGTACAGGCGGCAGCTCAG (SEQ ID NO:3)

10

[0257] La secuencia de proteínas de la variante de proteasa BPN'-v3 madura se muestra a continuación (la secuencia señal y la secuencia de propéptidos utilizadas en el casete de expresión de BPN'-v3 son las mismas que las de la BPN' que se muestran en la SEQ ID NO:168):

AQSVPYGVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGASMVPSETNPFQDNNSH
GTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPSASLYAVKVLADGSGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSLG
APSGSAALKAAVDKAVASGVVVVAAAGNEGTS**SGSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQ****RAFSS**
SVGPELDV**MAPG****VS****IQSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSLENTT**
TKLGD**SFY****YGKGLINVQAAAQ** (SEQ ID NO:4)

- 15 **b) Construcción de la biblioteca combinatoria utilizando un plásmido pHPLT-BPN'-v3**

[0258] El plásmido pHPLT-BPN'-v3 (véase la figura 1) que contiene el casete de expresión de BPN'-v3 descrito anteriormente sirvió como molde de ADN para la clonación para proporcionar variantes derivadas de BPN'-v3. El vector pHPLT (la figura 4 del documento de patente estadounidense n.º 6,566,112) contiene el promotor LAT de *B. licheniformis* («Plat»); una secuencia que codifica el péptido señal LAT («preLAT»). Se dan a conocer elementos de plásmidos adicionales del plásmido pUB110 en McKenzie et al., Plasmid 15(2): 93-103 (1986): «ori-pUB» es el origen de replicación del pUB110; «neo» es el gen de resistencia a la neomicina/kanamicina del pUB110; «Terminator» es el terminador transcripcional de la amilasa de *B. licheniformis*.

20

[0259] Se sintetizó una biblioteca de ADN combinatoria se sintetizó en DNA 2.0 y se proporcionó como reacciones de ligamiento individuales. En algunos ejemplos para una transformación eficiente de *B. subtilis*, el ADN de las mezclas de reacción de ligamiento se amplificó mediante una amplificación por círculo rodante (RCA, por sus siglas en inglés) utilizando el kit Illustra Templiphi (GE Healthcare). La reacción se llevó a cabo según el protocolo del fabricante. Se utilizó un microlitro de ADN amplificado diluido diez veces para transformar 50 µL de células *B. subtilis* competentes (Δ aprE, Δ nrpE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo). La mezcla de transformación se agitó a 37 °C durante 1 hora. Se colocaron alícuotas de diez microlitros de la mezcla de transformación en placas de agar Luria con leche desnatada (1,6 %) complementadas con 10 µg/ml de neomicina (Teknova).

[0260] Los transformantes que formaron halos en las placas con leche desnatada se escogieron y se colocaron en placa de microtitulación que contenía 150 µl de medio de caldo Luria complementado con 10µg/ml de neomicina. Las placas se cultivaron durante toda la noche a 37 °C con una agitación de 250-300 rpm y una humedad del 70-80 % utilizando tapas Enzyscreen para placas de microtitulación (Enzyscreen). Utilizando una herramienta de reproducción de 96 pines, (Enzyscreen) la placa de cultivo que se dejó toda la noche se utilizó para inocular una nueva placa de microtitulación que contiene 180 µl de medio MBD (un medio definido basado en MOPS) con 2,5 µg/ml de neomicina. El medio MBD se elaboró fundamentalmente del modo conocido en la técnica (véase Neidhardt et al., J. Bacteriol. 119:736-747), salvo que NH_4Cl_2 , FeSO_4 , y CaCl_2 se omitieron del medio base, se utilizó 3 mM de K_2HPO_4 , y el medio de base se complementó con 60 mM de urea, y 100ml de una solución hecha de 210 g/L de glucosa, y 350 g/L de maltodextrina. Se añadió 1 g/L de extracto de levadura Bacto BD y se ajustó el pH a 7,4 con KOH. Los micronutrientes se hicieron como una solución madre de 100 X que contenía, en un litro, 400 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mg de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 10 ml de 1M de CaCl_2 , y 10 ml de 0,5 M de citrato de sodio. El medio MBD que contiene placas de microtitulación se cultivaron durante 64 horas a 37 °C, a 250-300 rpm y en una humedad del 70-80 % utilizando tapas Enzyscreen (Enzyscreen) para la expresión de variantes de proteasas. Al día siguiente, los cultivos se filtraron a través de una placa de microfiltros (0,22 µm; Millipore) y los filtrados resultantes que contenían variantes de proteasas se utilizaron para un análisis bioquímico.

[0261] Se analizó el rendimiento de limpieza de las variantes de proteasa utilizando un ensayo de micromuestras de BMI en la Composición detergente 1 a 16 °C y pH 8, y un ensayo de micromuestras de BMI en la Composición detergente 2 a 16 °C y pH 8. El contenido en proteínas se determinó utilizando el ensayo TCA. Los ensayos se llevaron a cabo tal como se describió en el Ejemplo 1 y los Índices de rendimiento se calcularon en relación con la BPN'-v3 (con un valor de PI de 1,0).

[0262] Se determinó que la siguiente variante de subtilisina proteasa BPN' tenía un valor de PI de más de 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, de al menos 2 a aproximadamente 5, o de más de 1,0 a aproximadamente 5 relativo a la BPN'-v3 (SEQ ID NO:4) en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 1 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende el conjunto de sustituciones de aminoácidos G097A-G128A-P210S-Y217Q, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2. Dicha variante tiene un valor de PI de 1,1 en relación a la BPN'-v3 en este ensayo de limpieza de micromuestras de BMI, y una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN' (SEQ ID NO:2) y un valor de PI mayor que el de la BPN' en este ensayo.

[0263] Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI de aproximadamente 1,0 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 1 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en G097A-G128A-Y217Q, G097A-G128A-E156S-P210S-Y217Q, G097A-G128A-P210S-Y217Q-N218A, G097A-G128A-P210S-Y217Q-N218S, y G097A-Y104F-G128A-E156S-P210I-Y217Q, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

[0264] Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI de aproximadamente 0,9 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 1 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en G097A-G128A-E156A-P210S-Y217Q-N218S y G097A-G128A-Y217Q-N218A, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

[0265] Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI de más de 1,0 a aproximadamente 5 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 2 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en G097A-G128A-P210S-Y217Q-N218A y G097A-G128A-P210S-Y217Q, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

[0266] Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI de aproximadamente 1,0 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 2 a pH 8 y a

16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en G097A-G128A-Y217Q (es decir, BPN'-v3), G097A-G128A-E156S-P210S-Y217Q, y G097A-G128A-P210S-Y217Q-N218S, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

- 5 **[0267]** Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI de aproximadamente 0,9 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 2 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en G097A-G128A-E156A-P210S-Y217Q-N218S, G097A-G128A-Y217Q-N218A, y G097A-Y104F-G128A-E156S-P210I-Y217Q, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.
- 10

EJEMPLO 3

Generación de bibliotecas combinatorias y rendimiento de limpieza de las variantes de BPN'-v3 + S78N

a) Descripción de la variante de BPN'-v3 + S78N y secuencias de genes sintéticos derivadas de esta variante

- 15 **[0268]** Gene Oracle sintetizó y clonó ocho genes en el plásmido original pHPLT-BPN'-v3 + S78N (BPN'-S78N-G97A-G128A-Y217Q) (véase la Figura 2). Algunos de estos genes se utilizaron como moldes (originales) para crear bibliotecas combinatorias. La variante BPN'-v3 + S78N se generó utilizando métodos de biología molecular estándar conocida en la técnica. La secuencia nucleotídica que codifica la variante de BPN'-v3 + S78N se muestra a continuación:

GCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAAATTAAGCCCCTGCTCTGCACTCTCAAGGCTA
CACTGGATCAAATGTTAAAGTAGCGGTTATCGACAGCGGTATTGATTTCGAGCCATCCAGATC
TTAAAGTCGCTGGAGGGGCTTCTATGGTGCCGTCCGAAACAAACCCGTTTCAAGATAACAAT
TCTCATGGCACACACGTCGCAGGAACGGTTGCGGCGTTAAACAATAATATTGGCGTGCTTGG
TGTAGCCCCGTCTGCTTCGCTCTACGCCGTTAAAGTTCTTGCAGCAGACGGATCAGGCCAAT
ACTCATGGATTATCAACGGCATCGAATGGGCCATCGCGAATAACATGGATGTAATCAACAT
GAGCCTGGGAGCACCAAGCGGCAGTGCGGCACTTAAAGCAGCAGTTGATAAAGCTGTTGCA
TCTGGTGTCTGTCGTAGTAGCGGCAGCTGGGAATGAGGGAACATCCGGATCATCGAGTACCG
TCGGTTATCCAGGCAAGTACCCCTCAGTGATTGCAGTGGGCGCTGTAGACTCTTCAAATCAA
CGTGCCTCTTTTTCTCCGTGGGACCGGAGCTGGATGTCATGGCCCCTGGCGTTTCTATTCAA
TCGACGCTTCCAGGGAACAAGTATGGTGCGCAAAACGGGACTTCCATGGCCTCGCCGCATG
TAGCTGGGGCGGCCGATTGATTCTTTCTAAGCACCCGAAGTGGACAAACACTCAAGTCCGC
AGCAGTTTAGAAAACACCACTACAAAACCTGGTGATTCTTTCTACTATGGAAAAGGGCTGAT
CAACGTACAGGCGGCAGCTCAG (SEQ ID NO:7)

- 20 **[0269]** La secuencia de aminoácidos de la variante de BPN'-v3 + S78N se muestra a continuación:

AQSVPYGVSIKAPALHSQGYTGSNVKAVIDSGIDSSHPDLKVAGGASMVPSETNPFQDNNSH
GTHVAGTVAALNNNIGVLGVAPSASLYAVKVLADGSGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSLG
APSGSAALKA AVDKAVASGVVVVAAAGNEGTS GSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQ RASF
SVGP EL DVMAPGVSIQSTLPGNKYGAQNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSLENTT
TKLGDSFY YGKGLINVQAAAQ (SEQ ID NO:8)

[0270] Las secuencias de proteínas y nucleótidos de los genes GcM90-96, y GcM100 se muestran a continuación. La secuencia nucleotídica del gen GcM90 sintetizado es:

GCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAAATTAAAGCCCCTGCTCTGCACTCTCAAGGCTA
CACTGGATCAAATGTTAAAGTAGCGGTTATCGACAGCGGTATCGACTCGAGCCATCCAGAT
CTTAAAGTCGCTGGAGGGGCTTCTATGGTGCCGGGAGAAACAAACCCGTTTCAAGATAACA
ATTCTCATGGCACACACGCAGCAGGAACGGTTGCGGCGTTAAACAATAATATTGGCGTGCTT
GGTGTAGCCCCGTCTGCTTCGCTCTACGCCGTTAAAGTTCTTGCAGCAGACGGATCAGCACA
ATACTCATGGATTATCAACGGCATCGAATGGGCCATCGGAATAACATGGATGTAATCAAC
ATGAGCCTGGGAGCAACAAGCGGCAGTGCGGCACTTAAAGCAGCAGTTGATAAAGCTGTTG
CATCTGGTGTCTGTCGTAGTAGCGGCAGCTGGGAATGAGGGAACATCCGGATCATCGAGTAC
CGTCGGTTATCCAGGCAAGTACCCTTCAGTGATTGCAGTGGGCGCTGTAGACTCTTCAAATA
CACGTGCCTCTTTTTCTCCGTGGGACCGGAGCTGGATGTCATGGCCCCTGGCGTTTCTATTC
AATCGACGCTTCCAGGGAACAAGTATGGTGCGCAAAACGGGACTTCCATGGCCTCGCCGCA
TGAGCTGGGGCGGCCGCATTGATTCTTTCTAAGCACCCGAAGTGGACAAACACTCAAGTCC
GCAGCAGTTTAGAAAACACCACTACAAAACCTTGGTGATTCTTTCTACTATGGAAAAGGGCTG
ATCAACGTACAGGCGGCAGCTCAGTAA (SEQ ID NO:9)

[0271] A continuación, se proporciona la secuencia de aminoácidos de GcM90:

AQSVPYGVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGASMVPGETNPFQDNNSH
GTHAAGTVAALNNNIGVLGVAPSASLYAVKVLADGSAQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSLG
ATSGSAALKAAVDKAVASGVVVVAAAGNEGTSGSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNTRASFS
SVGPELDVMAPGVSIQSTLPGNKYGAQNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSLENTT
TKLGDSFYYGKGLINVQAAAQ (SEQ ID NO:10)

[0272] A continuación, se proporciona la secuencia nucleotídica del gen GcM91 sintetizado:

5 GCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAAATTAAAGCCCCTGCTCTGCACTCTCAAGGCTA
CACTGGATCAAATGTTAAAGTAGCGGTTATCGACAGCGGTATCGACTCGAGCCATCCAGAT
CTTAAAGTCGCTGGAGGGGCTTCTATGGTGCCGTCCGAAACAAACCCGTTTGTGCGATAACAA
TTCTCATGGCACACACGTCGCAGGAACGGTTGCGGCGTTAAACAATAATATTGGCGTGCTTG
GTGTAGCCCCGTCTGCTTCGCTCTACGCCGTTAAAGTTCTTGCAGCAGACGGATCAGGCCAA
TACTCATGGATTGTCAACGGCATCGAATGGGCCATCGGAATAACATGGATGTAATCAACA
TGAGCCTGGGAGCACCAAGCGGCAGTGCGGCACTTAAAGCAGCAGTTGATAAAGCTGTTGC
ATCTGGTCAAGTCGTAGTAGCGGCAGCTGGGAATGAGGGAACATCCGGATCATCGAGTACC
GTCGGTTATCCAGGCAAGTACCCTTCAGTGATTGCAGTGGGCGCTGTAGACTCTTCAAATCA
ACGTGCCTCTTTTTCTCCGTGGGACCGGAGCTGGATGTCATGGCCCCTGGCGTTTCTATTCA
ATCGACGCTTCCAGCAACAAGTATGGTGCGCAAAACGGGACTTCCATGGCCTCGCCGCAT
GTAGCTGGGGCGGCCGCATTGATTCTTTCTAAGCACCCGAAGTGGACAAACACTCAAGTCCG
CAGCAGTTTAGAACAAACCACTACAAAACCTTGGTGATTCTTTCTACTATGGAAAAGGGCTGA
TCAACGTACAGGCGGCAGCTCAGTAA (SEQ ID NO:11)

[0273] A continuación, se proporciona la secuencia de aminoácidos de GcM91:

AQSVPYGVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGASMVPSETNPFVDNNSH
GTHVAGTVAALNNNIGVLGVAPSASLYAVKVLADGSGQYSWIVNGIEWAIANNMDVINMSL
GAPSGSAALKAAVDKAVASGVVVVAAAGNEGTSGSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQSRAS
SSVGPELDVMAPGVSIQSTLPANKYGAQNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSLEQT
TTKLGDsfyygkglinvqaaaq (SEQ ID NO:12)

[0274] A continuación, se proporciona la secuencia nucleotídica del gen GcM92 sintetizado:

GCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAAATTAAAGCCCCTGCTCTGCACTCTCAAGGCTA
 CACTGGATCAAATGTTAAAGTAGCGGTTATCGACAGCGGTATCGACTCGAGCCATCCAGAT
 CTAAAGTCGCTGGAGGGGCTTCTATGGTGCCGTCCGAAACAAACCCGTTTCAAGATGCAA
 ATTCTCATGGCACACACGTGCGCAGGAACGGTTGCGGCGTTAAACAATAATATTGGCGTGCTT
 GGTGTAGCCCCGGAAGCTTCGCTCTACGCCGTTAAAGTTCTTGACAGCAGACGGATCAGGCCA
 ATACTCATGGATTATCAACGGCATCGAATGGGCCATCGGAATAACATGGATGTAATCAAC
 ATCAGCCTGGGAGACCAAGCGGCAGTGCGGCACTTAAAGCAGCAGTTGATAAAGCTGTTG
 CATCTGGTGTCGTCGTAGTAGCGGCAGCTGGGAATGAGGGAACATCCGGACCTTCGAGTAC
 CGTCGGTTATCCAGGCAAGTACCCTTCAGTGATTGCAGTGGGCGCTGTAGACTCTTCAAATC
 AACGTGCCTCTTTTCTCCTCCGTGGGACCGGAGCTGGATGTCATGGCCCCTGGCGTTTCTATT
 AATCGACGCTTCCAGGGAACAAGTATGGTGCGCAAAACGGGACTTCCATGGCCGCACCGCA
 TGTAGCTGGGGCGGCCGCATTGATTCTTTCTAAGCACCCGAAGTGGACAAACACTCAAGTCC
 GCAGCAGTTTAGAAAACACCACTACAAAACCTTGGTGATTCTTTCTACTATGGAAAAGGGCTG
 ATCAACGTACAGGCGGCAGCTCAGTAA (SEQ ID NO:13)

[0275] A continuación, se proporciona la secuencia de aminoácidos de GcM92:

AQSVPYGVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGASMVPSETNPFQDANSH
 GTHVAGTVAAALNNNIGVLGVAPASLYAVKVLADGSGQYSWIINGIEWAIANNMDVINISLGA
 PSGSAALKA AVDKAVASGVVVVAAAGNEGTSGPSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRAFSS
 VGPELDVMAPGVSIQSTLPGNKYGAQNGTSMAPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSLENTT
 TKLGDSFYYGKGLINVQAAAQ (SEQ ID NO:14)

[0276] A continuación, se proporciona la secuencia nucleotídica del gen de GcM93 sintetizado:

GCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAAATTAAAGCCCCTGCTCTGCACTCTCAAGGCTA
 CACTGGATCAAATGTTAAAGTAGCGGTTATCGACAGCGGTATCGACTCGAGCCATCCAGAT
 CTAAAGTCGCTGGAGGGGCTTCTATGGTGCCGTCCGAAACAAACCCGTTTCAAGATAACCA
 ATCTCATGGCACACACGTGCGCAGGAACGGTTGCGGCGTTAAACAATAATATTGGCGTGCTTG
 GTGTAGCCCCGTCTGCTTCGCTCTACGCCGTTAAAGTTCTTGACAGCAGACAACCTCAGGCCAA
 TACTCATGGATTATCAACGGCATCGAATGGGCCATCGGAATAACATGGATGTAATCAACA
 TGGCACTGGGAGACCAAGCGGCAGTGCGGCACTTAAAGCAGCAGTTGATAAAGCTGTTGC
 ATCTGGTGTCGTCGTAGTAGCGGCAGCTGGGAATGAGGGAACAGATGGATCATCGAGTACC
 GTCGGTTATCCAGGCAAGTACCCTTCAGTGATTGCAGTGGGCGCTGTAGACTCTTCAAATCA
 ACGTGCCTCTTTTCTCCTCCGTGGGACCGGAGCTGGATGTCATGGCCCCTGGCGTTTCTATTCA
 ATCGACGCTTCCAGGGAACAAGTATGGTGCGCAAAACGGGACTTCCATGGCCTCGCCGCAT
 GTAGCTGGGGCGGCCGCATTGATTCTTTCTAAGCACCCGTCATGGACAAACACTCAAGTCCG
 CAGCAGTTTAGAAAACACCACTACAAAACCTTGGTGATTCTTTCTACTATGGAAAAGGGCTGA
 TCAACGTACAGGCGGCAGCTCAGTAA (SEQ ID NO:15)

5

[0277] A continuación, se proporciona la secuencia de aminoácidos de GcM93:

AQSVPYGVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGASMVPSETNPFQDNQSH
 GTHVAGTVAAALNNNIGVLGVAPSASLYAVKVLADNSGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMALG
 APSGSAALKA AVDKAVASGVVVVAAAGNEGTDGSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRAFSS
 SVGPELDVMAPGVSIQSTLPGNKYGAQNGTSMASPHVAGAAALILSKHPSWTNTQVRSSLENTT
 TKLGDSFYYGKGLINVQAAAQ (SEQ ID NO:16)

[0278] A continuación, se proporciona la secuencia nucleotídica del gen GcM94 sintetizado:

GCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAAATTAAAGCCCCTGCTCTGCACTCTCAAGGCTA
 CACTGGATCAAATGTTAAAGTAGCGGTTATCGACAGCGGTATCGACTCGAGCCATCCAGAT
 CTAAAGTCGCTGGAGGGGCTTCTATGGTGCCGTCCGAAACAAACCCGTTTCAAGATAACA
 ATACACATGGCACACACGTCGCAGGAACGGTTGCGGCGTTAAACAATAATATTGGCGTGCT
 TGGTGTAGCCCCGTCTGCTTCGCTCTACGCCGTTAAAGTTCTTGCAGCAGACGGAGCAGGCC
 AATACTCATGGATTATCAACGGCATCGAATGGGCCATCGCGAATAACATGGATGTAATCAA
 CATGAGCGTCGGAGCACCAAGCGGCAGTGCGGCACTTAAAGCAGCAGTTGATAAAGCTGTT
 GCATCTGGTGTCTGTCGTAGTAGCGGCAGCTGGGAATGAGGGAACATCCGGATCATCGAGTA
 CCGTCCGTTATCCAGGCAAGTACCCTTCAGTGATTGCAGTGGGCGCTGTAGACTCTACAAAT
 CAACGTGCCTCTTTTTCTCCGTGGGACCGGAGCTGGATGTCATGGCCCCCTGGCGTTTCTATT
 CAATCGACGCTTCCAGGGAACAAGTATGGTGCGCAAAACGGGACTTCCATGGCCTCGCCGC
 ATGTAGCTGGGGCGGCCGCATTGATTCTTTCTAAGCACCCGAAGTGGACAAACAACCAAGT
 CCGCAGCAGTTTAGAAAACACCACTACAAAACCTTGGTGATTCTTTCTACTATGGAAAAGGGC
 TGATCAACGTACAGGCGGCAGCTCAGTAA (SEQ ID NO:17)

[0279] A continuación, se proporciona la secuencia de aminoácidos de GcM94:

AQSVPYGVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGASMVPSETNPFQDNNTH
 GTHVAGTVAALNNNIGVLGVAPSASLYAVKVLAADGAGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSVG
 APSGSAALKAAVDKAVASGVVVVAAAGNEGTS GSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSTNQRASFS
 SVGPELDVMAPGVSIQSTLPGNKYGAQNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNNQVRSSLENT
 TTKLGDSFYYGKGLINVQAAAQ (SEQ ID NO:18)

[0280] A continuación, se proporciona la secuencia nucleotídica del gen GcM 95 sintetizado:

GCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAAATTAAAGCCCCTGCTCTGCACTCTCAAGGCTA
 CACTGGATCAAATGTTAAAGTAGCGGTTATCGACAGCGGTATCGACTCGAGCCATCTGGATC
 TTAAAGTCGCTGGAGGGGCTTCTATGGTGCCGGGAGAAACAAACCCGTTTGTGATGCACA
 AACACATGGCACACACGTCGCAGGAACGGTTGCGGCGTTAAACAATAATATTGGCGTGCTT
 GGTGTAGCCCCGGAAGCTTCGCTCTACGCCGTTAAAGTTCTTGCAGCAGACAACGCAGCAC
 AATACTCATGGATTGTCAACGGCATCGAATGGGCCATCGCGAATAACATGGATGTAATCAA
 CATGAGCCTGGGAGCACCAAGCGGCAGTGCGGCACTTAAAGCAGCAGTTGATAAAGCTGTT
 GCATCTGGTGTCTGTCGTAGTAGCGGCAGCTGGGAATGAGGGAACATCCGGATCATCGAGTA
 CCGTCCGTTATCCAGGCAAGTACCCTTCAGTGATTGCAGTGGGCGCTGTAGACTCTTCAAAT
 CAACGTGCCTCTTTTTCTCCGTGGGACCGGAGCTGGATGTCATGGCCCCCTGGCGTTTCTATT
 CAATCGACGCTTCCAGGGAACAAGTATGGTGCGCAAAACGGGACTTCCATGGCCTCGCCGC
 ATGTAGCTGGGGCGGCCGCATTGATTCTTTCTAAGCACCCGAAGTGGACAAACACTCAAGTC
 CGCAGCAGTTTAGAAAACACCACTACAAAACCTTGGTGATTCTTTCTACTATGGAAAAGGGCT
 5 GATCAACGTACAGGCGGCAGCTCAGTAA (SEQ ID NO:19)

[0281] A continuación, se proporciona la secuencia de aminoácidos de GcM 95:

AQSVPYGVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHLDLKVAGGASMVPGETNPFVDAQTH
 GTHVAGTVAALNNNIGVLGVAPEASLYAVKVLADNAAQYSWIVNGIEWAIANNMDVINMSL
 GAPSGSAALKAAVDKAVASGVVVVAAAGNEGTS GSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRAF
 SSVGPELDVMAPGVSIQSTLPGNKYGAQNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSLENT
 TTKLGDSFYYGKGLINVQAAAQ (SEQ ID NO:20)

[0282] A continuación, se proporciona la secuencia nucleotídica del gen GcM96 sintetizado:

GCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAAATTAAAGCCCCTGCTCTGCACTCTCAAGGCTA
 CACTGGATCAAATGTTAAAGTAGCGGTTATCGACAGCGGTATCGACTCGAGCCATCCAGAT
 CTAAAGTCGCTGGAGGGGCTTCTATGGTGCCGTCCGAAACAAACCCGTTTCAAGATAACA
 ATTCTCATGGCACACACGTCGCAGGAACGGTTGCGGCGTTAAACAATAATATTGGCGTGCTT

GGTGTAGCCCCGTCTGCTTCGCTCTACGCCGTAAAGTTCTTGCAGCAGACGGATCAGGCCA
ATACTCATGGATTATCAACGGCATCGAATGGGCCATCGGAATAACATGGATGTAATCAAC
ATGAGCCTGGGAGCAACAAGCGGCAGTGCGGCACTTAAAGCAGCAGTTGATAAAGCTGTTG
CATCTGGTCAAGTCGTAGTAGCGGCAGCTGGGAATGAGGGAACAGATGGACCTTCGAGTAC
CGTCGGTTATCCAGGCAAGTACCCTTCAGTGATTGCAGTGGGCGCTGTAGACTCTACAAATA
CACGTGCCTCTTTTTCCTCCGTGGGACCGGAGCTGGATGTCATGGCCCCTGGCGTTTCTATTC
AATCGACGCTTCCAGCAAACAAGTATGGTGCGCAAAACGGGACTTCCATGGCCGCACCGCA
TGAGCTGGGGCGGCCGCATTGATTCTTTCTAAGCACCCGTCATGGACAAACAACCAAGTCC
GCAGCAGTTTAGAACAACCACTACAAAACCTTGGTGATTCTTTCTACTATGGAAAAGGGCTG
ATCAACGTACAGGCGGCAGCTCAGTAA (SEQ ID NO:21)

[0283] A continuación, se proporciona la secuencia de aminoácidos de GcM96:

AQSVPYGVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGASMVPSETNPFQDNNSH
GTHVAGTVAALNNNIGVLGVAPSASLYAVKVLADGSGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSLG
ATSGSAALKA AVDKAVASGVVVAAAGNEGTDGPSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSTNTRASFS
SVGPELDVMAPGVSIQSTLPANKYGAQNGTSMAPHVAGAAALILSKHPSWTNNQVRSSLEQT
TTKLGD SFYYGKGLINVQAAAQ (SEQ ID NO:22)

[0284] A continuación, se proporciona la secuencia nucleotídica del gen GcM100 sintetizado:

GCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAAATTAAGCCCCTGCTCTGCACTCTCAAGGCTA
CACTGGATCAAATGTTAAAGTAGCGGTTATCGACAGCGGTATCGACTCGAGCCATCCAGAT
CTTAAAGTCGCTGGAGGGGCTTCTATGGTGCCGTCCGAAACAAACCCGTTTCAAGATAACA
ATTCTCATGGCACACACGCAGCAGGAACGGTTGCGGCGTTAAACAATAATATTGGCGTGCTT
GGTGTAGCCCCGTCTGCTTCGCTCTACGCCGTAAAGTTCTTGCAGCAGACGGATCAGCACA
ATACTCATGGATTATCAACGGCATCGAATGGGCCATCGGAATAACATGGATGTAATCAAC
ATGGCACTGGGAGCACCAAGCGGCAGTGCGGCACTTAAAGCAGCAGTTGATAAAGCTGTTG
CATCTGGTGTCTCGTAGTAGCGGCAGCTGGGAATGAGGGAACATCCGGATCATCGAGTAC
CGTCGGTTATCCAGGCAAGTACCCTTCAGTGATTGCAGTGGGCGCTGTAGACTCTTCAAATC
AACGTGCCTCTTTTTCCTCCGTGGGACCGGAGCTGGATGTCATGGCCCCTGGCGTTTCTATTC
AATCGACGCTTCCAGCAAACAAGTATGGTGCGCAAAACGGGACTTCCATGGCCTCGCCGCA
TGAGCTGGGGCGGCCGCATTGATTCTTTCTAAGCACCCGAACTGGACAAACACTCAAGTCC
GCAGCAGTTTAGAAAACACCACTACAAAACCTTGGTGATTCTTTCTACTATGGAAAAGGGCTG
ATCAACGTACAGGCGGCAGCTCAGTAA (SEQ ID NO:23)

5

[0285] A continuación, se proporciona la secuencia de aminoácidos de GcM100:

AQSVPYGVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGASMVPSETNPFQDNNSH
GTHAAGTVAALNNNIGVLGVAPSASLYAVKVLADGSAQYSWIINGIEWAIANNMDVINMALG
APSGSAALKA AVDKAVASGVVVAAAGNEGTS SSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQ RASFS
SVGPELDVMAPGVSIQSTLPANKYGAQNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSLENTT
TKLGD SFYYGKGLINVQAAAQ (SEQ ID NO:24)

b) Construcción de bibliotecas combinatorias CG1-CG5 y CG8 utilizando los genes sintéticos GcM90-94 y GcM100

10

[0286]

Tabla 3-1. Lista de posibles sustituciones introducidas y cebadores utilizados para la construcción de las bibliotecas combinatorias CG1-CG5 y CG8				
Genes sintetizados (molde u original)	Nombre de la biblioteca	Sustituciones introducidas	Nombre del cebador	Secuencia del cebador
GcM90	CG1	G53S	1 S53 f	/5Phos/CTTCTATGGTGCCGTCCGAAACA AACCCGTTTCAAG (SEQ ID NO:25)
		A68V	1 V68 f	/5Phos/TCATGGCACACACGTCGCAGGAA CGTTGCGGCG (SEQ ID NO:26)

Tabla 3-1. Lista de posibles sustituciones introducidas y cebadores utilizados para la construcción de las bibliotecas combinatorias CG1-CG5 y CG8				
Genes sintetizados (molde u original)	Nombre de la biblioteca	Sustituciones introducidas	Nombre del cebador	Secuencia del cebador
		A102G	1 G102 f	/5Phos/AGCAGACGGATCAGGCCAATACTCATGGATTATCAAC (SEQ ID NO:27)
		T129P	1 P129 f	/5Phos/TGAGCCTGGGAGCACCAAGCGGCAGTGCGGCACTTAAAG (SEQ ID NO:28)
		T185Q	1 Q185 f	/5Phos/TAGACTCTTCAAATCAACGTGCCCTTTTTCTCCGTG (SEQ ID NO:29)
GcM91	CG2	V59Q	2 Q59 f	/5Phos/GAAACAAACCCGTTTCAAGATAACAATTCTCATG (SEQ ID NO:30)
		V108I	2 I108 f	/5Phos/ATACTCATGGATTATCAACGGCATCGAATGGGCCATC (SEQ ID NO:31)
		Q147V	2 V147 f	/5Phos/TGTTGCATCTGGTGTCTGCTGCTAGTAGCGGCAGCTGG (SEQ ID NO:32)
		A211G	2 G211 f	/5Phos/ATCGACGCTTCCAGGGAACAAGTATGGTGCGCAAAAC (SEQ ID NO:33)
		Q252N	2 N252 f	/5Phos/CAGCAGTTTAGAAAAACACCACTACAAAACCTTGGTG (SEQ ID NO:34)
GcM92	CG3	A61N	3 N61 f	/5Phos/CAAACCCGTTTCAAGATAACAATCTCATGGCACACAC (SEQ ID NO:35)
		E87S	3 S87 f	/5Phos/TTGGTGTAGCCCCGTCTGCTTCGCTCTACGCCGTTAAAG (SEQ ID NO:36)
		I124M	3 M124 f	/5Phos/TGGATGTAATCAACATGAGCCTGGAGCACCAAGCG (SEQ ID NO:37)
		P161S	3 S161 f	/5Phos/AGGGAACATCCGGATCATCGAGTACCGTCGGTTATCCAG (SEQ ID NO:38)
		A224S	3 S224 f	/5Phos/GACTTCCATGGCCTCGCCGCATGTAGCTGGGGCGGC (SEQ ID NO:39)
GcM93	CG4	Q62N	4 N62 f	/5Phos/GTTTCAAGATAACAATTCTCATGGCACACACGTCGC (SEQ ID NO:40)
		N100G	4 G100 f	/5Phos/GTTCTTGCAGCAGACGGATCAGGCCAATACTCATG (SEQ ID NO:41)
		A125S	4 S125 f	/5Phos/ATGTAATCAACATGAGCCTGGGAGCACCAAGCGGCAG (SEQ ID NO:42)
		D159S	4 S159 f	/5Phos/GGAATGAGGGAACATCCGGATCATCGAGTACCGTCGG (SEQ ID NO:43)
		S240N	4 N240 f	/5Phos/CTTTCTAAGCACCCGAACCTGGACAAACACTCAAGTCCG (SEQ ID NO:44)
GcM94	CG5	T63S	5 S63 f	/5Phos/TCAAGATAACAATTCTCATGGCACACGTCGCAGG (SEQ ID NO:45)

Tabla 3-1. Lista de posibles sustituciones introducidas y cebadores utilizados para la construcción de las bibliotecas combinatorias CG1-CG5 y CG8				
Genes sintetizados (molde u original)	Nombre de la biblioteca	Sustituciones introducidas	Nombre del cebador	Secuencia del cebador
		A101S	5 S101 f	/5Phos/TGCAGCAGACGGATCAGGCCAAT ACTCATGGATTATC (SEQ ID NO:46)
		V126L	5 L126 f	/5Phos/AATCAACATGAGCCTGGGAGCAC CAAGCGGCAGTG (SEQ ID NO:47)
		T183S	5 S183 f	/5Phos/CGCTGTAGACTCTTCAAATCAAC GTGCCTCTTTTCC (SEQ ID NO:48)
		N244T	5 T244 f	/5Phos/GAACTGGACAAACA <u>CT</u> CAAGTCC GCAGCAGTTTAG (SEQ ID NO:49)
GcM100	CG8	A68V	1 V68 f	/5Phos/TCATGGCACACACGTCGCAGGAA CGGTTGCGGCG (SEQ ID NO:50)
		A102G	1 G102 f	/5Phos/AGCAGACGGATCAGGCCAATACT CATGGATTATCAAC (SEQ ID NO:51)
		A211G	2 G211 f	/5Phos/ATCGACGCTTCCAGGGAACAAGT ATGGTGCGCAAAAC (SEQ ID NO:52)
		A125S	4 S125 f	/5Phos/ATGTAATCAACATGAGCCTGGGA GCACCAAGCGGCAG (SEQ ID NO:53)

[0287] Cada gen sintetizado se construyó en la molécula original pHPLT-BPN'-S78N-G97A-G128A-Y217Q. Los plásmidos resultantes que contienen los seis genes sintetizados GcM90-94, y GcM100 sirvieron como moldes para hacer bibliotecas combinatorias en las posiciones respectivas (Tabla 3-1). También se sintetizaron dos genes adicionales, GcM95 y GcM96 para su análisis, pero no sirvieron como ADN original para las bibliotecas. Estos genes tenían cada uno nueve mutaciones en la parte superior de la molécula original pHPLT-BPN'-S78N-G97A-G128A-Y217Q.

[0288] Los plásmidos originales (molde de ADN) que contienen los genes sintéticos GcM90-94, y GcM100 se metilaron utilizando dos microgramos de ADN y metilasa (NEB) según el protocolo NEB. El ADN metilado se purificó después utilizando un kit DNA Clean & Concentrator (Zymo Research). Las bibliotecas combinatorias CG1-5 y CG8 se fabricaron utilizando un kit de mutagénesis dirigida a múltiples sitios («kit QCMS»; Stratagene) siguiendo el protocolo del fabricante (véase la Tabla 3-1 para las respectivas combinaciones de cebador y molde), con la excepción de las bibliotecas CG3 y CG4, que utilizaron 86,5 ng de cada cebador en lugar de los 50 ng recomendados en el protocolo. Todos los cebadores utilizados para introducir las sustituciones deseadas en cada biblioteca se enumeran en la Tabla 3-1. Fueron sintetizadas y proporcionadas por Integrated DNA Technologies. Después de que las reacciones de QCMS se completaran para cada biblioteca, el molde de ADN se digirió por adición de 0,5-1 µl de *DpnI* (del kit QCMS) y se incubó a 37 °C durante 1-4 horas, seguido de otra adición de 0,5-1 µl de *DpnI* y otra incubación a 37 °C durante 1-4 horas. Para una transformación eficiente de *B. subtilis*, el ADN de las mezclas de reacción de QCMS se amplificaron antes de la transformación y los transformantes se cultivaron tal como se describió en el Ejemplo 2.

[0289] Las variantes adicionales de la BPN'-v3+S78N se produjeron mediante DNA2.0. Las siguientes sustituciones se introdujeron de forma individual en la molécula original BPN'-v3+S78N: Q59G, N62Q, V68A, S89Y, A92G, I108V, I115V, M124T, P129L, A138T, V147L, S161P, Y167A, P172V, G211T, L267V, y A273S.

[0290] Todas las variantes de la biblioteca combinatoria descritas anteriormente y las variantes sintetizadas en DNA2.0 se analizaron para observar su rendimiento de limpieza utilizando un ensayo de micromuestras de BMI en la Composición detergente 1 a 16 °C y pH 8, y un ensayo de micromuestras de BMI en la Composición detergente 2 a 16 °C y pH 8. El contenido en proteínas se determinó utilizando el ensayo TCA. Los ensayos se llevaron a cabo tal como se describió en el Ejemplo 1 y los Índices de rendimiento se calcularon en relación con la BPN'-v3 (con un valor de PI de 1,0).

[0291] Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI de más de 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de más de 1,0 a aproximadamente 10, de más de 1,0 a aproximadamente 8, o de más de 1,0 a aproximadamente 5 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición

detergente 1 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en S063T-S078N-G097A-S101A-G128A-S183T-Y217Q-T244N, N061A-S078N-G097A-G128A-Y217Q-S224A, S053G-S078N-G097A-G128A-P129T-Q185T-Y217Q, S063T-S078N-G097A-S101A-G128A-S183T-Y217Q, S063T-S078N-G097A-S101A-G128A-Y217Q, S063T-S078N-G097A-S101A-G128A-Y217Q-T244I, y S078N-G097A-G128A-P129T-Y217Q, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN' (SEQ ID NO:2) y un valor de PI mayor que el de la BPN' y BPN'-v3 en este ensayo.

[0292] Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI de aproximadamente 1,0 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 1 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en G097A-G128A-Y217Q, N061A-S078N-S087E-G097A-G128A-Y217Q-S224A, Q059V-S078N-G097A-G128A-G211A-Y217Q, Q059V-S078N-G097A-G128A-V147Q-Y217Q, Q059V-S078N-G097A-G128A-Y217Q, Q059V-S078N-G097A-I108V-G128A-Y217Q-N252Q, S053G-S078N-G097A-G128A-P129T-Y217Q, S078N-G097A-G128A-G211A-Y217Q, S078N-G097A-G128A-Q185T-Y217Q, S078N-G097A-G128A-V147Q-Y217Q, S078N-G097A-G128A-Y217Q, S078N-G097A-G128A-Y217Q-S224A, y S078N-G097A-G128A-Y217Q-S224A-A274D, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

[0293] Se determinó que la siguiente variante de BPN' tenía un valor de PI de aproximadamente 0,9 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 1 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos el conjunto de sustituciones S078N-G097A-I108V-G128A-V147Q-Y217Q, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

[0294] Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI igual o de más de 0,5 y menos de 0,9 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 1 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Q059V-S078N-G097A-I108V-G128A-V147Q-G211A-Y217Q-N252Q, S078N-G097A-I108V-G128A-V147Q-G211A-Y217Q, S078N-G097A-I108V-G128A-V147Q-G211A-Y217Q-N252Q, S078N-G097A-I108V-G128A-V147Q-Y217Q-N252Q, y S078N-S087E-G097A-M124I-G128A-Y217Q-S224A, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

[0295] Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI de más de 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de más de 1,0 a aproximadamente 10, de más de 1,0 a aproximadamente 8, o de más de 1,0 a aproximadamente 5 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 2 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en S063T-S078N-G097A-S101A-G128A-S183T-Y217Q, S063T-S078N-G097A-S101A-G128A-S183T-Y217Q-T244N, S063T-S078N-G097A-S101A-G128A-Y217Q, y S063T-S078N-G097A-S101A-G128A-Y217Q-T244I, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN' (SEQ ID NO:2) y un valor de PI mayor que el de la BPN' en este ensayo.

[0296] Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI de aproximadamente 1,0 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 2 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en G097A-G128A-Y217Q, N061A-S078N-G097A-G128A-Y217Q-S224A, N061A-S078N-S087E-G097A-G128A-Y217Q-S224A, Q059V-S078N-G097A-G128A-G211A-Y217Q, Q059V-S078N-G097A-G128A-V147Q-Y217Q, Q059V-S078N-G097A-G128A-Y217Q, Q059V-S078N-G097A-I108V-G128A-Y217Q-N252Q, S053G-S078N-G097A-G128A-P129T-Q185T-Y217Q, S053G-S078N-G097A-G128A-P129T-Y217Q, S078N-G097A-G128A-G211A-Y217Q, S078N-G097A-G128A-P129T-Y217Q, S078N-G097A-G128A-Q185T-Y217Q, S078N-G097A-G128A-Y217Q, S078N-G097A-G128A-Y217Q-S224A, y S078N-G097A-G128A-Y217Q-S224A-A274D, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

[0297] Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI de aproximadamente 0,9 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 2 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en S078N-G097A-G128A-V147Q-Y217Q y S078N-G097A-I108V-G128A-V147Q-Y217Q, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

[0298] Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI igual o de más de 0,5 y menos de 0,9 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 2

- a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Q059V-S078N-G097A-I108V-G128A-V147Q-G211A-Y217Q-N252Q, S078N-G097A-I108V-G128A-V147Q-G211A-Y217Q, S078N-G097A-I108V-G128A-V147Q-G211A-Y217Q-N252Q, S078N-G097A-I108V-G128A-V147Q-Y217Q-N252Q, y S078N-S087E-G097A-M124I-G128A-Y217Q-S224A, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con las posiciones de la secuencia de la SEQ ID NO:2.

EJEMPLO 4

Generación y rendimiento de limpieza de las variantes de BPN'

Generación de las variantes de BPN' LC1-LC4 mediante mutagénesis dirigida a múltiples sitios QUIKCHANGE®

- 10 **[0299]** Las variantes de BPN' se construyen a partir de distintos plásmidos originales utilizando kits de mutagénesis dirigida a múltiples sitios QUIKCHANGE®. Los plásmidos originales (Tabla 4-1) se metilaron utilizando un kit de Dam metilasa NEB en una reacción que contiene 77,5 µL de H₂O + 10 µL de tampón 10X + 0,25 µL de SAM + 2 µL de DAM metilasa + 10 µL miniprep de ADN (~150 ng/µL) a 37°C durante toda la noche. El ADN plasmídico metilado se purificó utilizando un kit de purificación PCR QIAGEN®. Se configuraron
- 15 reacciones de mutagénesis dirigida a múltiples sitios QUIKCHANGE® para cada uno de los moldes de ADN en una mezcla de reacción que contenía 2,5 µL de tampón 5X + 0,5 µL de cebador 1 (25 µL) + 0,5 µL de cebador 2 (25 µL) + 1 µL de dNTP + 1 µL de mezcla de enzimas + 18 µL de H₂O + 1,5 µL de ADN. El programa de PCR utilizado fue: 95 °C durante 1 min; 95 °C durante 1 min, 53 °C durante 1 min, 65 °C durante 9:39 min) x 29 ciclos; 65 °C durante 10 min, 4 °C en espera. Las secuencias del cebador se muestran en la Tabla 4-2. En todas
- 20 las reacciones, se llevó a cabo una PCR utilizando un termociclador Peltier MJ Research PTC-200. El ADN original de las muestras de la PCR se retiró mediante la adición de 1 µL de *DpnI* a las reacciones de mutagénesis dirigida a múltiples sitios QUIKCHANGE® a 37 °C durante la noche. Para aumentar la frecuencia de transformación, las reacciones digeridas por *DpnI* se amplificaron utilizando la amplificación por círculo rodante (RCA, por sus siglas en inglés) utilizando el kit Illustra Templiphi según el protocolo del fabricante. Las células de
- 25 *B. subtilis* (Δ aprE, Δ nprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo) se transformaron con 1 µL cada una de la reacción de RCA y las células transformadas se colocaron en placas con LA + leche desnatada al 1,6 % que contenían 10 ppm de neomicina y se incubaron a 37 °C durante la noche. Se seleccionaron las colonias del crecimiento durante la noche para realizar una PCR de colonia para la secuenciación utilizando «puReTaq Ready-To-Go PCR Beads» (Amersham). La PCR y los cebadores de secuenciación utilizados fueron pHPLT F1 (/5PHOS/TACATATGAGTTATGCAGTTTG (SEQ ID NO:54)) y pHPLT seq R1 (/5PHOS/TTATCCTTTACCTTGCTC (SEQ ID NO:55)). Los clones con las secuencias adecuadas se congelaron. Las variantes de proteínas BPN' se produjeron al cultivar transformantes de *B. subtilis* en placas de microtitulación de 96 pocillos a 37 °C durante 68 horas en un medio basado en MOPS que contenía urea tal como se ha descrito en el Ejemplo 2.
- 30

Tabla 4-1. Plásmidos originales y cebadores utilizados para la generación de las variantes de BPN' LC1-LC4

Plásmido original	Mutaciones introducidas	Cebadores utilizados
BPN'-G097A-G128A-Y217Q-S024G-N025G-N061P-S101N (denominado LC1)	A128S	A128Sf A128Sr
BPN'-G097A-G128A-Y217Q-S053G-N061P-S101N-V203Y (denominado LC2)	A128S	A128Sf A128Sr
BPN'-G097A-G128A-Y217Q-S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-S101N-V203Y (denominado LC3)	A128S	A128Sf A128Sr
BPN'-G097A-G128A-Y217Q-S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-S101N-V203Y (denominado LC4)	P55T	P55Tf P55Tr

35

Tabla 4-2. Secuencias de cebadores utilizados para las reacciones de mutagénesis dirigida a múltiples sitios QUIKCHANGE® para fabricar las variantes de BPN' LC1-LC4.

Nombre del cebador	Secuencia de los cebadores (5' a 3')
A128Sf	/5Phos/CAACATGAGCCTGGGATCACCAAGCGGCAGTGCGG (SEQ ID NO:56)
A128Sr	/5Phos/CCGCACTGCCGCTTGGTGATCCCAGGCTCATGTTG (SEQ ID NO:57)

Tabla 4-2. Secuencias de cebadores utilizados para las reacciones de mutagénesis dirigida a múltiples sitios QUIKCHANGE® para fabricar las variantes de BPN' LC1-LC4.

Nombre del cebador	Secuencia de los cebadores (5' a 3')
P55Tf	/5Phos/CTATGGTGCCGGGCGAAACAAACCCGTTTCAAGATCCG (SEQ ID NO:58)
P55Tr	/5Phos/CGGATCTTGAAACGGGTTTGTTCGCCCGGCACCATAG (SEQ ID NO:59)

Generación de las variantes de BPN' adicionales LC5-LC37

[0300] Unas 33 variantes adicionales de BPN' denominadas sucesivamente LC5 a LC37 se produjeron mediante DNA 2.0 utilizando el ácido nucleico BPN' como el gen original contenido en el plásmido de expresión pHPLT-BPN' parcial opt (véase la Figura 3). Las variantes de BPN' LC5 a LC37 son tal como se muestran a continuación, respectivamente: BPN'-P52L-V68A-G97A-I111V, BPN'-I111V-M124V-Y167A-Y217Q, BPN'-Y104N-G128A-Y217Q, BPN'-M124V-Y167A-Y217Q, BPN'-I111V-M124V-Y217Q, BPN'-P52L-V68A-G97A, BPN'-G97A-I111V-M124V, BPN'-V68A-A92G-G97A, BPN'-G97A-I111V-M124V-Y167A-Y217Q, BPN'-P52L-V68A-I111V-Y217Q, BPN'-P52L-V68A-I111V, BPN'-V68A-A92G-I111V, BPN'-P52L-V68A-G97A-I111V-Y217Q, BPN'-V68A-G97A-I111V, BPN'-G97A-I111V-Y217Q, BPN'-G97A-I111V-M124V-Y167A, BPN'-S89Y-I111V-M124V, BPN'-V68A-S89Y-I111V, BPN'-V68A-A92G-Y217Q, BPN'-I111V-Y167A-Y217Q, BPN'-G97A-I111V-Y167A-Y217Q, BPN'-G97A-I111V-M124V-Y217Q, BPN'-V68A-I111V-Y167A-Y217Q, BPN'-I111V-G128A-Y217Q, BPN'-G97A-M124V-Y217Q, BPN'-V68A-Y167A-Y217Q, BPN'-I111V-M124V-Y167A, BPN'-N62Q-G97A-I111V, BPN'-G97A-M124V-Y167A-Y217Q, BPN'-G97A-L126A-Y217Q, BPN'-V68A-I111V-Y217Q, BPN'-S89Y-M124V-Y217Q, y BPN'-L96T-G97A-Y217Q. El plásmido pHPLT-BPN' parcial opt también se creó con DNA 2.0.

[0301] Los transformantes se escogieron y se colocaron en placas de microtitulación y se cultivaron tal como se ha descrito en el Ejemplo 2. Se analizó el rendimiento de limpieza de las variantes utilizando un ensayo de micromuestras de BMI en la Composición detergente 2 a 16 °C y pH 8. El contenido en proteínas se determinó utilizando el ensayo TCA. Los ensayos se llevaron a cabo tal como se ha descrito en el Ejemplo 1 y los índices de rendimiento se calcularon en relación con la BPN'-v3 (con un valor de PI de 1,0).

[0302] Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI de más de 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de más de 1,0 a aproximadamente 10, de más de 1,0 a aproximadamente 8, o de más de 1,0 a aproximadamente 5 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 2 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en G097A-I111V-M124V-Y217Q, G097A-I111V-Y167A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-G097A-S101N-G128S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128S-V203Y-Y217Q, y V068A-A092G-Y217Q, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ. ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN' (SEQ ID NO:2) y un valor de PI mayor que el de la BPN' en este ensayo.

[0303] Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI de aproximadamente 1,0 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 2 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en G097A-G128A-Y217Q, G097A-G128S-Y217Q, G097A-I111V-Y217Q, I111V-G128A-Y217Q, I111V-M124V-Y167A, I111V-M124V-Y217Q, L096T-G097A-Y217Q, N062Q-G097A-I111V, S053G-N061P-G097A-S101N-G128S-V203Y-Y217Q, S089Y-M124V-Y217Q, y V068A-I111V-Y217Q, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

[0304] Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI de aproximadamente 0,9 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 2 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en G097A-I111V-M124V, G097A-L126A-Y217Q, G097A-M124V-Y217Q, I111V-Y167A-Y217Q, M124V-Y167A-Y217Q, P052L-V068A-G097A, S089Y-I111V-M124V, V068A-A092G-G097A, V068A-A092G-I111V, V068A-G097A-I111V, V068A-S089Y-I111V, y Y104N-G128A-Y217Q, donde las posiciones de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

[0305] Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI igual o de más de 0,5 y menos de 0,9 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 2 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en G097A-M124V-Y167A-Y217Q, V068A-Y167A-Y217Q, G097A-I111V-M124V-Y167A, I111V-M124V-Y167A-Y217Q, V068A-I111V-Y167A-Y217Q,

G097A-I111V-M124V-Y167A-Y217Q, y P052L-V068A-I111V, donde las posiciones de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

EJEMPLO 5

Rendimiento de limpieza de las variantes de BPN'

5 **[0306]** Las variantes se basaron en la BPN' original se hicieron con DNA 2.0. Las variantes se cultivaron tal como se ha descrito en el Ejemplo 2 y se evaluó su rendimiento de limpieza en un ensayo de micromuestras de BMI en la Composición detergente 1 a 16 °C y pH 8, un ensayo de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a 16 °C y pH 8, y un ensayo de micromuestras de huevo en la Composición detergente 4 a 16 °C y pH 8. El contenido en proteínas se determinó utilizando el ensayo TCA. Los ensayos se llevaron a cabo tal como se ha descrito en el Ejemplo 1 y los Índices de rendimiento se calcularon en relación con la BPN'-v3 (con un valor de PI de 1,0).

15 **[0307]** Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI de más de 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de más de 1,0 a aproximadamente 10, de más de 1,0 a aproximadamente 8, o de más de 1,0 a aproximadamente 5 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-G128S-Y217Q, y S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-I111V-G128S-Y217Q, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN' (SEQ ID NO:2) y un valor de PI mayor que el de la BPN' en este ensayo.

25 **[0308]** Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI de aproximadamente 1,0 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en G097A-G128A-Y217Q, G097A-G128A-P210S-Y217Q, G097A-G128S-P210S-Y217Q, G097A-I111V-M124I-Y217Q, G097A-I111V-M124V-P210S-Y217Q, G097A-N123Q-P210S-Y217Q, G097A-N123Q-Y217Q, N061P-G097A-G128A-P210S-Y217Q, N061P-G097A-G128S-Y217Q, N061P-G097A-I111V-M124V-Y217Q, N061P-G097A-N123Q-Y217Q, N061P-G097A-N123Q-Y217Q, N061P-G097A-S101N-I111V-M124V-Y217Q, N061P-G097A-S101N-N123Q-Y217Q, N061P-G102A-P129S-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100N-S101N-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100N-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100Q-P210S-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-I111V-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-S101N-I111V-Y217Q, N061P-S078N-G097A-I111V-M124I-Y217Q, N061P-S078N-G102A-I111V-P129S-Y217Q, N062Q-G097A-I111V-P210S-Y217Q, N062Q-G097A-I111V-Y217Q, N062Q-S078N-G097A-I111V-Y217Q, S024G-N025G-N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-I111V-M124V-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-N123Q-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-N062Q-G097A-S101N-I111V-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S101N-G102A-P129S-Y217Q, S053G-N061P-G097A-G128S-Y217Q, S053G-N061P-G097A-M124I-Y217Q, S053G-N061P-G097A-S101N-I111V-M124V-Y217Q, S053G-N061P-G102A-P129S-P210S-Y217Q, S053G-N061P-G102A-P129S-Y217Q, S053G-N061P-N062Q-G097A-G100N-S101N-Y217Q, S053G-N061P-N062Q-G097A-S101N-I111V-Y217Q, S053G-N061P-S101N-G102A-P129S-Y217Q, S053G-S078N-G097A-I111V-G128S-Y217Q, S078N-G097A-G128S-Y217Q, y S078N-G097A-I111V-M124V-Y217Q, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

45 **[0309]** Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI de aproximadamente 0,9 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en N061P-G097A-M124I-Y217Q, N061P-G097A-M124V-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100D-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100Q-S101N-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100Q-Y217Q, N061P-N062Q-G100N-G102A-Y217Q, N061P-N062Q-S078N-G097A-G100N-I111V-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-M124I-Y217Q, S053G-N061P-G097A-S101N-M124I-Y217Q, y S053G-N061P-G097A-S101N-N123Q-Y217Q, donde las posiciones de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

55 **[0310]** Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI igual o de más de 0,5 y de menos de 0,9 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en G097A-N123A-Y217Q, G097A-N123V-Y217Q, N061P-G102A-G128S-Y217Q, N061P-S101N-G102A-G128S-Y217Q, Y217Q, S078N-G097A-I111V-N123Q-Y217Q, y G102A-N123Q-Y217Q, donde las posiciones de la variante están numeradas por correspondencia con las posiciones de la secuencia SEQ ID NO:2.

[0311] Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI de más de 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de más de 1,0 a aproximadamente 10, de más de 1,0 a aproximadamente 8, o de más de 1,0 a aproximadamente 5 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 1 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en N061P-G097A-G128S-Y217Q, N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-S101N-I111V-Y217Q, S024G-N025G-N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-G128S-Y217Q, y S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-I111V-G128S-Y217Q, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN' (SEQ ID NO:2) y un valor de PI mayor que el de la BPN' en este ensayo.

[0312] Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI de aproximadamente 1,0 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 1 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en G097A-G128A-Y217Q, G097A-G128A-P210S-Y217Q, G097A-G128S-P210S-Y217Q, G097A-I111V-M124I-Y217Q, G097A-I111V-M124V-P210S-Y217Q, G097A-N123Q-P210S-Y217Q, G097A-N123Q-Y217Q, N061P-G097A-G128A-P210S-Y217Q, N061P-G097A-I111V-M124V-Y217Q, N061P-G097A-M124V-Y217Q, N061P-G097A-N123Q-Y217Q, N061P-G097A-S101N-I111V-M124V-Y217Q, N061P-G102A-P129S-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100N-S101N-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100Q-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-I111V-Y217Q, N061P-N062Q-S078N-G097A-G100N-I111V-Y217Q, N061P-S078N-G097A-I111V-M124I-Y217Q, N061P-S078N-G102A-I111V-P129S-Y217Q, N062Q-G097A-I111V-P210S-Y217Q, N062Q-G097A-I111V-Y217Q, N062Q-S078N-G097A-I111V-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-I111V-M124V-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-N123Q-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-N062Q-G097A-G100N-S101N-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-N062Q-G097A-S101N-I111V-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S101N-G102A-P129S-Y217Q, S053G-N061P-G097A-G128S-Y217Q, S053G-N061P-G102A-P129S-P210S-Y217Q, S053G-N061P-G102A-P129S-Y217Q, S053G-N061P-N062Q-G097A-S101N-I111V-Y217Q, S053G-N061P-S101N-G102A-P129S-Y217Q, S053G-S078N-G097A-I111V-G128S-Y217Q, S078N-G097A-G128S-Y217Q, y S078N-G097A-I111V-M124V-Y217Q, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

[0313] Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI de aproximadamente 0,9 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 1 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en N061P-G097A-M124I-Y217Q, N061P-G097A-S101N-N123Q-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100N-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100Q-P210S-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100Q-S101N-Y217Q, N061P-N062Q-G100N-G102A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-M124I-Y217Q, S053G-N061P-G097A-M124I-Y217Q, S053G-N061P-G097A-S101N-I111V-M124V-Y217Q, S053G-N061P-G097A-S101N-M124I-Y217Q, S053G-N061P-G097A-S101N-N123Q-Y217Q, y S053G-N061P-N062Q-G097A-G100N-S101N-Y217Q, donde las posiciones de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

[0314] Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI igual o mayor que 0,5 y menor que 0,9 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 1 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en G097A-N123A-Y217Q, G097A-N123V-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100D-Y217Q, N061P-S101N-G102A-G128S-Y217Q, N061P-G102A-G128S-Y217Q, S078N-G097A-I111V-N123Q-Y217Q, y G102A-N123Q-Y217Q, donde las posiciones de la variante están numeradas por correspondencia con las posiciones de la secuencia SEQ ID NO:2.

[0315] Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI de más de 1,0 a aproximadamente 5 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de huevo en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende el conjunto de sustituciones de aminoácidos N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN' (SEQ ID NO:2) y un valor de PI mayor que el de la BPN' en este ensayo.

[0316] Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI de aproximadamente 1,0 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de huevo en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en G097A-G128A-Y217Q, N061P-G102A-P129S-Y217Q, N062Q-G097A-I111V-P210S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q, S024G-N025G-N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q, N061P-G097A-G128A-P210S-Y217Q, G097A-

G128S-P210S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-I111V-G128S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-G128S-Y217Q, N061P-G097A-G128S-Y217Q, y G097A-G128A-P210S-Y217Q, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

5 **[0317]** Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI igual o mayor que 0,5 e igual o menor que 0,9 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de huevo en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en N061P-G097A-M124I-Y217Q, S053G-N061P-G097A-S101N-N123Q-Y217Q, S053G-N061P-G102A-P129S-P210S-Y217Q, G097A-I111V-M124V-P210S-Y217Q, G097A-N123Q-P210S-Y217Q, S053G-N061P-S101N-G102A-P129S-Y217Q, S053G-N061P-N062Q-G097A-S101N-I111V-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-S101N-I111V-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-I111V-Y217Q, N061P-G097A-S101N-I111V-M124V-Y217Q, G097A-N123Q-Y217Q, N061P-G097A-I111V-M124V-Y217Q, S078N-G097A-I111V-M124V-Y217Q, S053G-S078N-G097A-I111V-G128S-Y217Q, S078N-G097A-G128S-Y217Q, S053G-N061P-G097A-G128S-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100N-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-N123Q-Y217Q, N061P-G097A-S101N-N123Q-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100Q-P210S-Y217Q, N061P-G097A-N123Q-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-M124I-Y217Q, S053G-N061P-G097A-S101N-M124I-Y217Q, S053G-N061P-G097A-M124I-Y217Q, N061P-S078N-G097A-I111V-M124I-Y217Q, N061P-G097A-M124V-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-N062Q-G097A-G100N-S101N-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S101N-G102A-P129S-Y217Q, N061P-S078N-G102A-I111V-P129S-Y217Q, S053G-N061P-G102A-P129S-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-N062Q-G097A-S101N-I111V-Y217Q, N062Q-S078N-G097A-I111V-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-I111V-M124V-Y217Q, S053G-N061P-G097A-S101N-I111V-M124V-Y217Q, G097A-I111V-M124I-Y217Q, Y217Q, N061P-N062Q-G100N-G102A-Y217Q, S053G-N061P-N062Q-G097A-G100N-S101N-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100N-S101N-Y217Q, N061P-N062Q-S078N-G097A-G100N-I111V-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100Q-Y217Q, N061P-S101N-G102A-G128S-Y217Q, G097A-N123V-Y217Q, G097A-N123A-Y217Q, G102A-N123Q-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100Q-S101N-Y217Q, S078N-G097A-I111V-N123Q-Y217Q, N061P-N062Q-G097A-G100D-Y217Q, y N061P-G102A-G128S-Y217Q, donde las posiciones de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2

30 EJEMPLO 6

Construcción y rendimiento de limpieza de las variantes de BPN'

[0318] Se fabricó una biblioteca combinatoria de BPN' basada en BPN' original mediante DNA2.0 y se proporcionaron como una reacción de ligamiento. Para una transformación eficiente de *B. subtilis*, el ADN de las mezclas de reacción de ligamiento se amplificó antes de la transformación y los transformantes se cultivaron tal como se describió en el Ejemplo 2. Se analizaron estas variantes para observar su rendimiento de limpieza utilizando un ensayo de micromuestras de BMI en la Composición detergente 1 y en la Composición detergente 4 a 16 °C y pH 8, así como un ensayo de micromuestras de huevo en la Composición detergente 4 a 16 °C y pH 8. El contenido en proteínas se determinó utilizando el ensayo TCA y la actividad de proteasa se analizó utilizando el ensayo AAPF. Los ensayos se llevaron a cabo tal como se ha descrito en el Ejemplo 1 y los índices de rendimiento se calcularon en relación con la BPN'-v3 (con un valor de PI de 1.0).

[illegible]

S053G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S053G-T055P-N061P-S101N-G128A-Y217Q, S053G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, y T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN' (SEQ ID NO:2) y un valor de PI mayor que el de la BPN' en este ensayo.

[0320] Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI de aproximadamente 1,0 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 1 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en G097A-G128S-Y217Q, G097A-G128A-Y217Q, N025G-S078N-G097A-G128A-Y217Q, N025G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-I035V-T055P-N061P-S078N-G097A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A, S024G-N025G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-G128A-S130G-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-Y217Q, S024G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S038G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A, S024G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S101N-G128A-Y217Q, T055P-N061P-G097A-A116S-G128A, y T055P-N061P-S078N-G128A-Y217Q, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

[0321] Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI de más de 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de más de 1,0 a aproximadamente 10, de más de 1,0 a aproximadamente 8, o de más de 1,0 a aproximadamente 5 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en S024G-N025G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S053G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, y T055P-N061P-S078N-G128A-Y217Q, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN' (SEQ ID NO:2) y un valor de PI mayor que el de la BPN' en este ensayo.

[0322] Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI de aproximadamente 1,0 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en G097A-G128S-Y217Q, G097A-G128A-Y217Q, N025G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S038G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-N061P-S078N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S078N-G097A-G128A-Y217Q, N025G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, N061P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-I035V-T055P-N061P-S078N-G097A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A, S024G-N025G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-G128A-S130G-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S038G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-N061P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-S053G-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S078N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-N061P-S078N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S078N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-T055P-N061P-G097A-G128A-

Y217Q, S024G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A, S024G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S053G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q-S249N, S053G-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S053G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S053G-T055P-N061P-S101N-G128A-Y217Q, S053G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S101N-G128A-Y217Q, T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, y T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

[0323] Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI de aproximadamente 0,9 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en T055P-N061P-G097A-A116S-G128A y S024G-N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-Y217Q, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

[0324] Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI de más de 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de más de 1,0 a aproximadamente 10, de más de 1,0 a aproximadamente 8, o de más de 1,0 a aproximadamente 5 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de huevo en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N061P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-N061P-S078N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S053G-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, y S024G-N025G-S053G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN' (SEQ ID NO:2) y un valor de PI mayor que el de la BPN' en este ensayo.

[0325] Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI de aproximadamente 1,0 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de huevo en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en G097A-G128S-Y217Q, G097A-G128A-Y217Q, S024G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S053G-T055P-N061P-S101N-G128A-Y217Q, S053G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, T055P-N061P-S078N-G128A-Y217Q, N025G-S038G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, T055P-N061P-G097A-A116S-G128A, S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S053G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-Y217Q, y S024G-I035V-T055P-N061P-S078N-G097A-Y217Q, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

[0326] Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI de aproximadamente 0,9 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de huevo en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en S101N-G128A-Y217Q, S024G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A, S024G-N025G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A, S024G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S053G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q-S249N, N025G-S053G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-N061P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-T055P-N061P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-S038G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S053G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S078N-G097A-G128A-Y217Q, y S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-G128A-S130G-Y217Q, donde las posiciones de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

[0327] Se determinó que la siguiente variante de BPN' tenía un valor de PI de aproximadamente 0,8 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de huevo en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende las sustituciones de aminoácidos S024G-S053G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, donde las posiciones de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

[0328] Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI de más de 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de más de 1,0 a aproximadamente 10, de más de 1,0 a aproximadamente 12, de más de 4 a aproximadamente 12, de más de 1,0 a aproximadamente 8, o de más de 1,0 a aproximadamente 5 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo proteolítico de AAPF: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en S024G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S101N-G128A-Y217Q, N025G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S053G-T055P-N061P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A, S053G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A, N061P-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-S101N-G128A-Y217Q, N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, T055P-N061P-S078N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S038G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-G128A-Y217Q, N025G-S053G-N061P-S078N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S053G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q-S249N, N025G-S053G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, T055P-N061P-G097A-A116S-G128A, S024G-N025G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q, G097A-G128S-Y217Q, S024G-S053G-N061P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-N061P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S053G-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-T055P-N061P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-S038G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q, S053G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S053G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-N025G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, S024G-N025G-S053G-T055P-G097A-G128A-Y217Q, N025G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-G097A-S101N-G128A-Y217Q, S024G-S053G-N061P-S078N-G097A-G128A-Y217Q, S024G-S053G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q, N025G-S078N-G097A-G128A-Y217Q, y S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-G128A-S130G-Y217Q, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la proteasa BPN' (SEQ ID NO:2) y un valor de PI mayor que el de la BPN' en este ensayo.

[0329] Se determinó que la siguiente variante de BPN' tenía un valor de PI de aproximadamente 1,0 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo proteolítico de AAPF: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende las sustituciones de aminoácidos G097A-G128A-Y217Q, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

EJEMPLO 7

Construcción de bibliotecas de evaluación de sitio de BPN'-v36 y rendimiento de limpieza de las variantes de BPN'-v36

Construcción de las bibliotecas de evaluación de sitio de BPN'-v36

[0330] La secuencia de aminoácidos de BPN'-v36 se expone en la SEQ ID NO:6 a continuación:

AQSVPYGVSQIKAPALHSQGYTGGNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGASMVPGETNPFQDNNSH
GTHVAGTVAALNNNIGVLGVAPSASLYAVKVLGADGNGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSLG
APSGSAALKA AVDKAVASGVVVVAAAGNEGTS GSSSTVGYPGKYPSVIAVGA VDSSNQ RASFS
SVGPELDVMAPGVSIQSTLPGNKYGAQNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSLENTT
TKLGDSFYYGKGLINVQAAAQ (SEQ ID NO:6)

[0331] La secuencia de ácidos nucleicos que codifica la variante de proteasa BPN'-v36 es:

Gcgcagtcctgtccttacggcgatcacaaataaagccctgctctgcactctcaaggtacactggaggcaatgttaaagtagcgggtatcgacagc
ggatcgactcgagccatccagatcttaaagtcgctggaggggcttctatggtgccggcgaaacaacccgtttcaagataacaattctcatggcacac
acgtcgcaggaacgggtgcggcgtaaacaataattggcgtgcttggttagccccgtctgcttcgctctacgccgttaaagttcttggcgcagacgga
aatggccaatactcatggattatcaacggcatcgaatgggccatcggaataacatggaatgtaataacatgagcctgggagcaccagcggcagtcg
ggcacttaaagcagcagttgataaagctgttgcatctggtgtcgtctgtagtagcggcagctgggaatgagggaaacatccggatcatcgagtaccgtcgg
ttatccaggcaagtacccttcagtgattgcagtgggcgctgtagactcttcaaatcaactgcctcttttctcctgtgggaccggagctggatgcatggc
ccctggcggtttctattcaatcgacgcttcagggaacaagtatggtgcgcaaacgggacttcattggcctcgccgcagtagctggggcgggccgcatt
gattctttctaagcaccggaactggacaacactcaagtcgcagcagtttagaaaacaccactacaaaacttggtgattctttctactatggaaaagggtc
gatcaacgtacaggcggcagctcag (SEQ ID NO:5)

- [0332]** La secuencia de aminoácidos de BPN'-v36 puede representarse por referencia a la secuencia de aminoácidos de subtilisina BPN' de la SEQ ID NO:2. Esto es, la BPN'-v36 puede representarse como la secuencia de subtilisina BPN' de la SEQ ID NO:2 con las seis sustituciones de aminoácidos S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q. La secuencia de aminoácidos de BPN'-v36 puede designarse de forma conveniente como BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q o BPN'+S024G+S053G+S078N+S101N+G128A+Y217Q. A lo largo de la presente memoria, a menos que se indique lo contrario, cada posición de aminoácidos de una secuencia de aminoácido se numera según la numeración de la posición de aminoácido correspondiente en la secuencia de aminoácidos de subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en la SEQ ID NO:2, según lo determinado por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la variante con la secuencia de aminoácidos de subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

- [0333]** Las bibliotecas de evaluación de sitio (SEL, por sus siglas en inglés) se crearon en todas las posiciones de aminoácidos en una proteína BPN'-v36 madura (es decir, BPN'-S24G-S53G-S78N-S101N-G128A-Y217Q) por fusión de PCR.

- [0334]** Para cada codón que se ha de mutar en la proteasa BPN'-v36, se diseñó un par de cebadores (mutagénicos directos e inversos) complementarios que se solapan parcialmente. Cada cebador mutagénico contenía el codón mutagénico NNS (N=A,C,G o T y S=G o C) en el centro flanqueado por al menos 15 nucleótidos a cada lado. Para crear una biblioteca en una posición determinada, se llevaron a cabo dos reacciones PCR utilizando o bien un cebador directo flanqueador de genes (P4974, GCCTCACATTTGTGCCACCTA; SEQ ID NO:60) y un cebador inverso NNS mutagénico, o el cebador flanqueador de genes inverso común (P4976, CCTCTCGGTTATGAGTTAGTTC; SEQ ID NO:61) y un cebador directo NNS mutagénico. Estas reacciones PCR generaron dos fragmentos de PCR, uno codificando la mitad 5' del gen BPN'-v36 mutante (fragmento de gen 5') y el otro codificando la mitad 3' del gen BPN'-v36 mutante (fragmento de gen 3').

- [0335]** Cada reacción de amplificación por PCR contenía 30 pmol de cada cebador y 100 ng del molde de ADN original de BPN'-v36 (plásmido pHPLT-BPN'-v36, véase la figura 4). Las amplificaciones se llevaron a cabo utilizando la ADN polimerasa Vent (NEB). La reacción PCR (20 µL) se calentó inicialmente a 95 °C durante 2,5 minutos seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 15 segundos, se dejó renaturalizar a 55 °C durante 15 segundos, y se extendió a 72 °C durante 40 segundos. Tras la amplificación, los fragmentos del gen 5' y 3' se purificaron con gel mediante el kit de purificación por bandas de gel QIAGEN®, se mezclaron (50 ng de cada fragmento), se mezclaron y se amplificaron por PRC una vez de nuevo utilizando los cebadores P4973 (AAAGGATCCTAATCGGCGCTTTTC; SEQ ID NO:62) y P4950 (CTTGTCTCCAAGCTTAAAATAAAA; SEQ ID NO:63) para generar el fragmento de gen de longitud completa. Las condiciones de la PCR eran las mismas que las descritas anteriormente, excepto por la fase de extensión, que se llevó a cabo a 72 °C durante 2 minutos. El fragmento de ADN de longitud completa se purificó con gel mediante el kit purificación por bandas de gel QIAGEN®, se digirió por las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III y se ligó con el vector pHPLT-BPN' parcial opt que también se digirió con las mismas enzimas de restricción. Las mezclas de ligamiento se amplificaron

utilizando la amplificación por círculo rodante en un kit Templiphi Illustra según la recomendación del fabricante (GE Healthcare) para generar ADN multímero para la transformación en *Bacillus subtilis*. Para este propósito, se mezcló 1 µl de la mezcla de ligamiento con 5 µl del tampón de muestra, se calentó a 95 °C durante 3 minutos y se enfrió en hielo. Después, se añadieron 5 µl del tampón de reacción y 0,2 µl de la enzima a cada tubo, seguido de una incubación a 30 °C durante 10 horas. Los productos de la amplificación por círculo rodante se diluyeron 100 veces y se utilizaron para transformar células de *B. subtilis* (Δ prE, Δ nprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo). Una alícuota de la mezcla de la transformación se colocó en placas LB que contenían leche descremada al 1,6 % y 10 µg/mL de neomicina y se incubaron durante toda la noche a 37 °C. Posteriormente, las colonias con halos se inocularon en 150 µl de medio LB que contenía 10 µg/mL de neomicina. Al día siguiente, los cultivos se congelaron con glicerol al 15 %, o se cultivaron en medio MBD para su análisis bioquímico tal como se ha descrito en el Ejemplo 2.

Rendimiento de limpieza de las variantes de BPN'-v36

[0336] Se analizaron las variantes de proteínas de la BPN'-v36 SEL para observar su rendimiento de limpieza utilizando un ensayo de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a 16 °C y pH 8, y un ensayo de micromuestras de huevo en la Composición detergente 4 a 16 °C y pH 8. El contenido en proteínas se determinó utilizando el ensayo TCA. Los ensayos se llevaron a cabo tal como se ha descrito en el Ejemplo 1 y los índices de rendimiento se calcularon en relación con la BPN'-v36 (es decir, BPN'-S24G-S53G-S78N-S101N-G128A-Y217Q) (con un valor de PI de 1,0).

[0337] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de más de 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de más de 1,0 a aproximadamente 10, de más de 1,0 a aproximadamente 8, o de más de 1,0 a aproximadamente 5 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) (es decir, BPN'-v36) que comprende al menos una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en A116V, G160S, I111L, I115V, N109S, N117M, P005G, Q059V, T164S, Y262M, A015Q, A015S, A098E, A098N, A098S, A098T, A098V, A098Y, A114S, A114T, A116G, A116L, A116S, A116T, A116W, A133G, A133H, A133T, A133V, A137G, A137I, A137L, A137S, A137T, A138S, A216E, A216F, A216V, D099S, D181E, F261A, F261Q, G024F, G024I, G024Q, G024Y, G097S, G160T, G211L, G211V, H017F, H017W, H039V, H226A, I031V, I111V, I268V, K170R, K265R, L016Q, L016T, L135M, L209T, L209V, L233M, L257T, L257V, L267A, L267V, N025A, N025I, N025Q, N025R, N025T, N025V, N101I, N101Q, N101S, N109A, N109G, N109H, N109L, N109M, N109Q, N109T, N117Q, N184A, N184L, N184T, N184W, N212G, N212L, N212V, N243P, N252G, N252M, P005T, P014S, P040G, P040L, P129A, P129S, P172G, P172S, P194Q, P210A, P210S, Q185F, Q185G, Q185I, Q185M, Q185N, Q185S, Q275H, R186K, S009A, S009G, S009H, S009M, S018T, S130T, S132N, S145K, S159T, S161I, S161K, S161N, S161T, S162I, S162M, S162Y, S163G, S182F, S182G, S182V, S182W, S183F, S183L, S183M, S183T, S183V, S183W, S224A, S236T, S249V, T022A, T022G, T022Q, T022V, T208V, T242S, T253N, T253S, T254A, T254S, T255L, T255S, T255V, V004A, V004P, V004W, V084C, V139C, V165M, V203F, Y021K, Y021N, Y021T, Y021V, Y167F, Y171F, Y214F, Y262F, y Y262T, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN' (SEQ ID NO:2) y un valor de PI mayor que el de la BPN' en este ensayo.

[0338] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de aproximadamente 1,0 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en A001G, A001Y, A013G, A013V, A015F, A015G, A015K, A015M, A015P, A015T, A015W, A015Y, A029G, A073S, A088C, A088I, A088L, A088T, A088V, A098D, A098K, A098P, A098R, A098W, A116D, A116E, A116R, A128S, A133L, A133M, A133S, A134G, A134S, A137N, A137V, A144M, A144Q, A144S, A144T, A144V, A151C, A176S, A176T, A179S, A216G, A216L, A216P, A216Q, A216S, A216T, A216Y, A228T, A230C, A231C, A272I, A272L, A272Q, A272S, A272T, A272W, A273S, A274G, A274L, A274Q, A274T, A274V, D041E, D099G, D099N, D120A, D120K, D120Q, D120R, D120S, D140E, D181S, D259E, E054D, E156D, E156T, E251V, F261G, F261H, F261L, F261R, F261S, F261T, F261V, F261W, G007A, G007S, G020A, G020D, G020S, G024N, G024R, G024S, G024T, G024V, G024W, G053H, G053K, G053N, G053T, G097A, G097D, G097T, G131A, G131H, G131P, G131Q, G131T, G131V, G160H, G160P, G166A, G166S, G166T, G211A, G211D, G211M, G211N, G211P, G211Q, G211R, G211W, G215A, G215N, G215V, H017L, H017M, H017T, H017V, H017Y, H039A, H039C, H039N, H226F, H226I, H226M, H226S, H226V, H226Y, I035V, I079A, I079S, I079T, I079V, I079W, I108V, I115L, I122A, I234L, I234V, K012R, K027R, K136R, K141F, K213W, K237R, K256R, K265Q, L016A, L016F, L016I, L016S, L016V, L042I, L075A, L075M, L075Q, L075V, L075Y, L082K, L082M, L082Q, L082V, L090I, L196I, L196V, L209Q, L209W, L233A, L233Q, L233V, L235I, L235K, L250I, L257A, L257H, L257Q, L257S, L257Y, L267Q, L267R, L267S, L267T, M199V, N025F, N025G, N025H, N025K, N025L, N025M, N025S, N025Y, N061F, N061H, N061P, N061S, N061T, N061V, N061W, N076G, N076W, N078S, N078T, N078V, N101A, N101H, N101L, N101T, N109K, N109R, N117A, N117E, N117H, N117K, N118G, N184G, N184H, N184I, N184S, N184V, N212A, N212F, N212I, N212K, N212P, N212Q, N212S, N212Y, N218A, N218H, N218L, N218S, N240E, N240H, N240L,

N240R, N240T, N243A, N243Q, N243T, N243V, N252A, N252K, N252L, N252Q, N252R, N252S, N252T, N269Q, N269S, P014G, P014Q, P014T, P040A, P040H, P040S, P040T, P040V, P040Y, P086A, P086C, P086F, P086H, P086S, P129D, P129G, P129K, P129T, P172A, P172Q, P194A, P194G, P194L, P194M, P194S, P194V, P194Y, P210G, P210R, P210V, Q002A, Q002S, Q010A, Q010F, Q010H, Q010I, Q010L, Q010N, Q010S, Q010T, Q019A, Q019G, Q019N, Q019S, Q019T, Q019V, Q019W, Q059I, Q103L, Q103S, Q185A, Q185H, Q185L, Q185T, Q185Y, Q206P, Q206S, Q206Y, Q217I, Q217N, Q217S, Q217T, Q245K, Q275D, Q275S, Q275W, S003A, S003G, S003H, S003M, S003P, S003Q, S003T, S003V, S009I, S009L, S009P, S009T, S009W, S018A, S018G, S018I, S018L, S018M, S018N, S018P, S018V, S018W, S033T, S037Q, S037T, S037V, S038G, S038H, S038K, S038Q, S038T, S063K, S063N, S063Q, S063T, S087A, S087F, S087G, S087Q, S087T, S089L, S089M, S089N, S089Q, S089T, S089W, S130A, S130F, S130G, S130L, S130V, S145A, S145H, S145M, S145V, S159A, S159G, S159H, S159Q, S159R, S161A, S161G, S161H, S161L, S161M, S161P, S161Q, S161W, S162A, S162F, S162G, S162L, S162N, S162P, S162R, S162V, S163P, S173A, S173G, S182A, S182H, S182K, S182L, S182N, S182P, S182Q, S182T, S183A, S183G, S183H, S183Q, S188A, S188G, S188T, S188V, S191A, S204A, S204I, S204L, S204Q, S204V, S224C, S236A, S236N, S236Q, S248A, S248F, S248G, S248I, S248K, S248L, S248M, S248N, S248Q, S248T, S248V, S249A, S249C, S249H, S249Q, S249T, S249W, S249Y, S260H, S260N, S260P, S260T, T022H, T022K, T022N, T022R, T022S, T022Y, T055A, T055G, T055L, T055N, T055P, T055Q, T071S, T158H, T158S, T164N, T208C, T208L, T220S, T242N, T244A, T244G, T244H, T244I, T244Q, T244S, T244V, T244W, T253A, T253G, T253H, T253Q, T254V, T255A, T255G, T255H, T255I, T255Q, T255Y, V004G, V004N, V004R, V008A, V008C, V008M, V026I, V044I, V044L, V045H, V045K, V045L, V045M, V045Q, V045S, V045V, V045W, V045Y, V051I, V081L, V081Q, V081T, V084A, V084S, V084T, V093I, V121I, V143N, V143S, V143Y, V147C, V147I, V147L, V147T, V180I, V180L, V180T, V192A, V192S, V192T, V198I, V198L, V198M, V203H, V203I, V203L, V203N, V203Q, V203T, V203W, V203Y, V270A, V270S, V270T, W241M, W241Y, Y006G, Y006H, Y006I, Y006K, Y006L, Y006P, Y006Q, Y006T, Y006V, Y006W, Y021A, Y021D, Y021E, Y021L, Y021Q, Y021R, Y021S, Y104F, Y104I, Y214L, Y214V, Y214W, Y262A, Y262G, Y262L, Y262N, Y262S, Y262W, Y263G, y Y263W, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN' (SEQ ID NO:2) y un valor de PI mayor que el de la BPN' en este ensayo.

[0339] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de aproximadamente 0,9 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en A001F, A001K, A001L, A001M, A001Q, A001R, A001S, A001T, A001V, A013C, A013S, A015D, A015E, A015R, A048S, A073N, A073T, A074G, A074S, A085C, A085G, A085S, A085V, A088M, A088S, A092S, A098G, A114G, A133P, A137E, A137H, A144G, A144H, A144K, A144L, A144N, A153S, A153V, A176C, A179G, A187G, A187S, A200G, A216W, A223S, A228S, A230T, A230V, A231V, A232C, A232V, A272E, A272G, A272K, A272P, A273G, A273L, A273V, A274M, A274R, D036E, D099A, D099Q, D120E, D181A, D181G, D259A, D259G, D259Q, D259T, E156A, E156S, E251I, E251L, E251Q, E251T, F058Y, F261C, F261D, F261K, F261P, G020E, G020F, G020H, G020L, G020N, G020Q, G020R, G020T, G020Y, G024A, G024P, G053A, G053D, G053E, G053F, G053L, G053Q, G053S, G053Y, G097K, G097M, G157A, G157S, G160A, G160L, G166C, G166I, G166Q, G169A, G211K, G215H, G215L, G215S, G215T, G215W, G258S, H017I, H039S, H226L, H238N, H238Y, I011L, I011V, I031L, I079F, I079K, I079L, I079M, I079Q, I205A, I205V, I268L, I268M, K012G, K043F, K043H, K043I, K043N, K043Q, K043T, K141A, K141R, K141W, K170A, K213A, K213G, K213H, K213I, K213L, K213N, K213Q, K213R, K213S, K213T, K213V, K237A, K237H, K237I, K237L, K237N, K237S, K256A, K256G, K256H, K256M, K256P, K256Q, K256W, K265H, L016E, L042V, L075G, L075H, L075I, L075T, L082A, L082F, L082H, L082R, L082S, L082T, L090M, L135F, L196M, L209C, L209H, L209S, L233S, L235M, L235R, L235W, L257C, L257G, L267F, M050Y, M119C, M119I, M124L, N025C, N025E, N025P, N061A, N061G, N061I, N061K, N061L, N061Q, N061R, N062S, N062T, N076A, N076P, N076Q, N076S, N076T, N076V, N078G, N078H, N078K, N078P, N078Q, N078R, N101F, N117R, N117S, N118D, N118H, N118Q, N118R, N118S, N118T, N184C, N184E, N184R, N212D, N212R, N212W, N218F, N218G, N218M, N218P, N218T, N218V, N218W, N240A, N240G, N240Q, N240S, N240W, N243C, N243G, N243S, N252V, N269H, P005A, P005D, P005M, P005Q, P014A, P014M, P014R, P014V, P040F, P040R, P040W, P129E, P129R, P172E, P172K, P194H, P194R, P194W, P201A, P201G, P210L, P239K, P239R, Q002D, Q002E, Q002G, Q002I, Q002P, Q002V, Q010D, Q010R, Q019C, Q019D, Q019E, Q019H, Q019L, Q019P, Q019R, Q059A, Q059E, Q059L, Q059S, Q059T, Q103W, Q185D, Q185K, Q185R, Q185W, Q206G, Q206H, Q206L, Q206V, Q206W, Q217E, Q217F, Q217H, Q217L, Q217Q, Q217V, Q245M, Q271A, Q271D, Q271G, Q271I, Q271P, Q271T, Q271Y, Q275F, Q275L, Q275P, Q275R, S003D, S003F, S003K, S003R, S009K, S018D, S018R, S037A, S037G, S037K, S037L, S037P, S038M, S063A, S063F, S063G, S063M, S063R, S063Y, S087C, S087K, S087L, S087M, S087N, S087Y, S089A, S089D, S089F, S089G, S089H, S089I, S089K, S089R, S089V, S089Y, S130D, S130E, S130K, S130W, S145G, S145L, S145R, S145T, S159D, S159L, S159W, S161E, S161R, S162C, S162E, S162W, S163A, S182E, S182R, S183C, S183D, S183P, S183R, S188D, S188P, S204G, S204Y, S207G, S224G, S224T, S236C, S236G, S248D, S248H, S248R, S249E, S249L, S249R, S260A, S260K, S260Q, S260V, S260Y, T022L, T055D, T055E, T055I, T055K, T055M, T055S, T055V, T055Y, T158A, T158G, T158L, T158Q, T158V, T164K, T164Q, T208S, T244D, T244E, T244R, T253E, T253R, T253Y, T254G, T255D, T255E, T255K, T255R, V026A, V028I, V028L, V030I, V044C, V044P, V045E, V045G, V045N, V072L, V081A, V081G, V081H, V081S, V084I, V084M, V095A, V095C, V143A, V143F,

V143H, V143Q, V143T, V143W, V147A, V147Q, V147S, V148I, V148L, V149C, V149I, V149L, V165L, V180A, V180C, V180M, V192C, V192F, V192I, V192Q, V192Y, V203A, V203G, V203K, V203S, V270C, V270L, V270P, W241F, Y006A, Y006M, Y006N, Y006R, Y006S, Y021C, Y091W, Y104V, Y104W, Y262C, Y262D, Y262E, Y262H, Y262I, Y262R, y Y262V, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes pueden tener una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN' (SEQ ID NO:2) y/o un valor de PI mayor que el de la BPN' en este ensayo.

[0340] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI igual o mayor que 0,5 y menor que 0,9 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en A001D, A001H, A001N, A015C, A048C, A048E, A085T, A133R, A137R, A142C, A144D, A144R, A152S, A153G, A187P, A187Q, A187T, A187V, A216R, A230S, A272R, A273H, A273T, A274H, D036N, D036S, D181H, D181T, D259N, D259P, D259S, E156G, E156H, E156L, E156Q, E156V, E251C, F189S, F189T, F189W, F189Y, F261E, G020C, G024D, G053M, G053R, G097R, G131D, G131R, G157N, G160R, G160V, G166L, G166W, G211E, G215D, G258A, G258D, G258P, I011T, I031C, I079E, I079R, I175L, I205C, K012H, K012N, K027A, K027N, K027S, K043A, K043D, K043E, K043G, K043L, K043M, K043P, K043V, K043W, K043Y, K136H, K141H, K141L, K141M, K141N, K141Q, K141T, K141V, K170G, K170S, K237T, K237V, K256D, K256S, K256T, K256V, K265N, K265S, L042F, L042M, L082E, L209A, L209E, L209G, L209R, L233G, L235V, L257D, L257E, L257P, L257R, L257W, L267E, M050L, N056D, N056S, N061C, N061D, N062A, N062H, N062L, N062V, N062Y, N076D, N076L, N076M, N078D, N078F, N101D, N101R, N118A, N212C, N212E, N218C, N218D, N218E, N252D, N252E, P014F, P014K, P057A, P057W, P172R, P194E, P201T, P210E, Q059C, Q059D, Q059R, Q185E, Q206D, Q217A, Q217K, Q217R, Q245A, Q245D, Q245E, Q245H, Q245R, Q271E, Q271F, Q271R, Q271W, Q275G, Q275I, R186I, R186L, R186V, R186W, S003E, S009C, S009E, S018C, S037D, S037E, S037H, S037R, S037Y, S038D, S038P, S038R, S038Y, S063L, S087D, S087R, S089C, S089E, S130C, S130R, S145D, S159C, S159P, S161C, S173T, S182C, S188E, S188F, S188K, S188L, S188R, S188W, S190A, S190G, S190T, S204R, S236D, S236E, S248C, S248E, S260C, S260E, S260R, T022P, T055C, T055W, T071A, T158D, T158E, T158P, T158R, T158Y, T164R, T242D, T242G, T255C, V004E, V004T, V045C, V045D, V045R, V045T, V051H, V081R, V143C, V143E, V143G, V192G, V203C, V203D, V203E, V203M, V203R, V270G, W241L, Y214H, Y214Q, A001E, A133E, A187L, A187N, A216C, A216H, A273Q, D099H, D259H, E156C, E195G, F189H, G131C, G146A, G166V, G215C, G215E, I107L, K012A, K012S, K012T, K043C, K170C, K256C, K256E, K265G, K265Y, L233E, M222F, M222S, N062Q, N076E, N078E, N184P, N218R, P005V, P014D, Q002K, Q002L, Q002R, Q010W, Q271C, R186H, S049C, S063C, S063D, S105T, S188C, S190C, S204E, T055R, T164G, V004D, V044T, V045I, V165C, V180S, Y006C, Y006D, Y006E, Y104T, A001C, A187C, A230G, A273D, A273P, D036Q, F189G, F189L, F189R, G157T, G178A, I031F, I111M, K012F, K012L, K027T, K043R, K136G, K141G, K170Q, M222A, M222L, N062R, N117G, N269C, P005W, P129V, P239A, P239H, P239T, Q059W, Q217G, Q275A, R186A, S191G, T164A, T220A, A001P, A187F, A187W, A273R, D041C, D060G, D197T, F189A, G046D, G157P, K012C, K012E, K012W, L042C, M222T, N062C, P239G, P239N, Q217C, R186M, S049T, S089P, S125A, S173V, y V044A, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con las posiciones de aminoácido de la secuencia SEQ ID NO:2.

[0341] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de más de 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de más de 1,0 a aproximadamente 10, de más de 1,0 a aproximadamente 8, o de más de 1,0 a aproximadamente 5 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de huevo en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en A216E, L090I, A098R, A098W, A098Y, A116G, A116R, A116S, A133M, I107L, I115V, M124L, N101I, N109H, N109S, N109T, N117R, P005G, Q185L, S089V, V095A, A015Y, A029G, A098D, A098E, A098G, A098N, A098S, A098T, A098V, A114S, A114T, A116E, A116L, A116T, A116V, A133H, A133L, A133S, A137G, A137I, A137L, A137S, A137V, A138S, A144S, A144V, A176S, A176T, A187T, A216F, A216P, A216Q, A216R, A216S, A216T, A216V, A216Y, D041E, D120A, D120E, D120Q, D120R, D120S, D181S, G020A, G020S, G024A, G097A, G097D, G097S, G131Q, G160S, G166I, G211L, G215N, H039N, H238N, I111L, I111V, I122A, L075I, L075Q, L135M, L209T, L209V, L233V, L235M, L235R, L257A, M119I, N025A, N025G, N025T, N061K, N101F, N101H, N101L, N101Q, N101R, N101S, N101T, N109A, N109G, N109K, N109L, N117E, N117H, N117K, N117S, N212G, N212S, N218F, N218G, N218H, N218L, N218S, N218W, N240Q, N252M, N252R, N252S, P005T, P040A, P040G, P040T, P129D, P129S, P194S, P210R, Q019R, Q019W, Q103L, Q103W, Q185A, Q185G, Q185M, Q185R, Q185T, Q206G, Q206Y, Q217A, Q217E, Q217R, Q217S, Q217T, S003Q, S009H, S018M, S033T, S130A, S130F, S130G, S130T, S130V, S145T, S159A, S161N, S161T, S162V, S162Y, S182L, S182W, S183F, S183L, S183V, S183W, S188K, S188W, S236Q, S236T, S248L, T022H, T022K, T208C, T253H, T255V, V044I, V121I, V139C, V143H, V143Q, V143T, V143W, V143Y, Y006K, Y021A, Y104W, A001F, A001G, A001H, A001K, A001L, A001Q, A001S, A001Y, A013V, A015G, A015K, A015R, A015S, A015T, A015W, A048S, A073N, A073S, A092S, A098K, A098P, A116D, A116W, A128S, A133P, A133T, A133V, A134G, A134S, A137H, A137N, A137T, A144D, A144K, A144L, A144M, A144N, A144R, A179G, A179S, A187V, A216G, A216L, A216W, A223S, A230C, A272K, A272L, A272P, A272S, A272T, A272W, A273G, A273S, A274G, A274M, A274T, D120K,

D140E, D181A, D181E, D181G, D181H, D181T, D259E, D259N, D259Q, E054D, E156D, E156T, E251L, E251T, E251V, F058Y, F189W, F261K, F261Q, F261R, G007A, G007S, G020F, G020H, G020N, G020Q, G020T, G020Y, G024F, G024Q, G024R, G024T, G024V, G024W, G024Y, G053T, G097K, G097M, G097R, G097T, G131A, G131H, G131P, G131R, G131T, G131V, G160H, G160T, G166C, G166Q, G166S, G166T, G211A, G211D, G211K, G211M, G211N, G211Q, G211R, G211V, G211W, G215S, G215T, G215W, H017T, H017W, H017Y, H039V, H226A, H226F, H226I, H226L, H226M, H226V, I035V, I079A, I079S, I108V, I205V, I234L, I234V, I268V, K012S, K043P, K136H, K136R, K141A, K141F, K141T, K141W, K170A, K170G, K170R, K213A, K213R, K213S, K237A, K237H, K237L, K237S, K237V, K256A, K256G, K256H, K256M, K256P, K256Q, K256R, L016A, L016Q, L016T, L016V, L042V, L075M, L075T, L082M, L082V, L135F, L196I, L209H, L209Q, L209R, L209S, L209W, L233A, L233M, L233Q, L235I, L235K, L250I, L257S, L257T, L257V, L267A, L267Q, L267T, L267V, M119C, M199V, N025C, N025E, N025F, N025I, N025K, N025L, N025M, N025Q, N025V, N025Y, N061F, N061P, N061S, N061T, N076G, N078S, N101A, N109M, N109Q, N109R, N117A, N117M, N117Q, N118D, N118G, N118H, N118Q, N118R, N118S, N184A, N184C, N184G, N184L, N184R, N184S, N184T, N184V, N184W, N212C, N212F, N212I, N212K, N212L, N212P, N212Q, N212R, N212V, N212W, N212Y, N218A, N218P, N218T, N240A, N240E, N240G, N240H, N240I, N240L, N240R, N240S, N240T, N243C, N243Q, N243T, N252A, N252G, N252K, N252Q, P014G, P014Q, P014R, P014S, P014T, P040F, P040L, P040Q, P040S, P040V, P086C, P086H, P086S, P129A, P129E, P129G, P129K, P129R, P172A, P172K, P172Q, P172S, P194A, P194G, P194H, P194L, P194M, P194Q, P194R, P194V, P194W, P194Y, P210A, P210G, P210L, P210S, P239K, P239R, Q002A, Q002S, Q010A, Q010N, Q010R, Q010T, Q019A, Q019C, Q019D, Q019G, Q019S, Q019T, Q019V, Q059I, Q059V, Q103S, Q185F, Q185H, Q185I, Q185K, Q185N, Q185S, Q185Y, Q206H, Q206L, Q206P, Q206W, Q217F, Q217H, Q217I, Q217K, Q217L, Q217N, Q217V, Q271G, Q271H, Q271I, Q271R, Q271T, Q275F, Q275P, Q275R, R186A, R186I, R186K, S003A, S003F, S003G, S003H, S003K, S003R, S003T, S009T, S018N, S018T, S037G, S037T, S037V, S038G, S038Q, S063N, S063Q, S063T, S089M, S089N, S130K, S130L, S130R, S130W, S132N, S145G, S145K, S145M, S145R, S145V, S159C, S159H, S159L, S159Q, S159R, S159T, S159W, S161A, S161C, S161G, S161H, S161I, S161K, S161P, S161Q, S161R, S162F, S162G, S162I, S162L, S162M, S162N, S162P, S162R, S163G, S173A, S173G, S182F, S182G, S182K, S182N, S182Q, S182V, S183A, S183M, S183Q, S183R, S183T, S188A, S188F, S188G, S188P, S188R, S188T, S188V, S190C, S204A, S204G, S204I, S204L, S204Q, S204R, S204V, S207G, S224A, S224T, S236C, S236D, S236E, S236G, S236H, S248A, S248F, S248K, S248M, S248T, S249A, S249R, S249T, S249V, S249W, S249Y, S260G, S260H, S260K, S260N, T022A, T022G, T022Q, T022S, T022V, T022Y, T055A, T055K, T158A, T158S, T208L, T208S, T208V, T220S, T242D, T242N, T242S, T244E, T244G, T244I, T244R, T244V, T244W, T253A, T253G, T253N, T253S, T254S, T254V, T255H, T255I, T255K, T255L, T255Q, T255R, T255S, T255Y, V004A, V004N, V004P, V004W, V008A, V008M, V026I, V045S, V045W, V051I, V081Q, V081T, V084C, V093I, V095C, V143A, V143E, V143F, V143N, V143S, V147I, V147L, V147S, V147T, V148I, V149C, V149I, V165M, V180A, V180C, V180I, V180L, V180T, V192A, V192C, V192I, V192S, V192T, V192Y, V198L, V203A, V203F, V203K, V203L, V203M, V203N, V203Y, W241Y, Y006A, Y006G, Y006H, Y006L, Y006N, Y006P, Y006Q, Y006T, Y021E, Y021K, Y021L, Y021N, Y021R, Y021S, Y021T, Y104F, Y104I, Y104V, Y171F, Y214F, Y214L, Y214W, Y262F, y Y262S, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN' (SEQ ID NO:2) y un valor de PI mayor que el de la BPN' en este ensayo.

[0342] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de aproximadamente 1,0 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de huevo en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en A001D, A001M, A001N, A001R, A001T, A001V, A013C, A013G, A013S, A015D, A015F, A015L, A015M, A015P, A015Q, A074G, A074S, A085S, A085T, A085V, A088C, A088L, A088S, A088T, A088V, A133E, A133G, A133R, A137E, A144G, A144H, A144Q, A144T, A151C, A152S, A153G, A153S, A153V, A176C, A187G, A187Q, A187S, A200G, A228S, A228T, A230T, A230V, A231C, A231V, A232C, A232V, A272E, A272G, A272I, A272Q, A272R, A273L, A273V, A274L, A274Q, A274R, A274V, D036E, D259A, D259G, D259P, D259S, D259T, E156A, E156S, E156V, E195G, E251C, E251I, E251Q, F189Y, F261A, F261G, F261H, F261I, F261P, F261S, F261T, F261V, F261W, G020C, G020D, G020E, G020L, G020R, G024D, G024I, G024N, G024P, G024S, G053A, G053D, G053F, G053H, G053K, G053N, G053S, G053Y, G157A, G157S, G160A, G160L, G160P, G160R, G166A, G166L, G166V, G166W, G169A, G211E, G211P, G215A, G215D, G215E, G215H, G215V, G258D, G258S, H017F, H017I, H017L, H017M, H017V, H039C, H226S, H226Y, I011T, I011V, I031C, I031L, I031V, I079F, I079K, I079L, I079M, I079Q, I079R, I079T, I079V, I079W, I115L, I205A, I205C, I268L, K012R, K012T, K027R, K043A, K043E, K043F, K043H, K043I, K043M, K043N, K043Q, K043T, K043V, K043Y, K141H, K141Q, K141V, K170S, K213G, K213H, K213I, K213L, K213N, K213Q, K213T, K213W, K237I, K237N, K237R, K237T, K256C, K256E, K256S, K256T, K256V, K256W, K265H, K265R, L016E, L016F, L016I, L016S, L042I, L042M, L075A, L075H, L075Y, L082K, L082Q, L082T, L196M, L196V, L209A, L209C, L209E, L209G, L235W, L257C, L257H, L257Q, L257Y, L267E, L267F, L267R, L267S, M050Y, N025H, N025P, N025S, N056D, N061A, N061C, N061D, N061H, N061I, N061L, N061R, N061V, N061W, N062A, N062S, N062V, N076A, N076E, N076L, N076M, N076Q, N076S, N076T, N076W, N078G, N078H, N078K, N078P, N078Q, N078T, N101D, N118A, N118T, N184E, N184H, N184I, N212A, N212D, N212E, N218C, N218D, N218E, N218M, N218R, N218V, N240W, N243A, N243G, N243P, N243S, N252D, N252E, N252L, N252T, N252V, N269S, P005A, P005D, P005M,

P005Q, P014A, P014D, P014F, P014M, P014V, P040H, P040R, P040W, P040Y, P086A, P129T, P172E, P172G, P172R, P194E, P201A, P201G, P210E, P210V, Q002E, Q002G, Q010D, Q010F, Q010H, Q010I, Q010L, Q010S, Q019E, Q019H, Q019N, Q059A, Q059L, Q059R, Q059S, Q059T, Q185D, Q185E, Q206D, Q206S, Q206V, Q217G, Q245D, Q245E, Q245K, Q245M, Q245R, Q271A, Q271F, Q271P, Q271Y, Q275D, Q275H, Q275I, Q275L, Q275S, Q275W, R186H, R186L, R186V, R186W, S003D, S003E, S003M, S003P, S003V, S009A, S009E, S009G, S009I, S009K, S009M, S009P, S009W, S018A, S018G, S018I, S018L, S018P, S018R, S018V, S018W, S037A, S037D, S037Q, S037R, S037Y, S038D, S038H, S038K, S038M, S038R, S038T, S063A, S063G, S063K, S063M, S063R, S087A, S087D, S087F, S087G, S087Q, S087T, S089A, S089C, S089H, S089I, S089K, S089L, S089Q, S089R, S089T, S089Y, S130D, S130E, S145A, S145H, S145L, S159G, S161E, S161L, S161M, S161W, S162A, S162C, S162E, S162W, S163P, S173T, S182A, S182C, S182E, S182H, S182R, S182T, S183C, S183D, S183G, S183H, S188C, S188D, S188E, S188L, S190T, S191A, S204Y, S224C, S236A, S248C, S248D, S248G, S248I, S248N, S248Q, S248R, S248V, S249C, S249H, S249L, S249Q, S260A, S260C, S260E, S260P, S260Q, S260R, S260T, T022L, T022N, T022R, T055C, T055D, T055G, T055I, T055L, T055N, T055Q, T055S, T055V, T055Y, T071A, T071S, T158G, T158H, T158L, T158P, T158Q, T158R, T158V, T158Y, T164N, T164S, T244A, T244D, T244H, T244Q, T244S, T253Q, T253R, T253Y, T254A, T254G, T255A, T255D, T255E, V004E, V004G, V004R, V008C, V026A, V028L, V030I, V044C, V045D, V045E, V045H, V045M, V045Q, V045Y, V072L, V081L, V081S, V084A, V084I, V084M, V084T, V143C, V147C, V147Q, V149L, V165L, V180M, V192F, V192G, V192Q, V198I, V198M, V203C, V203E, V203H, V203I, V203Q, V203R, V203T, V203W, V270A, V270L, V270T, W241F, W241M, Y006C, Y006D, Y006E, Y006I, Y006M, Y006R, Y006S, Y006V, Y006W, Y021C, Y021D, Y021V, Y091W, Y167F, Y214V, Y262A, Y262C, Y262I, Y262M, Y262R, Y262T, Y262V, y Y262W, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN' (SEQ ID NO:2) y un valor de PI mayor que el de la BPN' en este ensayo.

[0343] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de aproximadamente 0,9 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de huevo en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en A001E, A015C, A015E, A048C, A048E, A073T, A085C, A085G, A088I, A088M, A114G, A137R, A187L, A187N, A187P, A187W, A216C, A230S, A273D, A273H, A273T, D036N, D099N, D259H, E156C, E156G, E156H, E156Q, F189H, F189R, F189S, F189T, F261C, F261D, F261E, G053E, G053M, G053Q, G131C, G131D, G157N, G160V, G215C, G215L, G258A, H039A, I011L, I079E, I268M, K012A, K012G, K012H, K012N, K027N, K043C, K043D, K043G, K043L, K043W, K136G, K141G, K141L, K141M, K141N, K141R, K170C, K170Q, K213V, K256D, K265G, K265N, K265Q, K265S, L082A, L082F, L082H, L082R, L082S, L090M, L233S, L235V, L257E, L257G, L257R, L257W, M222S, N025R, N062H, N062T, N076D, N076P, N078D, N078E, N078F, N078R, N078V, N269H, N269Q, P014K, P057A, P086F, P201T, Q002D, Q002I, Q002P, Q002V, Q019L, Q019P, Q059C, Q059D, Q059E, Q185W, Q271C, Q271D, Q271E, Q271L, Q271W, Q275G, R186M, S009C, S009L, S018D, S037E, S037H, S037K, S037L, S037P, S038P, S063C, S063D, S063F, S063L, S063Y, S087L, S087N, S087R, S087Y, S089D, S089F, S089G, S089W, S105T, S125A, S130C, S159D, S159P, S163A, S182P, S183P, S190A, S190G, S204E, S224G, S248E, S248H, S249E, S260V, S260Y, T055M, T055R, T055W, T158D, T158E, T164G, T164K, T164Q, T220A, T220Q, T253E, T255C, T255G, V004D, V044L, V044P, V045C, V045D, V045G, V045H, V045N, V045R, V045V, V081A, V081G, V081H, V084S, V147A, V203D, V203G, V270C, V270P, V270S, W241L, Y104T, Y214Q, Y262D, Y262E, Y262G, Y262H, Y262L, Y262N, Y263G, y Y263W, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

[0344] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI igual o mayor que 0,5 y menor que 0,9 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de huevo en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos una sustitución aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en A001C, A142C, A187C, A216H, A273Q, A274H, D036Q, D036S, D099S, D197T, E156L, F189A, F189L, G053L, G053R, G157P, G178A, G258P, H039S, H238Y, K012C, K012E, K012L, K012W, K136E, K265Y, L075G, L075V, L082E, L126W, L257D, L257P, M050L, M222A, M222F, M222L, N056S, N062C, N062L, N062Y, N269C, P057W, Q002K, Q002L, Q217C, Q245A, Q245H, S018C, S038Y, S049C, S087C, S087K, S145D, S191G, T022P, T055E, T164A, T164R, V045K, V051H, V081R, V143G, V148L, V180S, V203S, V270G, Y214H, A187F, A273P, F189G, G046D, G146A, G157T, I031F, I175L, K012F, K027T, L042F, L233E, L233G, M222T, N062R, N184P, P005V, P005W, P129V, P239N, P239T, Q010W, Q059W, Q275A, V004T, V165C, A128H, A230G, D041C, H067T, K027S, K043R, L090T, N062Q, N117G, P225G, P225S, P239G, P239H, Q002R, S089E, V044A, V045I, A001P, A273R, D041N, D099A, D099H, D099Q, F058G, I111M, L042C, N118L, P239A, S049N, S089P, S173V, T242P, V044T, y V045T, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

EJEMPLO 8

60 Rendimiento de limpieza de las variantes combinatorias adicionales basadas en BPN'-v36 original

[0345] Se elaboraron variantes combinatorias adicionales basadas en BPN'-v36 original (BPN'-S24G-S53G-S78N-S101N-G128A-Y217Q) y se proporcionaron por DNA 2.0. Se analizó el rendimiento de limpieza de estas variantes utilizando un ensayo de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a 16 °C y pH 8, un ensayo de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a 16 °C y pH 7, un ensayo de micromuestras de huevo en la Composición detergente 4 a 16 °C y pH 8, y un ensayo de micromuestras de hierba en la Composición detergente 4 a 16 °C y a pH 8. El contenido en proteínas se determinó utilizando el ensayo TCA y la actividad de proteasa se analizó utilizando el ensayo AAPF. Todos los ensayos se llevaron a cabo tal como se ha descrito en el Ejemplo 1 y los Índices de rendimiento se calcularon en relación con la BPN'-v36 (con un valor de PI de 1,0).

[0346] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de más de 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de más de 1,0 a aproximadamente 10, de más de 1,0 a aproximadamente 8, o de más de 1,0 a aproximadamente 5 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en A088T-L257G, A116T-A128S, N061S-N109G-A128S-N243V-S260P, S009T-N109G-A128S-K141R-N243V, S009T-S018T-Y021N-N109G-A128S-K141R, y S162G-K256R, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN', BPN'-v3, y BPN'-v36, y un valor de PI mayor que el de la BPN', BPN'-v3, y BPN'-v36 en este ensayo.

[0347] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de aproximadamente 1,0 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en A088T, A088T-A116T, A088T-G131H, A088T-K256R, A088T-N109G, A088T-N243V, A088T-Q103H, A088T-S162G, A088T-S248N, A088T-S249A, A088T-T158S, A116T, A116T-G131H, A116T-K256R, A116T-L257G, A116T-N243V, A116T-S162G, A116T-S248N, A116T-S249A, A116T-T158S, A128S-K256R, A128S-L257G, A128S-N243V-S248N-K256R, A128S-S162G, A128S-S248N, A128S-S249A, A128S-T158S, G024E-A116T, G024E-K256R, G024E-L257G, G024E-N109G, G024E-N243V, G024E-T158S, G131H, G131H-K256R, G131H-L257G, G131H-N243V-K256R, G131H-S162G, G131H-S248N, G131H-S249A, G131H-T158S, K043Y-A088T, K043Y-K256R, K043Y-N243V, K256R, K256R-L257G, L257G, N061G-N109G-N243V, N061P-N109G-G131H-N243V, N061P-N109G-N243V, N061S-A128S-N243V-S260P, N061S-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R-S260P, N061S-N109G-A128S-S260P, N061S-N109G-N243V, N076D-K256R, N076D-L257G, N076D-N109G, N076D-T158S, N109A-A128S-N243V-K256R, N109G, N109G-A116T, N109G-A128S, N109G-A128S-G131H-N243V-S248N-K256R, N109G-A128S-N243V-K256R, N109G-A128S-N243V-S248A, N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, N109G-A128S-N243V-S248N, N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, N109G-A128S-S162G-N243V-S248N-K256R, N109G-A128S-S248N-K256R, N109G-A128S-T158S-N243V-S248N-K256R, N109G-G131H, N109G-K256R, N109G-L257G, N109G-N218S, N109G-N243P-S248A-K256R, N109G-N243P-S248N-K256R, N109G-N243V, N109G-N243V-K256R, N109G-N243V-S248A-K256R, N109G-N243V-S248N, N109G-N243V-S248N-K256R, N109G-S162G, N109G-S248N-K256R, N109G-S249A, N109G-T158S, N109Q-A128S-N243V-K256R, N109S-A128S-N243V-K256R, N218S-N243V, N243V, N243V-K256R, N243V-L257G, N243V-S248N, N243V-S248N-K256R, N243V-S249A, P040A-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, Q103H-A116T, Q103H-A128S, Q103H-G131H, Q103H-K256R, Q103H-L257G, Q103H-N109G, Q103H-N218S, Q103H-N243V, Q103H-S162G, Q103H-S248N, Q103H-S249A, Q103H-T158S, S009T-A128S-K141R-N243V, S009T-N109G-A128S-K141R, S009T-N109G-A128S-K141R-N243V-S248N-K256R, S009T-S018T-Y021N-A128S-K141R-N243V, S018T-Y021N-A128S-N243V, S018T-Y021N-N061S-A128S-N243V-S260P, S018T-Y021N-N061S-N109G-A128S-S260P, S018T-Y021N-N109G-A128S, S018T-Y021N-N109G-A128S-N243V, S018T-Y021N-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, S033T-N109G-A128S-N243P-S248N-K256R, S033T-N243V, S033T-Q103H, S033T-T158S, S063G, S063G-A088T, S063G-A128S, S063G-K256R, S063G-L257G, S063G-N076D, S063G-N109G, S063G-Q103H, S063G-S162G, S063G-S248N, S063G-T158S, S162G, S162G-L257G, S162G-N243V, S162G-S248N, S248N, S248N-L257G, S249A, T158S, T158S-L257G, T158S-N218S, T158S-N243V, T158S-S248N, y T158S-S249A, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN' (SEQ ID NO:2) y un valor de PI mayor que el de la BPN' en este ensayo.

[0348] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de aproximadamente 0,9 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en A001E-A088T, A001E-A116T, A001E-A128S-G131H-N243V, A001E-G131H-G169A-N243V, A001E-K256R, A001E-N109G, A001E-N243V, A001E-S033T, A001E-S033T-N109G-N218S, A001E-S033T-N109G-N243V, A001E-S162G, A001E-T158S, A088T-A128S, A088T-G169A, A088T-N218S, A088T-Q206D, A116T-G169A, A116T-N218S, A116T-Q206D, A128S, A128S-G131H, A128S-G169A, A128S-N218S, A128S-N243V, A128S-

- Q206D, G024E, G024E-A088T, G024E-A128S, G024E-G131H, G024E-K043Y, G024E-N218S, G024E-Q103H, G024E-S033T, G024E-S063G, G024E-S162G, G024E-S248N, G024E-S249A, G131H-G169A, G131H-N218S, G131H-N243V, G131H-Q206D, G169A, G169A-K256R, G169A-L257G, G169A-N218S, G169A-N243V, G169A-Q206D, G169A-S248N, G169A-S249A, K043Y, K043Y-A116T, K043Y-A128S, K043Y-G131H, K043Y-G169A, K043Y-L257G, K043Y-N109G, K043Y-N218S, K043Y-Q103H, K043Y-S063G, K043Y-S162G, K043Y-S248N, K043Y-S249A, K043Y-T158S, N076D, N076D-A088T, N076D-A128S, N076D-G131H, N076D-N218S, N076D-N243V, N076D-Q103H, N076D-S162G, N076D-S248N, N076D-S249A, N109G-G169A, N109G-Q206D, N109G-S248N, N218S, N218S-K256R, N218S-L257G, N218S-S248N, N218S-S249A, P040E-N109G-A128S-G131H, Q103H, Q103H-G169A, Q206D, Q206D-K256R, Q206D-L257G, Q206D-N218S, Q206D-N243V, Q206D-S248N, Q206D-S249A, S018T-Y021N-S033T-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, S033T, S033T-A088T, S033T-A116T, S033T-A128S, S033T-A128S-G131H-N243P, S033T-G131H, S033T-K043Y, S033T-K256R, S033T-L257G, S033T-N076D, S033T-N076D-A128S-N218S, S033T-N076D-N109G-A128S-N218S-N243V-S248N-K256R, S033T-N109G, S033T-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, S033T-N218S, S033T-P040E-Q103H-N109G, S033T-Q103H-A128S-G131H, S033T-Q206D, S033T-S063G, S033T-S162G, S033T-S248N, S033T-S249A, S063G-A116T, S063G-G131H, S063G-G169A, S063G-N109G-A128S-G131H, S063G-N218S, S063G-N243V, S063G-Q206D, S063G-S249A, S162G-G169A, S162G-N218S, S162G-Q206D, S162G-S249A, S248N-K256R, S248N-S249A, S249A-K256R, S249A-L257G, T158S-G169A, T158S-K256R, T158S-Q206D, y T158S-S162G, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.
- 20 **[0349]** Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI igual o mayor que 0,5 y menor que 0,9 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en A001E, A001E-A128S, A001E-G024E, A001E-G131H, A001E-G169A, A001E-L257G, A001E-N218S, A001E-Q103H, A001E-S063G, A001E-S248N, A001E-S249A, G024E-N076D, K043Y-N076D, K043Y-Q206D, N076D-A116T, N076D-G169A, N076D-Q206D, Q103H-Q206D, S033T-G169A, S033T-S063G-Q103H-N109Q-A128S-G131H-G169A-N243P, S033T-S063G-Q103H-N109Q-A128S-G131H-G169A-N243V, A001E-K043Y, A001E-N076D, A001E-N076D-N109G-A128S, A001E-Q206D, y G024E-Q206D, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.
- 30 **[0350]** Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de más de 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de más de 1,0 a aproximadamente 10, de más de 1,0 a aproximadamente 8, o de más de 1,0 a aproximadamente 5 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a pH 7 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en A116T, A088T-N243V, G024E-A116T, K043Y, N076D-A116T, N218S-S248N, S033T-N243V, S033T-S063G, S248N-L257G, A001E-S249A, A088T-A116T, A088T-A128S, A088T-G131H, A088T-L257G, A088T-N109G, A088T-S248N, A088T-S249A, A116T-N243V, A116T-T158S, A128S, A128S-K256R, A128S-L257G, A128S-N243V, A128S-S248N, A128S-T158S, G024E-A088T, G024E-A128S, G024E-G131H, G024E-K256R, G024E-L257G, G024E-N218S, G024E-N243V, G024E-S162G, G024E-S249A, G024E-T158S, G131H, G131H-K256R, G131H-S249A, K043Y-A088T, K043Y-A116T, K256R, N076D-K256R, N109G, N109G-A116T, N109G-A128S, N109G-A128S-N243V-K256R, N109G-A128S-N243V-S248A, N109G-G131H, N109G-K256R, N109G-L257G, N109G-N218S, N109G-N243V, N109G-S248N, N218S-L257G, N243V, N243V-K256R, N243V-L257G, N243V-S248N, N243V-S249A, Q103H-A128S, Q103H-G131H, Q103H-K256R, Q103H-L257G, Q103H-N243V, Q103H-S248N, Q103H-S249A, Q103H-T158S, Q206D-N243V, S033T-A128S, S033T-K256R, S033T-N076D, S033T-N218S, S033T-S248N, S033T-T158S, S063G-A128S, S063G-K256R, S063G-N243V, S063G-S162G, S063G-T158S, S162G-K256R, S248N-K256R, S249A, T158S-N243V, y T158S-S249A, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN', BPN'-v3, y BPN'-v36, y un valor de PI mayor que el de la BPN', BPN'-v3, y BPN'-v36 en este ensayo.
- 50 **[0351]** Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de aproximadamente 1,0 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a pH 7 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en A001E-A128S, A001E-G131H, A001E-K256R, A001E-N218S, A001E-N243V, A001E-S033T, A001E-S063G, A001E-S162G, A088T, A088T-K256R, A088T-N218S, A088T-Q103H, A088T-S162G, A088T-T158S, A116T-A128S, A116T-G131H, A116T-K256R, A116T-L257G, A116T-S162G, A116T-S248N, A116T-S249A, A128S-G169A, A128S-N218S, A128S-S162G, A128S-S249A, G024E, G024E-N109G, G024E-Q103H, G024E-S033T, G024E-S063G, G024E-S248N, G131H-L257G, G131H-N243V, G131H-S162G, G131H-T158S, G169A, G169A-L257G, G169A-S248N, K043Y-A128S, K043Y-G131H, K043Y-K256R, K043Y-L257G, K043Y-N109G, K043Y-N243V, K043Y-Q103H, K043Y-S063G, K043Y-S162G, K043Y-S248N, K043Y-S249A, K043Y-T158S, K256R-L257G, L257G, N061G-N109G-N243V, N061S-A128S-N243V-S260P, N061S-N109G-A128S-N243V-S260P, N061S-N109G-A128S-S260P, N076D-A088T, N076D-A128S, N076D-G169A, N076D-N218S, N076D-N243V,

N076D-S162G, N076D-S248N, N076D-T158S, N109A-A128S-N243V-K256R, N109G-A128S-G131H-N243V-S248N-K256R, N109G-A128S-N243V-S248A-K256R, N109G-A128S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A128S-S162G-N243V-S248N-K256R, N109G-A128S-T158S-N243V-S248N-K256R, N109G-Q206D, N109G-S162G, N109G-S249A, N109G-T158S, N109Q-A128S-N243V-K256R, N109S-A128S-N243V-K256R, N218S, N218S-K256R, N218S-N243V, P040A-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, Q103H, Q103H-A116T, Q103H-G169A, Q103H-N109G, Q103H-N218S, Q103H-S162G, S009T-A128S-K141R-N243V, S009T-N109G-A128S-K141R, S009T-N109G-A128S-K141R-N243V, S009T-S018T-Y021N-N109G-A128S-K141R, S018T-Y021N-N109G-A128S, S018T-Y021N-N109G-A128S-N243V, S018T-Y021N-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, S033T-A088T, S033T-A116T, S033T-G131H, S033T-K043Y, S033T-L257G, S033T-N109G, S033T-Q103H, S033T-Q206D, S033T-S162G, S033T-S249A, S063G, S063G-A088T, S063G-A116T, S063G-L257G, S063G-N076D, S063G-N109G, S063G-N218S, S063G-Q103H, S063G-S248N, S063G-S249A, S162G, S162G-G169A, S162G-L257G, S162G-N218S, S162G-N243V, S162G-S248N, S162G-S249A, S248N, S248N-S249A, S249A-K256R, S249A-L257G, T158S, T158S-G169A, T158S-K256R, T158S-L257G, T158S-N218S, y T158S-S248N, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la proteasa BPN' (SEQ ID NO:2) y un valor de PI mayor que el de la BPN' en este ensayo.

[0352] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de aproximadamente 0,9 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a pH 7 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en A001E, A001E-A088T, A001E-A116T, A001E-G169A, A001E-L257G, A001E-N109G, A001E-S033T-N109G-N243V, A001E-T158S, A088T-G169A, A088T-Q206D, A116T-N218S, A128S-G131H, A128S-N243V-S248N-K256R, A128S-Q206D, G024E-K043Y, G024E-N076D, G024E-Q206D, G131H-G169A, G131H-N218S, G131H-N243V-K256R, G131H-Q206D, G131H-S248N, G169A-K256R, G169A-N218S, G169A-N243V, G169A-Q206D, K043Y-N076D, K043Y-N218S, N061P-N109G-G131H-N243V, N061P-N109G-N243V, N061S-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R-S260P, N061S-N109G-N243V, N076D, N076D-G131H, N076D-L257G, N076D-N109G, N076D-Q103H, N076D-S249A, N109G-A128S-N243V-S248N, N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, N109G-A128S-S248N-K256R, N109G-N243P-S248A-K256R, N109G-N243P-S248N-K256R, N109G-N243V-K256R, N109G-N243V-S248A-K256R, N109G-N243V-S248N, N109G-N243V-S248N-K256R, N109G-S248N-K256R, N218S-S249A, N243V-S248N-K256R, Q103H-Q206D, Q206D, Q206D-K256R, Q206D-N218S, Q206D-S248N, Q206D-S249A, S009T-N109G-A128S-K141R-N243V-S248N-K256R, S009T-S018T-Y021N-A128S-K141R-N243V, S018T-Y021N-A128S-N243V, S018T-Y021N-N061S-A128S-N243V-S260P, S018T-Y021N-N061S-N109G-A128S-S260P, S018T-Y021N-S033T-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, S033T, S033T-G169A, S033T-N076D-A128S-N218S, S033T-N076D-N109G-A128S-N218S-N243V-S248N-K256R, S033T-N109G-A128S-N243P-S248N-K256R, S033T-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, S063G-G131H, S063G-G169A, S162G-Q206D, y T158S-S162G, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes presentan actividad proteolítica.

[0353] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI igual o mayor que 0,5 y menor que 0,9 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a pH 7 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en A001E-A128S-G131H-N243V, A001E-G024E, A001E-G131H-G169A-N243V, A001E-Q103H, A001E-S033T-N109G-N218S, A001E-S248N, A116T-G169A, A116T-Q206D, G169A-S249A, K043Y-G169A, N109G-G169A, P040E-N109G-A128S-G131H, Q206D-L257G, S033T-A128S-G131H-N243P, S033T-A128S-G131H-N243V, S033T-P040E-Q103H-N109G, S033T-Q103H-A128S-G131H, S063G-N109G-A128S-G131H, S063G-Q206D, T158S-Q206D, A001E-K043Y, A001E-N076D, A001E-Q206D, S033T-S063G-Q103H-N109Q-A128S-G131H-G169A-N243P, S033T-S063G-Q103H-N109Q-A128S-G131H-G169A-N243V, A001E-N076D-N109G-A128S, K043Y-Q206D, y N076D-Q206D, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

[0354] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de más de 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de más de 1,0 a aproximadamente 10, de más de 1,0 a aproximadamente 8, o de más de 1,0 a aproximadamente 5 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de huevo en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en A088T-L257G, G024E-K256R, G024E-L257G, N109G-A116T, N109G-L257G, N243V-K256R, S033T-N109G, S033T-T158S, S063G-L257G, A001E-L257G, A088T-A128S, A088T-G169A, A088T-K256R, A088T-N109G, A088T-N218S, A088T-N243V, A088T-S248N, A088T-T158S, A116T, A116T-A128S, A116T-G131H, A116T-K256R, A116T-L257G, A116T-N218S, A116T-S162G, A116T-T158S, A128S, A128S-G169A, A128S-K256R, A128S-L257G, A128S-N218S, G024E, G024E-A128S, G024E-G131H, G024E-N109G, G024E-N243V, G024E-S033T, G024E-S063G, G024E-S248N, G024E-S249A, G024E-T158S, G131H, G131H-G169A, G131H-K256R, G131H-N218S, G131H-S249A, G169A, G169A-L257G, G169A-N243V, K043Y-A088T, K043Y-N109G, K256R, K256R-L257G, N061G-N109G-N243V, N076D-N109G, N109G, N109G-

A128S, N109G-G131H, N109G-K256R, N109G-N218S, N109G-S162G, N109G-S248N, N109G-S249A, N109G-T158S, N218S, N218S-K256R, N218S-L257G, N218S-S248N, N243V, N243V-L257G, N243V-S248N, N243V-S249A, P040A-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, Q103H-K256R, Q103H-L257G, Q103H-N109G, S009T-S018T-Y021N-N109G-A128S-K141R, S033T-A088T, S033T-A116T, S033T-A128S, S033T-G131H, S033T-K043Y, S033T-K256R, S033T-L257G, S033T-N076D, S033T-N218S, S033T-N243V, S033T-Q103H, S033T-S063G, S033T-S162G, S033T-S248N, S033T-S249A, S063G, S063G-A088T, S063G-A116T, S063G-A128S, S063G-G131H, S063G-K256R, S063G-N109G, S063G-N218S, S063G-N243V, S063G-S248N, S063G-S249A, S063G-T158S, S162G-K256R, S162G-N218S, S162G-N243V, S162G-S248N, S162G-S249A, S248N, S249A, S249A-L257G, T158S, T158S-L257G, y T158S-N243V, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN', BPN'-v3, y BPN'-v36, y un valor de PI mayor que el de la BPN', BPN'-v3, y BPN'-v36 en este ensayo.

[0355] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de aproximadamente 1,0 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de huevo en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en A001E, A001E-A116T, A001E-G131H, A001E-G169A, A001E-K256R, A001E-N109G, A001E-S033T-N109G-N243V, A001E-S063G, A001E-S248N, A001E-S249A, A001E-T158S, A088T, A088T-A116T, A088T-G131H, A088T-Q103H, A088T-Q206D, A088T-S162G, A088T-S249A, A116T-G169A, A116T-N243V, A116T-S248N, A116T-S249A, A128S-G131H, A128S-N243V, A128S-S162G, A128S-S248N, A128S-S249A, A128S-T158S, G024E-A088T, G024E-A116T, G024E-K043Y, G024E-N076D, G024E-N218S, G024E-Q103H, G024E-S162G, G131H-L257G, G131H-N243V, G131H-N243V-K256R, G131H-S162G, G131H-S248N, G131H-T158S, G169A-K256R, G169A-N218S, G169A-Q206D, G169A-S248N, G169A-S249A, K043Y, K043Y-A116T, K043Y-A128S, K043Y-G169A, K043Y-K256R, K043Y-L257G, K043Y-N076D, K043Y-N218S, K043Y-N243V, K043Y-S063G, K043Y-S248N, K043Y-S249A, K043Y-T158S, L257G, N061P-N109G-G131H-N243V, N061P-N109G-N243V, N061S-A128S-N243V-S260P, N061S-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R-S260P, N061S-N109G-A128S-S260P, N061S-N109G-N243V, N076D, N076D-A088T, N076D-A116T, N076D-G131H, N076D-G169A, N076D-K256R, N076D-L257G, N076D-N218S, N076D-N243V, N076D-Q103H, N076D-S249A, N076D-T158S, N109A-A128S-N243V-K256R, N109G-A128S-G131H-N243V-S248N-K256R, N109G-A128S-N243V-K256R, N109G-A128S-N243V-S248A, N109G-A128S-N243V-S248A-K256R, N109G-A128S-N243V-S248N, N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, N109G-A128S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A128S-S162G-N243V-S248N-K256R, N109G-G169A, N109G-N243P-S248A-K256R, N109G-N243V-K256R, N109G-N243V-K256R, N109G-N243V-S248N, N109G-N243V-S248N-K256R, N109G-S248N-K256R, N109Q-A128S-N243V-K256R, N109S-A128S-N243V-K256R, N218S-N243V, N218S-S249A, Q103H, Q103H-A116T, Q103H-A128S, Q103H-G131H, Q103H-G169A, Q103H-N218S, Q103H-N243V, Q103H-S162G, Q103H-S248N, Q103H-S249A, Q103H-T158S, Q206D, Q206D-L257G, Q206D-N218S, S009T-A128S-K141R-N243V, S009T-N109G-A128S-K141R, S009T-N109G-A128S-K141R-N243V, S009T-N109G-A128S-K141R-N243V-S248N-K256R, S009T-S018T-Y021N-A128S-K141R-N243V, S018T-Y021N-A128S-N243V, S018T-Y021N-N109G-A128S, S018T-Y021N-N109G-A128S-N243V, S018T-Y021N-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, S018T-Y021N-S033T-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, S033T, S033T-A128S-G131H-N243V, S033T-G169A, S033T-N109G-A128S-N243P-S248N-K256R, S033T-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, S033T-Q103H-A128S-G131H, S033T-Q206D, S033T-S063G-Q103H-N109Q-A128S-G131H-G169A-N243V, S063G-G169A, S063G-N076D, S063G-N109G-A128S-G131H, S063G-Q103H, S063G-S162G, S162G, S162G-G169A, S162G-L257G, S248N-K256R, S248N-L257G, S248N-S249A, S249A-K256R, T158S-G169A, T158S-K256R, T158S-N218S, T158S-S162G, T158S-S248N, y T158S-S249A, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la proteasa BPN' (SEQ ID NO:2) y un valor de PI mayor que el de la BPN' en este ensayo.

[0356] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI igual o mayor que 0,5 y menor que 0,9 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de huevo en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en A001E-A088T, A001E-A128S, A001E-A128S-G131H-N243V, A001E-G024E, A001E-G024E-S204E-Q206D, A001E-G131H-G169A-N243V, A001E-K043Y, A001E-N076D, A001E-N076D-N109G-A128S, A001E-N218S, A001E-N243V, A001E-Q103H, A001E-Q206D, A001E-S033T, A001E-S033T-N109G-N218S, A001E-S162G, A116T-Q206D, A128S-N243V-S248N-K256R, A128S-Q206D, G024E-Q206D, G131H-Q206D, K043Y-G131H, K043Y-Q103H, K043Y-Q206D, K043Y-S162G, N061S-N109G-A128S-N243V-S260P, N076D-A128S, N076D-Q206D, N076D-S162G, N076D-S248N, N109G-A128S-S248N-K256R, N109G-A128S-T158S-N243V-S248N-K256R, N109G-N243P-S248N-K256R, N109G-Q206D, N243V-S248N-K256R, P040E-N109G-A128S-G131H, Q103H-Q206D, Q206D-K256R, Q206D-N243V, Q206D-S248N, Q206D-S249A, S018T-Y021N-N061S-A128S-N243V-S260P, S018T-Y021N-N061S-N109G-A128S-S260P, S033T-A128S-G131H-N243P, S033T-N076D-A128S-N218S, S033T-N076D-N109G-A128S-N218S-N243V-S248N-K256R, S033T-P040E-Q103H-N109G, S033T-S063G-Q103H-N109Q-A128S-G131H-G169A-N243P, S063G-Q206D, S162G-Q206D, y

T158S-Q206D, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

[0357] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de más de 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de más de 1,0 a aproximadamente 10, de más de 1,0 a aproximadamente 8, o de más de 1,0 a aproximadamente 5 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de hierba en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en T158S-L257G, K256R, L257G, S033T-N109G, S162G-K256R, S162G-L257G, G024E-K256R, G024E-L257G, G024E-S033T, N109G-A116T, N218S-L257G, S033T-A088T, S033T-A116T, S033T-N243V, S033T-Q103H, S162G-N218S, S162G-N243V, T158S, T158S-N218S, T158S-N243V, A088T, A088T-G169A, A088T-K256R, A088T-L257G, A088T-S162G, A088T-T158S, A116T-K256R, A116T-L257G, A116T-N243V, A128S-L257G, A128S-N218S, A128S-N243V, A128S-S248N, G024E-A116T, G024E-A128S, G024E-G131H, G024E-N243V, G024E-S248N, G024E-S249A, G024E-T158S, G131H-N243V, G131H-T158S, G169A-N218S, G169A-N243V, G169A-S248N, K256R-L257G, N109G-A128S, N109G-G131H, N109G-N218S, N109G-N243V, N109G-S249A, N218S, N218S-K256R, N218S-N243V, N218S-S249A, N243V, N243V-K256R, N243V-L257G, N243V-S248N, Q103H-N109G, Q103H-N218S, S033T-A128S, S033T-L257G, S033T-N218S, S033T-S162G, S033T-S248N, S033T-T158S, S063G-K256R, S063G-L257G, S162G, S162G-G169A, S162G-S248N, S248N, S248N-K256R, S248N-L257G, S249A, T158S-S162G, y T158S-S248N, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN', BPN'-v3, y BPN'-v36, y un valor de PI mayor que el de la BPN', BPN'-v3, y BPN'-v36 en este ensayo.

[0358] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de aproximadamente 1,0 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de hierba en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en A001E-A088T, A001E-A116T, A088T-A128S, A088T-N243V, A088T-Q103H, A088T-S248N, A088T-S249A, A116T, A116T-G169A, A116T-N218S, A116T-S162G, A116T-S249A, A116T-T158S, A128S-G169A, A128S-K256R, A128S-S162G, A128S-S249A, A128S-T158S, G024E-A088T, G024E-K043Y, G024E-N218S, G024E-Q103H, G024E-S063G, G024E-S162G, G131H-G169A, G131H-K256R, G131H-N218S, G131H-S162G, G131H-S248N, G131H-S249A, G169A, G169A-L257G, G169A-S249A, N076D, N076D-K256R, N076D-L257G, N076D-S162G, N076D-S249A, N109G-K256R, N109G-L257G, N109G-S248N, N243V-S249A, Q103H-A116T, Q103H-G169A, Q103H-K256R, Q103H-L257G, Q103H-N243V, Q103H-S162G, S033T-G131H, S033T-G169A, S033T-K043Y, S033T-N076D, S033T-Q206D, S063G, S063G-A116T, S063G-A128S, S063G-N243V, S063G-S162G, S063G-S248N, S063G-S249A, S063G-T158S, S249A-L257G, T158S-G169A, y T158S-K256R, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN' (SEQ ID NO:2) y un valor de PI mayor que el de la BPN' en este ensayo.

[0359] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI igual o mayor que 0,5 y menor que 0,9 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de hierba en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en A001E-G169A, A001E-K256R, A001E-N109G, A001E-N218S, A088T-A116T, A088T-G131H, A088T-N109G, A088T-N218S, A116T-A128S, A116T-G131H, A116T-S248N, A128S, A128S-G131H, G024E, G024E-N109G, G131H, G131H-L257G, G169A-K256R, G169A-Q206D, K043Y, K043Y-A088T, K043Y-L257G, K043Y-N109G, N076D-A088T, N076D-G131H, N076D-G169A, N076D-N243V, N076D-T158S, N109G, N109G-S162G, N109G-T158S, N218S-S248N, Q103H-A128S, Q103H-S248N, Q103H-S249A, Q103H-T158S, Q206D-K256R, Q206D-L257G, Q206D-N218S, Q206D-N243V, Q206D-S248N, S033T, S033T-K256R, S033T-S063G, S033T-S249A, S063G-A088T, S063G-G131H, S063G-G169A, S063G-N109G, S162G-Q206D, S162G-S249A, S248N-S249A, S249A-K256R, T158S-Q206D, T158S-S249A, A001E-L257G, A001E-N243V, A001E-Q103H, A001E-S063G, A001E-S162G, A001E-T158S, G024E-N076D, G131H-Q206D, K043Y-A116T, K043Y-G169A, K043Y-K256R, K043Y-N076D, K043Y-S063G, K043Y-S162G, K043Y-S248N, K043Y-S249A, K043Y-T158S, N076D-A116T, N076D-A128S, N076D-S248N, N109G-G169A, Q103H, Q103H-G131H, Q206D-S249A, S063G-N076D, S063G-N218S, S063G-Q103H, A001E-A128S, A001E-G024E, A001E-G131H, A001E-N076D, A001E-Q206D, A001E-S033T, A001E-S248N, A001E-S249A, A088T-Q206D, A116T-Q206D, A128S-Q206D, G024E-Q206D, K043Y-A128S, K043Y-G131H, K043Y-N218S, K043Y-Q103H, N076D-N109G, N076D-N218S, N076D-Q103H, N109G-Q206D, Q103H-Q206D, Q206D, A001E, A001E-K043Y, K043Y-N243V, y S063G-Q206D, N076D-Q206D, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

[0360] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de más de 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de más de 1,0 a aproximadamente 10, de más de 1,0 a aproximadamente 8, o de más de 1,0 a

aproximadamente 5 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo proteolítico AAPF: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en S033T-N076D-A128S-N218S, A001E-S033T-N109G-N218S, S033T-N218S, S033T-S063G-Q103H-N109Q-A128S-G131H-G169A-N243V, A128S-G169A, S033T-S063G-Q103H-N109Q-A128S-G131H-G169A-N243P, S018T-Y021N-S033T-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, S033T-A128S-G131H-N243P, P040E-N109G-A128S-G131H, S033T-A128S, S033T-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, N109G-G169A, S063G-N109G-A128S-G131H, G169A, N109G-A128S-G131H-N243V-S248N-K256R, S033T-A128S-G131H-N243V, A128S-N218S, A001E-G169A, A088T-G169A, G169A-L257G, N109G-N218S, S033T-N109G-A128S-N243P-S248N-K256R, G169A-K256R, N076D-G169A, A001E-G131H-G169A-N243V, G169A-S249A, S033T-N109G, G169A-S248N, K043Y-G169A, K043Y-N218S, N218S-L257G, N218S-N243V, S063G-G169A, A001E-A128S-G131H-N243V, A001E-S033T-N109G-N243V, A088T-N218S, G024E-N218S, G024E-S033T, G169A-Q206D, N076D-N218S, S033T-L257G, S162G-G169A, A001E-N218S, A116T-N218S, G169A-N243V, N218S, P040A-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, S033T-N076D, A001E-S033T, A128S-G131H, N218S-S248N, S018T-Y021N-N109G-A128S, S033T-K043Y, S033T-N243V, S033T-Q206D, S063G-N218S, S162G-N218S, T158S-G169A, A116T-G169A, G131H-G169A, N061S-N109G-A128S-S260P, N109G-A128S-N243V-K256R, N109G-A128S-N243V-S248A, N109G-A128S-N243V-S248A-K256R, N109G-A128S-N243V-S248N-K256R-L257G, N218S-K256R, S009T-N109G-A128S-K141R, S009T-S018T-Y021N-N109G-A128S-K141R, S033T-A088T, S033T-S063G, S033T-S162G, T158S-N218S, A001E-N076D-N109G-A128S, N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, N109G-A128S-S248N-K256R, S009T-N109G-A128S-K141R-N243V, S018T-Y021N-N061S-N109G-A128S-S260P, S033T-A116T, S033T-S248N, S033T-S249A, S033T-T158S, G131H-N218S, N109A-A128S-N243V-K256R, N109G-A128S, N109G-A128S-S162G-N243V-S248N-K256R, N109G-A128S-T158S-N243V-S248N-K256R, N218S-S249A, Q206D-N218S, S018T-Y021N-N109G-A128S-N243V, S018T-Y021N-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R, S033T-K256R, A116T-A128S, N061S-N109G-A128S-N243V-S260P, N109G-A128S-N243V-S248N, S009T-N109G-A128S-K141R-N243V-S248N-K256R, G024E-A128S, N061S-N109G-A128S-N243V-S248N-K256R-S260P, N109S-A128S-N243V-K256R, S033T, S033T-G131H, A001E-A128S, A128S, A128S-L257G, A128S-Q206D, N109Q-A128S-N243V-K256R, S009T-A128S-K141R-N243V, S009T-S018T-Y021N-A128S-K141R-N243V, A088T-A128S, A128S-K256R, A128S-N243V, N061P-N109G-N243V, N061S-A128S-N243V-S260P, S018T-Y021N-A128S-N243V, A128S-N243V-S248N-K256R, A128S-S248N, A128S-S249A, N076D-A128S, S063G-A128S, A128S-S162G, A128S-T158S, S018T-Y021N-N061S-A128S-N243V-S260P, S033T-Q103H-A128S-G131H, N061S-N109G-N243V, K043Y-A128S, N061P-N109G-G131H-N243V, N109G-L257G, A001E-G024E-S204E-Q206D, A001E-L257G, A088T-N109G, G024E-N109G, K043Y-N109G, N061G-N109G-N243V, N076D-N109G, N109G, N109G-A116T, N109G-K256R, N109G-N243V-K256R, N109G-N243V-S248A-K256R, N109G-Q206D, S063G-N109G, A001E-A116T, A001E-N109G, A001E-Q206D, A088T-A116T, A088T-N243V, A116T-L257G, G024E-A116T, G024E-L257G, G024E-N243V, G024E-Q206D, N109G-G131H, N109G-N243V, N109G-S162G, N109G-S248N, N109G-S248N-K256R, N109G-S249A, N109G-T158S, N243V-L257G, A001E-A088T, A001E-G024E, A001E-K256R, A001E-N076D, A001E-N243V, A088T, A088T-L257G, A088T-Q206D, A116T, A116T-K256R, A116T-N243V, G024E-A088T, G024E-K043Y, G024E-K256R, G024E-N076D, G024E-S162G, G024E-S248N, K043Y-A088T, K043Y-A116T, K043Y-L257G, K043Y-N243V, K043Y-Q206D, K256R-L257G, N076D-A116T, N076D-L257G, N076D-N243V, N076D-Q206D, N109G-N243V-S248N, N109G-N243V-S248N-K256R, N243V-K256R, Q206D, Q206D-L257G, Q206D-N243V, Q206D-S248N, S063G-K256R, S063G-L257G, T158S-L257G, A001E, A001E-K043Y, A001E-S162G, A001E-S248N, A001E-S249A, A001E-T158S, A088T-K256R, A088T-S162G, A088T-S248N, A088T-S249A, A116T-Q206D, A116T-S248N, A116T-S249A, G024E, G024E-G131H, G024E-S249A, G024E-T158S, G131H, G131H-K256R, G131H-L257G, K043Y-K256R, K043Y-N076D, K256R, L257G, N076D-A088T, N076D-K256R, N076D-S162G, N076D-S248N, N076D-S249A, N109G-N243P-S248A-K256R, N109G-N243P-S248N-K256R, N243V, Q206D-K256R, S033T-P040E-Q103H-N109G, S063G, S063G-A116T, S063G-Q206D, S162G-K256R, S162G-L257G, S162G-N243V, S162G-Q206D, S162G-S248N, S248N, S248N-L257G, S249A, S249A-L257G, T158S, T158S-N243V, y T158S-Q206D, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN', BPN'-v3, y BPN'-v36, y un valor de PI mayor que el de la BPN', BPN'-v3, y BPN'-v36 en este ensayo.

[0361] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de aproximadamente 1,0 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo proteolítico de AAPF: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en A001E-G131H, A001E-S063G, A088T-G131H, A088T-T158S, A116T-G131H, A116T-S162G, A116T-T158S, G024E-S063G, G131H-N243V, G131H-N243V-K256R, G131H-Q206D, G131H-S249A, K043Y, K043Y-S063G, K043Y-S248N, K043Y-S249A, K043Y-T158S, N076D, N076D-G131H, N076D-T158S, N243V-S248N, N243V-S248N-K256R, N243V-S249A, Q103H-G169A, Q206D-S249A, S063G-N076D, S063G-N243V, S063G-S162G, S063G-S249A, S063G-T158S, S162G, S162G-S249A, S248N-K256R, S248N-S249A, S249A-K256R, T158S-K256R, T158S-S248N, y T158S-S249A, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN' (SEQ ID NO:2) y un valor de PI mayor que el de la BPN' en este ensayo.

[0362] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de aproximadamente 0,9 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo proteolítico de AAPF: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en G131H-S162G, G131H-S248N, G131H-T158S, K043Y-G131H, K043Y-S162G, S063G-A088T, S063G-G131H, S063G-S248N, T158S-S162G, Q103H-N218S, S033T-Q103H, y Q103H-A128S, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

EJEMPLO 9

Construcción y rendimiento de lavado de las variantes de una biblioteca combinatoria basada en BPN'-v36 original

[0363] Se fabricó una biblioteca combinatoria de BPN' basada en la BPN'-v36 original mediante DNA2.0 y se proporcionó como una reacción de ligamiento. Para una transformación eficiente de *B. subtilis*, el ADN de la mezcla de reacción de ligamiento se amplificó antes de la transformación y los transformantes se cultivaron tal como se ha descrito en el Ejemplo 2. Se analizó el rendimiento de limpieza de las variantes utilizando un ensayo de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a 16 °C y pH 8, y un ensayo de micromuestras de huevo en la Composición detergente 4 a 16 °C y pH 8. El contenido en proteínas se determinó utilizando el ensayo TCA. Los ensayos se llevaron a cabo como en el Ejemplo 1 y los Índices de rendimiento se calcularon en relación con la BPN'-v36 (es decir, BPN'-S24G-S53G-S78N-S101N-G128A-Y217Q) (con un valor de PI de 1,0).

[0364] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de más de 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de más de 1,0 a aproximadamente 10, de más de 1,0 a aproximadamente 8, o de más de 1,0 a aproximadamente 5 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en A088T-A116T-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-N243V-L257G, A088T-T158S-N218S-K256R, A088T-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-A153S-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-L257G, A114S-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-T158S-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-S248N-L257G, A088T-A116T-T158S, A088T-N109G-A116T-G131H-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-N243V-L257G, A088T-N109G-N243V-S248N, A088T-N109G-T158S-N243V-L257G, A088T-N109G-T158S-N243V-S248N-L257G, A116T-T158S-S248N-L257G, Y006H-A116T-G131H-S248N, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V, A088T-A116T-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N212D-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-V148A-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-K256R, A088T-N109G-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-T158S-K256R, A088T-N109G-T158S-N243V, A088T-T158S-N243V-K256R-L257G, A116T, A116T-N218S-N243V-L257G-N269S, A116T-T158S-K256R-L257G, N109G-A116T-K256R-L257G, N109G-A116T-N243V, N109G-A116T-T158S-N243V-K256R-L257G, N109G-G131H-L257G, N109G-G131H-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-K256R-L257G, S003P-A116T-T158S-S248N-K256R, T158S-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-N243V-K256R, A088T-A116T-G131H-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-V147A-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-S248N-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S, A088T-A116T-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-L257G, A088T-G131H-N243V-L257G, A088T-G131H-T158S-S248N-L257G, A088T-L257G, A088T-N109G-A116T, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-W241R-S248N-K256R, A088T-N109G-K256R-L257G, A088T-N109G-L257G, A088T-N109G-N243V, A088T-N109G-N243V-K256R, A088T-N109G-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-S248N-K256R, A088T-N109G-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-T158S-N243V-K256R, A088T-N109G-T158S-N243V-S248N-A274D, A088T-N109G-T158S-S248N-L257G, A088T-T158S-K256R, A088T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-T158S-N243V-L257G, A116T-G131H-N218S-N243V-S248N, A116T-G131H-S248N-L257G, A116T-S248N-K256R-L257G, A116T-T158S-N218S-N243V-K256R, A116T-T158S-N218S-S248N-L257G-Q271R, A116T-T158S-N243V-K256R-L257G, A116T-T158S-N243V-S248N-L257G, G131H-S248N, G131H-T158S-I234T-N243V-K256R, G131H-W241L-N243V-S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-A137V-T158S-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-A151S-N218S-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, N109G-A116T-G131H-

T158S-N218S-S248N, N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N, N109G-A116T-S248N, N109G-A116T-T158S-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S-W241R-N243V, N109G-A116T-T158S-N243V-S248N-L257G, N109G-A116T-T158S-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-S248N-L257G, N109G-G131H-N218S-L257G, N109G-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G-A274T, N109G-K256R, N109G-N243V-L257G, N109G-T158S-N218S-K256R-L257G, N109G-T158S-N218S-L257G, N109G-T158S-S248N-K256R, P014L-A015L-L016C-H017T-S018L-Q019K-G020A-Y021T-T022L-G023E, S003F-A008T-N109G-A116T-T158S-N243V-K256R-L257G, V004A-A008T-A116T-T158S-N218S, V004A-N109G-A116T-G131H-S248N-K256R-L257G, V004L-A116T-N218S-N243V-S248N-L257G, Y006H-N109G-N218S-N243V-S248N, A001T-A116T-T158S-N243V-L257G, A088T-A116T, A088T-A116T-G131H-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N243V-L257G, A088T-A116T-G131H-N243V-S248N, A088T-A116T-G131H-T158S-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-S248N, A088T-A116T-G131H-T158S-S248N-L257G, A088T-A116T-K256R, A088T-A116T-K256R-L257G, A088T-A116T-N218S-N243V-L257G, A088T-A116T-N243V-K256R, A088T-A116T-N243V-L257G, A088T-A116T-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-S248N-K256R, A088T-A116T-T158S-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R-N269S, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N243V-K256R, A088T-A116T-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-S248N-K256R, A088T-A116T-V143A-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-V147I-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-G131H-K256R-L257G, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N, A088T-G131H-N218S-S248N-L257G, A088T-G131H-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-K256R, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-S248N, A088T-G131H-T158S-N243V, A088T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218T-N243V, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-N218T-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N243V, A088T-N109G-A116T-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N243V-K256R-L257G-N269D, A088T-N109G-A116T-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-S248N, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N243V, A088T-N109G-G131H-N243V-L257G, A088T-N109G-G131H-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-K256R, A088T-N109G-L257G, A088T-N109G-N218S-K256R, A088T-N109G-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-N243V-S248N-L257G-I268V, A088T-N109G-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-K256R, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-T158S-N243V-K256R-I268V, A088T-N109G-T158S-N243V-S248N-Q275R, A088T-N218S-N243V, A088T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N218S-S248N, A088T-N218S-S248N-L257G, A088T-N243V, A088T-N243V-K256R, A088T-N243V-L257G, A088T-S145T-T158S-S248N, A088T-T158S-L257G, A088T-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-T158S-N243V-K256R-L257G-Q271H, A088T-T158S-S248N, A088T-V143A-T158S-K2

K256R, A116T-G131H-N218S, A116T-G131H-N243V, A116T-G131H-N243V-K256R, A116T-G131H-N243V-L257G, A116T-G131H-S248N-K256R, A116T-G131H-T158S-N218S-I234T-N243V-S248N-K256R, A116T-G131H-T158S-N243V-L257G, A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, A116T-G131H-V143F-T158S-N218S, A116T-L257G, A116T-N218S, A116T-N218S-L257G, A116T-N218S-N243V-L257G, A116T-N243V, A116T-N243V-K256R, A116T-N243V-S248N, A116T-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-S248N, A116T-T158S, A116T-T158S-N218S-N243V, A116T-T158S-N218S-S248N, A116T-T158S-N243V, A116T-T158S-N243V-K256R, A116T-T158S-N243V-L257G, A116T-T158S-N243V-S248N, A116T-T158S-S248N-K256R-L257G, A116T-V149I-T158S-N243V-S248N-K256R-Q271H, G131H-N218S-N243V-L257G, G131H-N243V, G131H-N243V-S248N-K256R, G131H-T158S, G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-N243V-K256R, N109G-A116T-G131H-N243V-L257G, N109G-A116T-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-S248N, N109G-A116T-G131H-S248N-I268V, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-S248N, N109G-A116T-G131H-T158S-S248N-K256R, N109G-A116T-N218S, N109G-A116T-N218S-N243V-K256R, N109G-A116T-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-N218S-S248N-L257G, N109G-A116T-N218S-N243V-K256R, N109G-A116T-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-S248N-L257G, N109G-A116T-T158S-G211V-N243V-S248N-K256R, N109G-A116T-T158S-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S, N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-N243V, N109G-A116T-T158S-Q275R, N109G-G131H-A137V-T158S-N218S-S248N, N109G-G131H-N218S-K237N, N109G-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-G131H-N218S-S248N-K256R, N109G-G131H-N243V-K256R-L257G, N109G-G131H-S145F-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-G131H-S248N-K256R, N109G-G131H-S248N-L257G, N109G-G131H-T158S-K256R, N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, N109G-G131H-T158S-N243V, N109G-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-S248N-L257G, N109G-G131H-T158S-S248N-Q271R, N109G-N218S-L257G, N109G-N218S-N243V, N109G-N243V-K256R-L257G, N109G-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-T158S-I268V, N109G-T158S-K256R, N109G-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-T158S-N218S-S248N-L257G, N109G-T158S-N243V, N109G-T158S-N243V-K256R-L257G, N109G-T158S-N243V-S248N, N109S-A116T-S248N, N218S, N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, N218S-S248N-L257G, N243V, N243V-K256R, N243V-S248N-K256R, N243V-S248N-K256R-L257G, S105P-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, S248N, T158S-N243V-K256R, y T158S-N243V-L257G, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN', BPN'-v3, y BPN'-v36, y un valor de PI mayor que el de la BPN', BPN'-v3, y BPN'-v36 en este ensayo.

[0365] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de aproximadamente 1,0 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en

40 A088T, A088T-A116T-G131H-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-A274T, A088T-A116T-G131H-N218S-K256R, A088T-A116T-G131H-N218S-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-N243V, A088T-

45 A116T-G131H-N243V-K256R, A088T-A116T-G131H-N243V-S248N, A088T-A116T-G131H-N243V-S248N-A274V, A088T-A116T-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-L257G,

50 A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-

55 A116T-G131H-T158S-N243V-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-K256R, A088T-A116T-L257G, A088T-A116T-N218S, A088T-A116T-N218S-N243V-K256R, A088T-A116T-N218S-N243V-N269D, A088T-A116T-N218S-N243V-S248N, A088T-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-N218S-S248N, A088T-A116T-N218S-S248N-L257G, A088T-A116T-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-S248N, A088T-A116T-S248N-K256R, A088T-A116T-T158S-A216S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-

[illegible]

[illegible]

- N243V-S248N, N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-N243V-K256R-L268V, N109G-G131H-T158S-N243V-S248N, N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, N109G-G131H-T158S-S248N, N109G-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, N109G-K141E-N218S-S248N-L257G, N109G-N218S, N109G-N218S-N243V-K256R, N109G-N218S-N243V-L257G, N109G-N218S-N243V-S248N-S260F, N109G-N218S-S248N, N109G-N218S-S248N-K256R, N109G-N243V-K256R, N109G-N243V-S248N, N109G-N243V-S248N-K256R, N109G-N243V-S248N-L257G, N109G-N243V-S248N-L257G-Q275R, N109G-S182F-S204F-S207L-N218S-S236F-S248N-L257G, N109G-S248N-K256R, N109G-T158S-K256R-L257G, N109G-T158S-L257G, N109G-T158S-N218S-N243V-K256R, N109G-T158S-N218S-N243V-S248N, N109G-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, N109G-T158S-N243V-K256R, N109G-T158S-N243V-S248N-K256R, N109G-T158S-N243V-S248N-L257G, N109G-T158S-S248N-L257G, N218S-N243V-L257G, N218S-N243V-S248N-K256R, N243V-K256R-L257G, N243V-S248N-L257G-Q271R, P057Q-A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N, S003P-A116T-N218S-K256R, S003P-N109G-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, S248N-K256R-L257G, T158S-K256R-L257G, T158S-N218S-A272V, T158S-N218S-K256R-L257G, T158S-N218S-L233S, T158S-N218S-N243V, T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, T158S-N218S-N243V-L257G, T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, T158S-N218S-S248N-K256R, T158S-N243V, T158S-N243V-K256R-L257G, T158S-N243V-S248N, T158S-N243V-S248N-K256R-N269D, y V004A-N109G-A116T-T158S-N218S-S248N-L257G, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.
- 20 **[0366]** Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de aproximadamente 0,9 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en
- 25 A088T-A098S-N218S-K256R, A088T-A116T-G131H-K256R, A088T-A116T-G131H-K256R-L257G-L267M, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-N243V, A088T-A116T-G131H-S248N, A088T-A116T-G131H-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-K256R-L257G, A088T-A116T-N218S-I268V, A088T-A116T-N218S-K256R, A088T-A116T-N218S-N243V-Q271R, A088T-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R-Q275R, A088T-A116T-N218S-S248N, A088T-A116T-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-T158S, A088T-A116T-T158S-N218S-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-S248N, A088T-A116T-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-A116T-T158S-S248N-L257G, A088T-G131H, A088T-G131H, A088T-G131H-N218S-K237R-K256R-L257G, A088T-G131H-N218S-K256R, A088T-G131H-N218S-K256R-L257G, A088T-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-G131H-N218S-N243V-L257G, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-N218S-S248N, A088T-G131H-N243V, A088T-G131H-N243V-K256R, A088T-G131H-N243V-K256R-L257G, A088T-G131H-N243V-S248N, A088T-G131H-N243V-S248N, A088T-G131H-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-S248N, A088T-G131H-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-N269D, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-Q275R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-L257G-I268V, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-W241L-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-K256R, A088T-N109G-A116T-N218S-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-N218S, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-A138V-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V,

A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G,
 A088T-N109G-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G-Q275R, A088T-N109G-G131H-N243V-S248N, A088T-
 N109G-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S, A088T-N109G-G131H-T158S-
 L233S-N243V-S248N, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-
 5 N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-
 N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-
 S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-
 S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-S248N-K256R-
 L257G, A088T-N109G-G131H-V149A-K256R-L257G, A088T-N109G-N218S-K256R-L257G, A088T-N109G-
 10 N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-N218S-N243V-S248N, A088T-
 N109G-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-N243V-
 K256R, A088T-N109G-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S,
 A088T-N109G-T158S-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-T158S-
 N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-T158S-
 15 N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-S248N, A088T-N109G-T158S-S248N, A088T-
 N109G-T158S-S248N, A088T-N218S-N243V-K256R, A088T-N218S-N243V-L257G, A088T-N218S-N243V-
 S248N, A088T-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N218S-S248N,
 A088T-N218S-S248N-L257G, A088T-S248N-K256R-L257G, A088T-T158S-K256R, A088T-T158S-N218S-
 N243V-K256R, A088T-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-T158S-
 20 N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-T158S-N218S-
 N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-T158S-N218S-S248N,
 A088T-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-T158S-N218S-S248N-
 L257G-Q275K, A088T-T158S-N243V, A088T-T158S-N243V-K256R, A088T-T158S-N243V-S248N, A088T-
 T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-T158S-S248N-L257G, A088T-V147I-N218S-N243V-K256R-L257G, A116T-
 25 G131H-L257G, A116T-G131H-N218S-N243V, A116T-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, A116T-G131H-
 N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-G131H-N218S-S248N, A116T-G131H-N218S-S248N-K256R,
 A116T-G131H-N243V-S248N-K256R, A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A116T-G131H-T158S-
 N218S-S248N, A116T-G131H-T158S-N243V-K256R, A116T-G131H-V139I-N218S-N243V-S248N, A116T-
 K141E-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-K256R, A116T-N218S-N243V-S248N, A116T-N218T-
 30 N243V-S248N, A116T-N243V-K256R-L257G, A116T-S248N-K256R, A116T-T158S-N218S-K256R, A116T-
 T158S-N218S-K256R-L257G, A116T-T158S-N218S-N243V-L257G, A116T-T158S-N218S-N243V-S248N,
 A116T-T158S-N218S-S248N-L257G, G024S-G053S-N078S-G097A-N101S, G053S-A088T-N109G-A116T-
 G131H-T158S-G169S-N218S-S248N-K256R-L257G, G131H-K141R-T158S-N218S-K256R, G131H-K256R,
 G131H-N218S-K256R-L257G, G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, G131H-N218S-S248N-K256R, G131H-
 35 N243V-S248N, G131H-N243V-S248N-L257G, G131H-T158S-N218S, G131H-T158S-N218S-N240H-N243V-
 S248N-K256R-L257G, G131H-T158S-N218S-N243V, G131H-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, G131H-
 T158S-N243V-L257G, G131H-T158S-N243V-S248N, G131H-T158S-S248N, K256R, K256R-L257G,
 N109G-A116T-G131H-N218S-N243V, N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-L257G, N109G-A116T-G131H-
 N218S-S248N-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-W241R-N243V-K256R, N109G-A116T-G131H-S248N-
 40 L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-K256R, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-
 L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-
 S248N-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-
 S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-
 45 K256R-L257G, N109G-A116T-N218S-N243V-S248N, N109G-A116T-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-
 T158S-N218S-K237R-N243V-S248N, N109G-G131H-N218S-N243V-S248N, N109G-G131H-S248N, N109G-
 G131H-T158S, N109G-G131H-T158S-L257G, N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, N109G-
 G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, N109G-G131H-T158S-
 N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-S248N-K256R, N109G-N218S-K256R-L257G, N109G-
 N218S-N243V-S248N-K256R, N109G-N218S-S248N-L257G, N109G-S248N, N109G-T158S-N218S, N109G-
 50 T158S-N218S-N243V, N109G-T158S-N243V-L257G, N218S-K256R, N218S-N243V-K256R, N218S-N243V-
 S248N, N218S-S248N, N218S-S248N-K256R, N243V-L257G, S003P-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-
 S248N, S003P-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-K256R, S105H-W106G-I107L-I108S-N109A-G110A-I111S-
 E112N-W113G-A114P, S248N-L257G, T158S, T158S-K256R, T158S-N218S, T158S-N218S-K256R, T158S-
 N218S-L233S-S248N, T158S-N218S-L257G, T158S-N218S-N243V-K256R, T158S-N218S-N243V-S248N,
 55 T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, T158S-N218S-S248N-L257G,
 T158S-N243V-S248N-L257G, T158S-S248N, y V004L-A088T-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, donde las
 posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID
 NO:2.

[0367] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI igual o mayor que 0,5 y
 60 menor que 0,9 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BML en la Composición
 detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q
 (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo
 que consiste en A015S-A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-S248N, A088T-A098S-G131H-S248N-K256R-
 L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-L257G,

- A088TA116T-G131H-T158S-N218S-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-N218S-L257G, A088T-A116T-T158S-K256R, A088T-A116T-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-K141E-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-G131H-K256R, A088T-G131H-N218S-K256R, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-I107T-N109G-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-D140G-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-L268V, A088T-N109G-A116T-G131H-V149A-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-D140G-N243V, A088T-N109G-G131H-D140G-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-K141E-T158S-N218S-K256R, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N-K256R-Q271R, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-V149L-T158S-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S, A088T-N109G-T158S-N218S-K256R-L257G-Q271K, A088T-N109G-T158S-N218S-L257G, A088T-N109G-T158S-S248N-K256R, A088T-N218S-S248N-L257G-Q271R, A088T-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-Y104H-A116T-G131H-N218S-N243V, A116T-G131H-K141E-N218S-N243V-S248N-L257G, A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G-N269D, A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-Q271R, A116T-G131H-T158S-N243V-S248N, A116T-G157E-T158S-N243V-S248N-K256R, A116T-T158S-N218S, G131H-N218S-L257G, G131H-N218S-S248N, G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, G131H-T158S-N218S-S248N-L268V, I107T-N109G-G131H-N218S-L257G, L090I-N109G-T158S-N243V, L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-K256R-L257G-Q271R, N109G-A116T-N218S-W241R-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-K141E-L257G, N109G-G131H-N218S-N243V, N109G-T158S-N218S-N243V-L257G, N109G-T158S-N218S-S248N-K256R, N109G-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, N218S-S248N-K256R-L257G, S003P-N109G-G131H-T158S-L257G, S003P-S248N-L257G, T158S-S248N-K256R-L257G, V004A-A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, Y006H-N218S-N243V-S248N, Y104H-N109G-G131H-N243V-S248N, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-T158S-N243V, A088T-G131H-T158S-N218S-I234T-S248N-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-V149L-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-I107T-N109G-G131H-N218S-A223G-S248N-K256R, A088T-K213N-N243V-S248N-K256R, A088T-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-A232S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-D140G-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-M124I-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-V148A-N218S-N243V, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-N218S-S248N-T255K-K256R-L257G, A088T-T158S-N218S-L257G, A088T-T158S-N218S-Q245K-S248N-K256R, A088T-T158S-N218S-S248N-K256R, A116T-G131H-N218S-N243V-K256R, A116T-G131H-N218S-W241R-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-G131H-T158S-N218S-L257G, A116T-G131H-V150A-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, I107T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-K141E-T158S-N218S-N243V-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N, T158S-N243V-S248N-K256R, T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-G146C, A088T-A116T-N218S, A088T-A116T-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-A138E-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243F-S248N, A088T-T158S-V203I-N218S-K256R-L257G, A116T-D140G-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-A116T-T158S-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-E251K-K256R-L257G, A088T-I108T-N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-K141E-N218S, A088T-N109G-W241R-S248N-K256R, y G065D-A088T-G131H-N243V-S248N, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.
- [0368]** Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de más de 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de más de 1,0 a aproximadamente 10, de más de 1,0 a aproximadamente 8, o de más de 1,0 a aproximadamente 5 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de huevo en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-L257G, A116T-N218S-N243V-L257G-N269S, A088T-A116T-K256R, A088T-G131H-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-A273T, A088T-A116T-N243V-L257G, A088T-A116T-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N243V-L257G, A088T-A116T-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-K256R-L257G, A088T-N109G-N218S-S248N-L257G, A088T-T158S-N218S-N243V-K256R-L268V, A088T-T158S-N218S-S248N-L257G, A116T-N218S-K256R-L257G, N109G-A116T, N109G-

A116T-G131H-T158S-L257G, N109G-A116T-N243V, N109G-A116T-N243V-K256R, N109G-A116T-T158S-L257G, N109G-K256R, N109G-N243V-K256R-L257G, S003P-N109G-G131H-T158S-K256R, A088T-A116T, A088T-A116T-G131H-N218S-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-A116T-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, A088TA116T-G131H-T158S-S248N-L257G, A088T-A116T-N218S-N243V-L257G, A088T-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R-Q275R, A088T-A116T-T158S-A216S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R-N269S, A088T-A116T-T158S-N243V, A088T-A116T-T158S-N243V-K256R, A088T-A116T-V147IT158S-N218S-N243V-L257G, A088T-G131H-K256R-L257G, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-I107T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-I107T-N109G-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-A153S-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-N218T-K256R, A088T-N109G-A116T-N218T-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N243V, A088T-N109G-A116T-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N243V-K256R-L257G-N269D, A088T-N109G-A116T-T158S, A088T-N109G-A116T-T158S, A088T-N109G-A116T-T158S-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-A138V-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-V149A-K256R-L257G, A088T-N109G-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-N243V, A088T-N109G-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-N243V-L257G, A088T-N109G-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-K256R, A088T-N109G-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N243V-L257G, A088T-N109G-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-N218S-N243V-L257G, A088T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N218S-S248N, A088T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-V143A-T158S-K256R, A088T-V147I-N218S-N243V-K256R-L257G, A114S-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-G131H-N243V-K256R, A116T-G131H-N243V-L257G, A116T-G131H-N243V-S248N-K256R, A116T-G131H-S248N-L257G, A116T-G131H-T158S-N218S-I234T-N243V-S248N-K256R, A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A116T-N218S-L257G, A116T-T158S-N218S-K256R-L257G, A116T-T158S-N218S-S248N, A116T-T158S-N218S-S248N-L257G-Q271R, A116T-T158S-N243V-S248N-L257G, A116T-T158S-S248N-L257G, G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, I107T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-A137V-T158S-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-A151S-N218S-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-L257G, N109G-A116T-G131H-N243V-L257G, N109G-A116T-G131H-S248N-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-K256R-L257G, N109G-A116T-N218S-N243V-K256R, N109G-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-N218S-N243V-S248N-L257G, N109G-A116T-N243V-S248N-K256R, N109G-A116T-S248N-L257G, N109G-A116T-T158S-G211V-N243V-S248N-K256R, N109G-A116T-T158S-N218S, N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N, N109G-G131H-N218S-K237N, N109G-G131H-N218S-K256R-L257G, N109G-G131H-N218S-L257G, N109G-G131H-N218S-N243V-L257G, N109G-G131H-N243V-K256R-L257G, N109G-G131H-N243V-S248N-L257G, N109G-G131H-S248N-K256R, N109G-G131H-T158S-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-N218S-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-N243V, N109G-N218S, N109G-N218S-N243V-L257G, N109G-T158S-N218S-K256R-L257G, N109G-T158S-N218S-L257G, N109G-T158S-N218S-N243V-K256R, N109G-T158S-N243V-L257G, N243V-K256R-L257G, N243V-L257G, S003F-A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-K256R-L257G, T158S-N218S-L233S, T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, V004A-N109G-A116T-T158S-N218S-S248N-L257G, Y006H-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-A272G, A088T-A098S-N218S-K256R, A088T-A116T-G131H-K256R-L257G-L267M, A088T-A116T-G131H-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-A274T, A088T-A116T-G131H-N218S-K256R, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-

[illegible]

G131H-N218S-K256R, A088T-N109G-G131H-N218S-K256R, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-K256R,
 A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-
 N109G-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N, A088T-N109G-G131H-
 N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N243V-K256R-
 5 L257G, A088T-N109G-G131H-N243V-L257G, A088T-N109G-G131H-N243V-L257G, A088T-N109G-G131H-
 N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N243V-
 S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-K256R-L257G, A088T-
 N109G-G131H-T158S-N218S-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-L257G, A088T-N109G-G131H-
 T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-
 10 G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-
 G131H-T158S-N243V, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-S248N, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-
 S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-
 S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-
 W241R-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-V148A-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-G154A-
 15 N155P-E156T-G157L-T158M-S159E-G160E-S161L, A088T-N109G-N218S-K256R, A088T-N109G-N218S-
 N243V-L257G, A088T-N109G-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-N243V-K256R, A088T-N109G-N243V-
 S248N, A088T-N109G-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-S248N, A088T-N109G-T158S-N218S,
 A088T-N109G-T158S-N218S-K256R, A088T-N109G-T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-
 N218S-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-
 20 S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-T158S-N218S-S248N-
 K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N243V-K256R, A088T-N109G-T158S-N243V-K256R, A088T-N109G-
 T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-S248N-
 L257G, A088T-N109G-T158S-S248N-L257G, A088T-N109G-V147A-N218S-N243V-K256R, A088T-N218S-
 L257G-I268V, A088T-N218S-N243V, A088T-N218S-N243V-S248N, A088T-N218S-N243V-S248N-N269S,
 25 A088T-N218S-S248N-K256R, A088T-N218S-S248N-L257G-Q271R, A088T-N243V, A088T-N243V, A088T-
 N243V-K256R, A088T-N243V-S248N-K256R, A088T-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-S248N, A088T-
 T158S-N218S-K256R-L257G, A088T-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-T158S-N218S-N243V-L257G,
 A088T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G,
 A088T-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-T158S-N243V-K256R-L257G-Q271H, A088T-T158S-N243V-
 30 S248N, A088T-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-T158S-S248N, A088T-V147A-K256R, A116T-G131H-
 K256R, A116T-G131H-N218S, A116T-G131H-N218S-K256R-L257G, A116T-G131H-N218S-L257G, A116T-
 G131H-N218S-N243V, A116T-G131H-N218S-S248N-K256R, A116T-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G,
 A116T-G131H-N243V-S248N, A116T-G131H-N243V-S248N-L257G, A116T-G131H-S248N-K256R, A116T-
 G131H-T158S-A231V-N243V-L257G, A116T-G131H-T158S-N218S-K256R, A116T-G131H-T158S-N218S-
 35 K256R-L257G, A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-
 S248N-K256R, A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-G131H-T158S-N218S-
 S248N, A116T-G131H-T158S-N243V-L257G, A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, A116T-G131H-
 T158S-S248N-K256R, A116T-G131H-T158S-S248N-L257G, A116T-G131H-V143F-T158S-N218S, A116T-
 K256R, A116T-N218S, A116T-N218S-K256R, A116T-N218S-N243V-L257G, A116T-N218S-N243V-S248N-
 40 K256R, A116T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-N218S-N243V-S248N-L257G, A116T-N218S-
 S248N-L257G, A116T-N243V, A116T-N243V-K256R-L257G, A116T-N243V-S248N, A116T-N243V-S248N-
 K256R-L257G, A116T-S248N-K256R-L257G, A116T-T158S-K256R-L257G, A116T-T158S-N218S, A116T-
 T158S-N218S-K256R, A116T-T158S-N218S-N243V, A116T-T158S-N218S-N243V-S248N, A116T-T158S-
 N218S-S248N-K256R, A116T-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, A116T-T158S-N243V-K256R, A116T-
 45 T158S-N243V-L257G, A116T-T158S-N243V-S248N, A116T-T158S-S248N-K256R-L257G, G131H-K141R-
 T158S-N218S-K256R, G131H-N218S, G131H-N218S-K256R, G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, G131H-
 N218S-N243V-S248N, G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, G131H-N243V-S248N-K256R, G131H-N243V-
 S248N-K256R-L257G, G131H-S248N, G131H-T158S-I234T-N243V-K256R, G131H-T158S-N218S-K256R-
 L257G, G131H-T158S-N218S-N243V, G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, G131H-T158S-N218S-
 50 S248N-K256R-L257G, G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, G131H-T158S-N243V-K256R, G131H-T158S-
 N243V-S248N-L257G, N109G, N109G-A116T-G131H-A144V-T158S-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-
 G131H-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-K256R, N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-
 K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-N218S-S248N-L257G,
 N109G-A116T-G131H-N243V-K256R, N109G-A116T-G131H-N243V-S248N, N109G-A116T-G131H-N243V-
 55 S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-S248N, N109G-A116T-G131H-S248N-K256R, N109G-A116T-
 G131H-T158S-K256R, N109G-A116T-G131H-T158S-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-
 K256R, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-L257G,
 N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-
 L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N, N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-L257G, N109G-
 60 A116T-G131H-T158S-N243V-S248N, N109G-A116T-G131H-T158S-S248N, N109G-A116T-G131H-T158S-
 S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-V149A-T158S-
 N218S-N243V-S248N-L257G, N109G-A116T-N218S, N109G-A116T-N218S-K256R, N109G-A116T-N218S-
 N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-N218S-N243V-S248N-I268V, N109G-A116T-N243V-K256R-L257G,
 N109G-A116T-N243V-S248N, N109G-A116T-N243V-S248N-L257G, N109G-A116T-T158S, N109G-A116T-
 65 T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-

A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-N243V-L257G, N109G-A116T-T158S-Q275R, N109G-A116T-T158S-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-L257G, N109G-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, N109G-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-N243V-K256R, N109G-G131H-S145F-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-G131H-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-S248N-L257G, N109G-G131H-T158S-K256R, N109G-G131H-T158S-N218S-L257G, N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-L257G, N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G-A274T, N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, N109G-G131H-T158S-N243V-S248N, N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-S248N-L257G, N109G-N218S-K256R-L257G, N109G-N218S-L257G, N109G-N218S-N243V-K256R, N109G-N218S-N243V-S248N-S260F, N109G-N218S-S248N, N109G-N243V-K256R, N109G-N243V-L257G, N109G-N243V-S248N, N109G-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-S182F-S204F-S207L-N218S-S236F-S248N-L257G, N109G-S248N-K256R, N109G-T158S-K256R, N109G-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-T158S-N218S-S248N-L257G, N109G-T158S-N243V, N109G-T158S-N243V-K256R, N109G-T158S-N243V-S248N, N109G-T158S-N243V-S248N-K256R, N109G-T158S-S248N-K256R, N109G-T158S-S248N-L257G, N218S, N218S-N243V-S248N-K256R, N218S-S248N-L257G, N243V-K256R, N243V-S248N-K256R, N243V-S248N-K256R-L257G, N243V-S248N-L257G-Q271R, S003P-A116T-T158S-S248N-K256R, S248N, T158S-N218S, T158S-N218S-A272V, T158S-N218S-L257G, T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, T158S-N218S-N243V-L257G, T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, T158S-N243V-K256R, T158S-N243V-K256R-L257G, T158S-N243V-S248N-K256R, V004A-N109G-A116T-G131H-S248N-K256R-L257G, y Y006H-A116T-G131H-S248N, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con posiciones de la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN', BPN'-v3, y BPN'-v36, y un valor de PI mayor que el de la BPN', BPN'-v3, y BPN'-v36 en este ensayo.

[0369] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de aproximadamente 1,0 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de huevo en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en A015S-A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-S248N, A088T, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-N243V, A088T-A116T-G131H-N243V-K256R, A088T-A116T-G131H-N243V-S248N, A088T-A116T-G131H-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-S248N, A088T-A116T-G131H-T158S-S248N, A088T-A116T-G131H-T158S-S248N-L257G, A088T-A116T-N218S-S248N, A088T-A116T-N218S-S248N, A088T-A116T-N218S-S248N-L257G, A088T-A116T-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-S248N-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-S248N, A088T-A116T-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-A116T-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-T158S-S248N, A088T-A116T-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-T158S-S248N-L257G, A088T-A116T-V143A-N218S-S248N-K256R, A088T-G131H-A138V-N218S-L257G, A088T-G131H-K141E-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-G131H-K256R, A088T-G131H-N218S-K256R, A088T-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-N218S-S248N, A088T-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-G131H-N243V-K256R-L257G, A088T-G131H-N243V-S248N, A088T-G131H-N243V-S248N, A088T-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-S248N, A088T-G131H-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-K256R, A088T-G131H-T158S-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-S248N, A088T-G131H-T158S-N218S-S248N, A088T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N243V, A088T-G131H-T158S-N243V-K256R, A088T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-G131H-T158S-S248N-L257G, A088T-I107T-N109G-G131H-N218S-A223G-S248N-K256R, A088T-L257G, A088T-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-A232S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-N269D, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-

G131H-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-
 N243F-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-
 N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218T-K256R, A088T-N109G-
 A116T-G131H-T158S-N243V, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-
 5 G131H-T158S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-I268V, A088T-
 N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-S248N, A088T-
 N109G-A116T-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-K256R, A088T-N109G-A116T-N218S-K256R, A088T-N109G-A116T-
 N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-
 10 N218S-S248N, A088T-N109G-A116T-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-S248N, A088T-N109G-
 A116T-T158S-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V, A088T-
 N109G-A116T-T158S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-
 G131H-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-N218S-
 S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G-Q275R, A088T-N109G-G131H-
 15 N218S-S248N-K256R-Q271R, A088T-N109G-G131H-N243V, A088T-N109G-G131H-N243V-K256R, A088T-
 N109G-G131H-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-S248N-
 L257G, A088T-N109G-G131H-T158S, A088T-N109G-G131H-T158S, A088T-N109G-G131H-T158S-K256R,
 A088T-N109G-G131H-T158S-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-
 G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-
 20 N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-
 S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-K256R, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-K256R-
 L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-S248N,
 A088T-N109G-G131H-T158S-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-V149A-K256R-L257G, A088T-N109G-
 G131H-V149L-T158S-K256R-L257G, A088T-N109G-K256R, A088T-N109G-K256R-L257G, A088T-N109G-
 25 K256R-L257G, A088T-N109G-L257G, A088T-N109G-N218S-K256R, A088T-N109G-N218S-N243V-K256R,
 A088T-N109G-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-
 N218S-S248N, A088T-N109G-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-N243V-K256R, A088T-N109G-N243V-
 S248N-L257G-I268V, A088T-N109G-S248N, A088T-N109G-S248N-K256R, A088T-N109G-T158S-K256R-
 L257G, A088T-N109G-T158S-N218S, A088T-N109G-T158S-N218S-K256R-Q271H, A088T-N109G-T158S-
 30 N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-
 N243V-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-T158S-N218S-S248N-
 N269D, A088T-N109G-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N243V-S248N-A274D, A088T-
 N109G-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G-N269D, A088T-N218S-K256R, A088T-N218S-N243V, A088T-
 N218S-N243V-K256R, A088T-N218S-N243V-K256R-L257G, A088T-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-
 35 N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N218S-S248N-L257G, A088T-N243V-S248N, A088T-N243V-S248N-
 K256R, A088T-N243V-S248N-L257G, A088T-S145T-T158S-S248N, A088T-S248N-K256R-L257G, A088T-
 S248N-L257G, A088T-T158S, A088T-T158S, A088T-T158S-K256R, A088T-T158S-L257G, A088T-T158S-
 N218S, A088T-T158S-N218S-K256R, A088T-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-T158S-N218S-N243V-
 K256R-L257G, A088T-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-T158S-N218S-S248N, A088T-T158S-N218S-
 40 S248N, A088T-T158S-N243V, A088T-T158S-N243V-K256R, A088T-T158S-N243V-S248N-L257G, A116T,
 A116T-G131H-L257G, A116T-G131H-N218S-K256R, A116T-G131H-N218S-N243V-K256R, A116T-G131H-
 N218S-N243V-K256R-L257G, A116T-G131H-N218S-N243V-S248N, A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-
 K256R, A116T-G131H-N218S-S248N, A116T-G131H-T158S-K256R, A116T-G131H-T158S-N218S-L257G,
 A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-K256R, A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-L257G, A116T-G131H-
 45 T158S-N218S-N243V-S248N, A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G-N269D, A116T-G131H-T158S-
 N218S-S248N-Q271R, A116T-G131H-T158S-N218T-L257G, A116T-G131H-T158S-N243V-K256R, A116T-
 G131H-V150A-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-K141E-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G,
 A116T-L257G, A116T-N218S-N243V-S248N, A116T-N218T-N243V-S248N, A116T-N243V-S248N-L257G,
 A116T-S248N, A116T-S248N-L257G, A116T-T158S-K256R, A116T-T158S-N218S-L257G, A116T-T158S-
 50 N218S-N243V-K256R, A116T-T158S-N218S-N243V-L257G, A116T-T158S-N243V, A116T-T158S-N243V-
 K256R-L257G, A116T-T158S-N243V-S248N-K256R, A116T-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-
 V149I-T158S-N243V-S248N-K256R-Q271H, G024S-G053S-N078S-G097A-N101S, G024S-G053S-N078S-
 G097A-N101S-A128S, G131H-K256R, G131H-N218S-K256R-L257G, G131H-N218S-N243V-L257G, G131H-
 N218S-N243V-S248N-K256R, G131H-N218S-S248N-K256R, G131H-N218S-S248N-L257G, G131H-N243V,
 55 G131H-N243V-S248N, G131H-N243V-S248N-L257G, G131H-T158S-K256R-L257G, G131H-T158S-N218S,
 G131H-T158S-N218S-K256R, G131H-T158S-N218S-N240H-N243V-S248N-K256R-L257G, G131H-T158S-
 N218S-N243V-K256R, G131H-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, G131H-T158S-N218S-N243V-S248N,
 G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, G131H-T158S-N218S-S248N-I268V, G131H-T158S-
 N218S-S248N-K256R-L257G-N269S, G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, G131H-T158S-N243V-S248N,
 60 G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, G131H-T158S-S248N, G131H-T158S-S248N-L257G, G131H-W241L-
 N243V-S248N-K256R, I107T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, I107T-N109G-G131H-N218S-
 L257G, N109G-A116T-G131H-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-L257G, N109G-A116T-G131H-N218S-
 N243V, N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-N218S-W241R-N243V-
 K256R, N109G-A116T-G131H-N243V-S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-S248N-I268V, N109G-A116T-
 65 G131H-T158S-N218S, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-T158S-

N218S-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-S248N-L257G, N109G-A116T-K141E-T158S-N218S-N243V-L257G, N109G-A116T-K256R, N109G-A116T-N218S-N243V, N109G-A116T-N218S-N243V-S248N, N109G-A116T-N218S-S248N-L257G, N109G-A116T-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-S248N, N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, N109G-A116T-T158S-N218S-W241R-N243V, N109G-A116T-T158S-N243V-S248N, N109G-A116T-T158S-S248N-L257G, N109G-G131H-K256R, N109G-G131H-N218S-K256R, N109G-G131H-N218S-N243V, N109G-G131H-N218S-N243V-K256R-L257G, N109G-G131H-N218S-S248N-K256R, N109G-G131H-N243V, N109G-G131H-N243V-S248N, N109G-G131H-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-S248N, N109G-G131H-T158S-L257G, N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-N243V-L257G, N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R, N109G-G131H-T158S-S248N-K256R, N109G-K141E-N218S-S248N-L257G, N109G-N218S-N243V, N109G-N218S-N243V-S248N-K256R, N109G-N218S-S248N-K256R-L257G, N109G-N218S-S248N-L257G, N109G-N243V-S248N-L257G-Q275R, N109G-T158S-I268V, N109G-T158S-N218S, N109G-T158S-N218S-N243V, N109G-T158S-N218S-N243V-S248N, N109G-T158S-N218S-S248N-K256R, N109S-A116T-S248N, N218S-K256R, N218S-N243V-K256R, N218S-N243V-L257G, N218S-N243V-S248N, N218S-S248N, N218S-S248N-K256R, N218S-S248N-K256R-L257G, S003P-N109G-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, S248N-K256R-L257G, T158S-K256R, T158S-K256R-L257G, T158S-N218S-K256R-L257G, T158S-N218S-L233S-S248N, T158S-N243V, T158S-N243V-S248N-K256R-N269D, T158S-N243V-S248N-L257G, V004L-A116T-N218S-N243V-S248N-L257G, y Y006H-N218S-N243V-S248N, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

[0370] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI igual o mayor que 0,5 y menor que 0,9 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de huevo en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en A088T-A098S-G131H-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-K256R, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-S248N, A088T-A116T-G131H-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-A116T-K256R-L257G, A088T-A116T-K256R-L257G, A088T-A116T-N218S-N243V-Q271R, A088T-A116T-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-T158S, A088T-A116T-T158S, A088T-A116T-T158S-K256R, A088T-A116T-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-A116T-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-G131H, A088T-G131H-L257G, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-G131H-N243V-K256R, A088T-G131H-N243V-L257G, A088T-G131H-N243V-S248N, A088T-G131H-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-N218S-I234T-S248N-L257G, A088T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-G131H-T158S-S248N, A088T-G131H-T158S-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-G131H-V149L-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-K141E-N218S, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-Q275R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-S248N, A088T-N109G-A116T-G131H-V149A-T158S-N218S-K256R, A088T-N109G-A116T-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A137E-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-D140G-N243V, A088T-N109G-G131H-A152S-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-D140G-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-G131H-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V, A088T-N109G-G131H-T158S-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-W241R-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-T158S-S248N-K256R, A088T-N109G-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-T158S, A088T-N109G-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-T158S-N243V-S248N-Q275R, A088T-N109G-T158S-S248N, A088T-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N243V-L257G, A088T-S248N, A088T-T158S-K256R, A088T-T158S-N218S-K256R, A088T-T158S-N218S-L257G, A088T-T158S-N218S-L257G, A088T-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-T158S-N218S-Q245K-S248N-K256R, A088T-T158S-N218S-S248N-L257G-Q275K, A088T-T158S-N243V-K256R, A088T-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-T158S-S248N, A088T-T158S-S248N-K256R-L257G, A088T-T158S-S248N-L257G, A088T-T158S-S248N-L257G, A098S-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-G131H-K141E-N218S-N243V-S248N-L257G, A116T-G131H-N218S-W241R-N243V-S248N-K256R-L257G, A116T-G131H-N243V, A116T-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A116T-G131H-V139I-N218S-N243V-S248N, A116T-N218S-S248N-K256R, A116T-T158S-L257G-Q271R, A116T-T158S-N218S-N243V-K256R-L257G, G053S-A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-G169S-N218S-S248N-K256R-L257G, G131H-N218S-L257G, G131H-T158S, G131H-T158S-K256R, K256R, L090I-N109G-T158S-N243V, L257G, N109G-A116T-G131H, N109G-A116T-

G131H-N243V, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, N109G-A116T-S248N-K256R, N109G-A116T-T158S-N218S-K237R-N243V-S248N, N109G-A116T-T158S-S248N, N109G-G131H-T158S, N109G-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, N109G-G131H-T158S-S248N-Q271R, N109G-N218S-S248N-K256R, N109G-N243V-S248N-L257G, N109G-S248N, N109G-T158S-N218S-N243V-L257G, N109G-T158S-N243V-K256R-L257G, N109G-T158S-N243V-S248N-K256R-L257G, N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, S003P-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-K256R, S003P-N109G-G131H-T158S-L257G, S105H-W106G-I107L-I108S-N109A-G110A-I111S-E112N-W113G-A114P, T158S-N218S-S248N-K256R, T158S-N243V-S248N, T158S-S248N, T158S-S248N-K256R-L257G, V004A-A088T-A116T-T158S-N218S, V004A-A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, Y006H-N109G-N218S-N243V-S248N, Y104H-A116T-T158S-S248N, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-A116T-N218S, A088T-G131D-T158S-N243V-S248N, A088T-G131H-N218S-K237R-K256R-L257G, A088T-G131H-N218S-K256R, A088T-K213N-N243V-S248N-K256R, A088T-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-D140G-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, A088T-N109G-A116T-M124I-G131H-T158S-N218S-S248N-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N218S-S248N, A088T-N109G-G131H-K256R-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-G131H-N243V-S248N, A088T-N109G-G131H-T158S-L233S-N243V-S248N, A088T-N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-N109G-L257G, A088T-N109G-N218S-K256R-L257G, A088T-N109G-N218S-S248N-T255K-K256R-L257G, A088T-N109G-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-S248N, A088T-S248N-K256R-L257G, A088T-S248N-L257G-I268V, A088T-T158S-N243V-L257G, A088T-T158S-V203I-N218S-K256R-L257G, A088T-Y104H-A116T-G131H-N218S-N243V, A116T-D140G-T158S-N218S-N243V-S248N, A116T-G131H-T158S-K256R-L257G, A116T-G131H-T158S-N243V-S248N, A116T-G157E-T158S-N243V-S248N-K256R, A116T-S248N-K256R, G131H-N218S-S248N, G131H-N243V-K256R, G131H-T158S-N243V-L257G, K256R-L257G, N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-N243V-S248N, N109G-A116T-N218S-N243V-L257G, N109G-A116T-N218S-W241R-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-N243V, N109G-A116T-T158S-S248N-K256R, N109G-N243V, N109G-T158S-K256R-L257G, N243V, P014L-A015L-L016C-H017T-S018L-Q019K-G020A-Y021T-T022L-G023E, S003P-S248N-L257G, T158S-N218S-N243V-S248N, T158S-S248N-K256R, Y104H-N109G-G131H-N243V-S248N, A088T-A116T-G131H-L257G, A088T-A116T-G131H-N218S-N243V, A088T-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R, A088T-A116T-G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-A116T-L257G, A088T-A116T-N218S, A088T-A116T-N218S-N243V-S248N, A088T-A116T-T158S-N218S-S248N, A088T-A116T-T158S-N243V-S248N-K256R, A088T-A138E-N218S-N243V-K256R, A088T-G131H-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-G131H-T158S-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-G131H-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-G131H-T158S-N218S-L257G-I268V, A088T-N109G-A116T-G131H-W241L-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-N218S-N243V-S248N-K256R, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-N243V-S248N, A088T-N109G-G131H-N218S-L257G, A088T-N109G-G131H-N218S-S248N, A088T-N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, A088T-N109G-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-S248N-K256R, A088T-N109G-W241R-S248N-K256R, A088T-N218S-S248N-L257G, A088T-T158S-N218S-S248N-K256R, A088T-T158S-N218S-S248N-L257G, A116T-G131H-T158S-N218S-N243V, A116T-N218S-S248N, A116T-N243V-K256R, A116T-T158S, G131H-S248N-K256R, N109G-A116T-G131H-N243V-K256R-L257G, N109G-A116T-I234T-N243V-S248N-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-K256R-L257G, N109G-A116T-T158S-N218S-S248N-K256R, N109G-G131H, N109G-G131H-A137V-T158S-N218S-S248N, N109G-G131H-K141E-L257G, N109G-G131H-T158S-N243V-S248N-L257G, T158S-N218S-N243V-K256R, A088T-A116T-T158S-N243V-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-K256R-L257G, A088T-N109G-T158S-N218S-S248N, A088T-S248N-L257G, A088T-Y104H-N109G-G131H-A137E-T158S-N218S-N243V-S248N-K256R, G065D-A088T-G131H-N243V-S248N, Y104H-N218S-L257G, A088T-A116T-G131H-V150A-N218S-S248N-L257G, A088T-A116T-T158S-K256R-L257G, A088T-I108T-N109G-G131H-T158S-N218S-S248N-K256R-L257G, A088T-N109G-A116T-T158S-S248N-L257G-Q271P, A088T-N109G-A116T-V148A-N218S-N243V, A088T-Y104H-N109G-A116T-A153S-N218S-N243V-S248N-L257G-N269D, y V004M-A116T-V148A-T158S-N243V-S248N-K256R, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

55 EJEMPLO 10

Construcción y rendimiento de limpieza de variantes adicionales de BPN'-v36

[0371] El ADN de las bibliotecas de evaluación del sitio para la BPN'-v36 (descrito en el Ejemplo 7) se mutagenizó de manera adicional mediante PCR propensa a error. Estas bibliotecas se amplificaron con los cebadores P4973 y P4950 (descritos en el Ejemplo 7) utilizando ADN polimerasa *Taq* (Promega). Cada reacción de amplificación por PCR contenía 30 pmol de cada cebador, 100 ng del molde de ADN (SEL de la BPN'-v36) y varias cantidades de $MnCl_2$. La reacción PCR (20 μ L) se calentó inicialmente a 95 °C durante 2,5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 15 segundos, se dejó renaturalizar a 55 °C durante 15

segundos, y se extendió a 72 °C durante 2 minutos. El fragmento de ADN se purificó con gel mediante el kit purificación por bandas de gel QIAGEN®, se digirió por las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III y se ligó con el vector pHPLT-BPN' parcial opt que también se digirió con las mismas enzimas de restricción. Las mezclas de ligamiento se amplificaron utilizando la amplificación por círculo rodante en un kit Templiphi Illustra según la recomendación del fabricante (GE Healthcare) para generar ADN multímero para la transformación en *Bacillus subtilis*. Para este propósito, se mezcló 1 µl de la mezcla de ligamiento con 5 µl del tampón de muestra, se calentó a 95 °C durante 3 minutos y se enfrió en hielo. Después, se añadieron 5 µl del tampón de reacción y 0,2 µl de la enzima a cada tubo, seguido de una incubación a 30 °C durante 10 horas. Los productos de la amplificación por círculo rodante se diluyeron 100 veces y se utilizaron para transformar células de *B. subtilis* (Δ aprE, Δ nprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo). Se mezcló una alícuota de la mezcla de transformación en placas LB que contenían leche desnatada al 1,6 % y 10 µg/mL de neomicina, y se incubaron durante la noche a 37 °C.

[0372] Se cribaron previamente 500 000 de clones en placas con leche desnatada. Muy pocos formaron halos (es decir, que indican la presencia de proteasas funcionales). Se seleccionaron las colonias con halos, se inocularon en 150 µl de medio LB que contiene 10µg/mL de neomicina y se secuenciaron (Quintara). Las secuencias de estos clones se analizaron al buscar combinaciones de mutaciones, que ocurrían en este conjunto muchas veces y pueden proporcionar beneficios para el rendimiento. A fin de evaluar el rendimiento de estas combinaciones de mutaciones, se crearon mutantes dobles en el fondo de la BPN'-v36 por fusión de PCR tal como se describirá a continuación. Para este fin, dos o más fragmentos que se solapan parcialmente se amplificaron mediante cebadores mutagénicos. Las combinaciones de cebadores utilizadas para generar las respectivas variantes se muestran en la Tabla 10-1 y las secuencias del cebador se muestran en la Tabla 10-2.

Tabla 10-1. Pares de cebadores utilizados para amplificar fragmentos					
Variante	Mutación 1	Mutación 2	Fragmento 1	Fragmento 2	Fragmento 3
1	A45S	S236Y	P4974, P6645	P6644, P6647	P6646, P4976
2	A45S	S236G	P4974, P6645	P6644, P6649	P6648, P4976
3	I115T	S183T	P4974, P6651	P6650, P6655	P6654, P4976
4	I115V	N184Y	P4974, P6653	P6652, P6657	P6656, P4976
5	I31T	S37P	P4974, P6659	P6658, P4976	
6	I31T	I35L	P4974, P6661	P6660, P4976	
7	I31V	S38W	P4974, P6663	P6662, P4976	
8	N25K	P129R	P4974, P6665	P6664, P6667	P6666, P4976
9	N25K	P129K	P4974, P6665	P6664, P6669	P6668, P4976
10	P14T	S37T	P4974, P6671	P6670, P6673	P6672, P4976
11	P5L	Q217K	P4974, P6679	P6678, P6681	P6680, P4976
12	P5L	Q217G	P4974, P6679	P6678, P6683	P6682, P4976
13	Q10L	S37P	P4974, P6685	P6684, P6675	P6674, P4976
14	Q10R	S37T	P4974, P6687	P6686, P6673	P6672, P4976
15	S37P	T254S	P4974, P6675	P6674, P6689	P6688, P4976
16	N25K	S37P	P4974, P6665	P6664, P6675	P6674, P4976
17	G24A	S37W	P4974, P6691	P6690, P6677	P6676, P4976
18	N25K	P129R	P4974, P6665	P6664, P6667	P6666, P4976
20	S161P	S162L	P4974, P6695	P6694, P4976	
21	S161P	T253A	P4974, P6693	P6692, P6701	P6700, P4976
22	S161P	S260P	P4974, P6693	P6692, P6703	P6702, P4976
23	S162L	D181H	P4974, P6697	P6696, P6711	P6710, P4976
24	S162L	D181G	P4974, P6697	P6696, P6713	P6712, P4976
25	S18F	S162L	P4974, P6715	P6714, P6697	P6696, P4976

Tabla 10-1. Pares de cebadores utilizados para amplificar fragmentos					
Variante	Mutación 1	Mutación 2	Fragmento 1	Fragmento 2	Fragmento 3
26	S18T	S162P	P4974, P6717	P6716, P6699	P6698, P4976
27	S18P	D120N	P4974, P6719	P6718, P6727	P6726, P4976
28	S18Y	K213R	P4974, P6721	P6720, P6729	P6728, P4976
29	S18L	Y21S	P4974, P6731	P6730, P4976	
30	S18T	Y21N	P4974, P6733	P6732, P4976	
31	S9T	K141F	P4974, P6635	P6734, P6737	P6736, P4976
32	S9T	K141R	P4974, P6635	P6734, P6739	P6738, P4976
33	Q19L	S260N	P4974, P6725	P6724, P6705	P6704, P4976
34	Q19L	S260P	P4974, P6725	P6724, P6703	P6702, P4976
35	N61S	S260P	P4974, P6741	P6740, P6703	P6702, P4976
36	N61D	S260I	P4974, P6743	P6742, P6707	P6706, P4976
37	T253A	S260P	P4974, P6701	P6700, P6703	P6702, P4976
38	A134T	S260G	P4974, P6745	P6744, P6709	P6708, P4976
39	A133V	S260N	P4974, P6648	P6746, P6705	P6704, P4976

Tabla 10-2. Secuencias de cebadores utilizadas para la generación de mutantes dobles de BPN'-v36		
Nombre del cebador	Secuencia del cebador	SEQ ID NO:
P6644	CAGATCTTAAAGTCTCTGGAGGGGCTTCTATGGTGC	SEQ ID NO:64
P6645	CATAGAAGCCCCTCCAGAGACTTTAAGATCTGGATGGCTC	SEQ ID NO:65
P6646	GCATTGATTCTTTACAAGCACCCGAACCTGGACAAAC	SEQ ID NO:66
P6647	CAGTTCGGGTGCTTGTAAGAATCAATGCGGCCGCCCA	SEQ ID NO:67
P6648	GCATTGATTCTTGGAAGCACCCGAACCTGGACAAAC	SEQ ID NO:68
P6649	CCAGTTCGGGTGCTTACCAAGAATCAATGCGGCCGCCCA	SEQ ID NO:69
P6650	CATCGAATGGGCCACAGCGAATAACATGGATGTAATCAAC	SEQ ID NO:70
P6651	CATCCATGTTATTCGCTGTGGCCATTTCGATGCCGTTGAT	SEQ ID NO:71
P6652	CATCGAATGGGCCGTAGCGAATAACATGGATGTAATCAAC	SEQ ID NO:72
P6653	CATCCATGTTATTCGCTACGGCCATTTCGATGCCGTTGAT	SEQ ID NO:73
P6654	CTGTAGACTCTACAAATCAACGTGCCTCTTTTTCCT	SEQ ID NO:74
P6655	AAAGAGGCACGTTGATTTGTAGAGTCTACAGCGCCCACTG	SEQ ID NO:75
P6656	CTGTAGACTCTTCATACCAACGTGCCTCTTTTTCCTCC	SEQ ID NO:76
P6657	GAAAAAGAGGCACGTTGGTATGAAGAGTCTACAGCGCCCA	SEQ ID NO:77
P6658	TAGCGGTTACAGACAGCGGTATCGACCCAAGCCATCCAGATC TTAAAGTCG	SEQ ID NO:78
P6659	ATGGCTTGGGTCGATACCGCTGTCTGTAACCGCTACTTTAACA TTGCCTC	SEQ ID NO:79
P6660	TAAAGTAGCGGTTACAGACAGCGGTTTAGACTCGAGCCATCC AGATCTT	SEQ ID NO:80
P6661	ATGGCTCGAGTCTAAACCGCTGTCTGTAACCGCTACTTTAACA TTGCCTC	SEQ ID NO:81

Tabla 10-2. Secuencias de cebadores utilizadas para la generación de mutantes dobles de BPN'-v36		
Nombre del cebador	Secuencia del cebador	SEQ ID NO:
P6662	GGTTGTAGACAGCGGTATCGACTCGTGGCATCCAGATCTTAA AGTCGCTG	SEQ ID NO:82
P6663	ATGCCACGAGTCGATACCGCTGTCTACAACCGCTACTTTAACA TTGCCTC	SEQ ID NO:83
P6664	CTACACTGGAGGCAAAGTTAAAGTAGCGGTTATCGACA	SEQ ID NO:84
P6665	ATAACCGCTACTTTAACTTTGCCTCCAGTGTAGCCTTGAG	SEQ ID NO:85
P6666	GAGCCTGGGAGCACGTAGCGGCAGTGCGGCACTTAAA	SEQ ID NO:86
P6667	GTGCCGCACTGCCGCTACGTGCTCCCAGGCTCATGTTGAT	SEQ ID NO:87
P6668	TGAGCCTGGGAGCAAAGAGCGGCAGTGCGGCACTTAAA	SEQ ID NO:88
P6669	GTGCCGCACTGCCGCTCTTTGCTCCCAGGCTCATGTTGAT	SEQ ID NO:89
P6670	ATCACAAATTAAAGCCACAGCTCTGCACTCTCAAGGCTAC	SEQ ID NO:90
P6671	AGAGTGCAGAGCTGTGGCTTTAATTTGTGATACGCCGTAA	SEQ ID NO:91
P6672	GACAGCGGTATCGACACAAGCCATCCAGATCTTAAAGTCG	SEQ ID NO:92
P6673	TAAGATCTGGATGGCTTGTGTGCGATACCGCTGTCGATAAC	SEQ ID NO:93
P6674	GACAGCGGTATCGACCCAAGCCATCCAGATCTTAAAGTCG	SEQ ID NO:94
P6675	TAAGATCTGGATGGCTTGGGTGCGATACCGCTGTCGATAAC	SEQ ID NO:95
P6676	GACAGCGGTATCGACTGGAGCCATCCAGATCTTAAAGTCG	SEQ ID NO:96
P6677	TAAGATCTGGATGGCTCCAGTCGATACCGCTGTCGATAAC	SEQ ID NO:97
P6678	ACGCGCAGTCCGTGTTATACGGCGTATCACAAATTAAAGC	SEQ ID NO:98
P6679	ATTTGTGATACGCCGTATAACACGGACTGCGCGTACGCAT	SEQ ID NO:99
P6680	ACAAGTATGGTGCGAAAAACGGGACTTCCATGGCCTC	SEQ ID NO:100
P6681	CATGGAAGTCCCGTTTTTCGCACCATACTTGTTCCCTG	SEQ ID NO:101
P6682	ACAAGTATGGTGCGGGAACGGGACTTCCATGGCCTC	SEQ ID NO:102
P6683	CCATGGAAGTCCCGTTTTCCCGCACCATACTTGTTCCCTG	SEQ ID NO:103
P6684	CTTACGGCGTATCATTAATTAAGCCCCTGCTCTGCAC	SEQ ID NO:104
P6685	GAGCAGGGGCTTTAATTAATGATACGCCGTAAGGCACGGA	SEQ ID NO:105
P6686	CTTACGGCGTATCACGTATTAAGCCCCTGCTCTGCAC	SEQ ID NO:106
P6687	GAGCAGGGGCTTTAATACGTGATACGCCGTAAGGCACGGA	SEQ ID NO:107
P6688	TTTAGAAAACACCTCTACAAAATTGGTGATTCTTTCTAC	SEQ ID NO:108
P6689	TCACCAAGTTTTGTAGAGGTGTTTTCTAAACTGCTGCGGA	SEQ ID NO:109
P6690	AGGCTACACTGGAGCAAATGTTAAAGTAGCGGTTATCGAC	SEQ ID NO:110
P6691	GCTACTTTAACATTTGCTCCAGTGTAGCCTTGAGAGTG	SEQ ID NO:111
P6692	GAGGGAACATCCGGACCATCGAGTACCGTCGGTTATCCA	SEQ ID NO:112
P6693	ACCGACGGTACTCGATGGTCCGGATGTTCCCTCATTCCCA	SEQ ID NO:113
P6694	AGGGAACATCCGGACCATTAAGTACCGTCGGTTATCCAGG	SEQ ID NO:114
P6695	ACCGACGGTACTTAATGGTCCGGATGTTCCCTCATTCCCA	SEQ ID NO:115
P6696	GAACATCCGGATCATTAAGTACCGTCGGTTATCCAGGCA	SEQ ID NO:116
P6697	ATAACCGACGGTACTTAATGATCCGGATGTTCCCTCATTC	SEQ ID NO:117

Tabla 10-2. Secuencias de cebadores utilizadas para la generación de mutantes dobles de BPN'-v36		
Nombre del cebador	Secuencia del cebador	SEQ ID NO:
P6698	GAACATCCGGATCACCAAGTACCGTCGGTTATCCAGGCA	SEQ ID NO:118
P6699	ATAACCGACGGTACTTGGTGATCCGGATGTTCCCTCATTC	SEQ ID NO:119
P6700	GTTTAGAAAACGCAACTACAAAACCTGGTGATTCTTTC	SEQ ID NO:120
P6701	CACCAAGTTTTGTAGTTGCGTTTTCTAACTGCTGCGGAC	SEQ ID NO:121
P6702	CAAAACTTGGTGATCCATTCTACTATGAAAAAGGGCTGAT	SEQ ID NO:122
P6703	TTTCCATAGTAGAATGGATCACCAAGTTTTGTAGTGGTGT	SEQ ID NO:123
P6704	CAAAACTTGGTGATAACTTCTACTATGAAAAAGGGCTGAT	SEQ ID NO:124
P6705	TTTCCATAGTAGAAGTTATCACCAAGTTTTGTAGTGGTGT	SEQ ID NO:125
P6706	CAAAACTTGGTGATATCTTCTACTATGAAAAAGGGCTGAT	SEQ ID NO:126
P6707	TTTCCATAGTAGAAGATATCACCAAGTTTTGTAGTGGTGT	SEQ ID NO:127
P6708	CAAAACTTGGTGATGGATTCTACTATGAAAAAGGGCTGAT	SEQ ID NO:128
P6709	TTTCCATAGTAGAATCCATCACCAAGTTTTGTAGTGGTGT	SEQ ID NO:129
P6710	GTGGGCGCTGTACACTCTTCAAATCAACGTGCCTCTT	SEQ ID NO:130
P6711	CACGTTGATTTGAAGAGTGTACAGCGCCCACTGCAATCAC	SEQ ID NO:131
P6712	GTGGGCGCTGTAGGATCTTCAAATCAACGTGCCTCTT	SEQ ID NO:132
P6713	CACGTTGATTTGAAGATCCTACAGCGCCCACTGCAATCAC	SEQ ID NO:133
P6714	CCTGCTCTGCACTTCCAAGGCTACACTGGAGGCAATG	SEQ ID NO:134
P6715	CTCCAGTGTAGCCTTGAAGTGCAGAGCAGGGGCTTTAAT	SEQ ID NO:135
P6716	CCTGCTCTGCACACACAAGGCTACACTGGAGGCAATG	SEQ ID NO:136
P6717	CTCCAGTGTAGCCTTGTGTGTGCAGAGCAGGGGCTTTAAT	SEQ ID NO:137
P6718	CCTGCTCTGCACCCACAAGGCTACACTGGAGGCAATG	SEQ ID NO:138
P6719	CTCCAGTGTAGCCTTGTGGGTGCAGAGCAGGGGCTTTAAT	SEQ ID NO:139
P6720	CCTGCTCTGCACTACCAAGGCTACACTGGAGGCAATG	SEQ ID NO:140
P6721	CTCCAGTGTAGCCTTGGTAGTGCAGAGCAGGGGCTTTAAT	SEQ ID NO:141
P6722	CCTGCTCTGCACTTACAAGGCTACACTGGAGGCAATG	SEQ ID NO:142
P6723	CTCCAGTGTAGCCTTGTAAAGTGCAGAGCAGGGGCTTTAAT	SEQ ID NO:143
P6724	TGCTCTGCACTCTTAGGCTACACTGGAGGCAATGTTA	SEQ ID NO:144
P6725	TTGCCTCCAGTGTAGCCTAAAGAGTGCAGAGCAGGGGCTT	SEQ ID NO:145
P6726	ATCGCGAATAACATGAACGTAATCAACATGAGCCTGGGA	SEQ ID NO:146
P6727	CTCATGTTGATTACGTTTCATGTTATTCGCGATGGCCCAT	SEQ ID NO: 147
P6728	CTTCCAGGGAACCGTTATGGTGCGAAAACGGGACTT	SEQ ID NO: 148
P6729	GTTTTGCGCACCATAACGGTTCCTGGAAGCGTCGATTG	SEQ ID NO: 149
P6730	CTGCACTTACAAGGCTCTACTGGAGGCAATGTAAAGTAG	SEQ ID NO:150
P6731	TAACATTGCCCTCCAGTAGAGCCTTGTAAGTGCAGAGCAGGGGCTTTAAT	SEQ ID NO:151
P6732	GCTCTGCACTTACAAGGCAACACTGGAGGCAATGTAAAGTAG	SEQ ID NO:152

Tabla 10-2. Secuencias de cebadores utilizadas para la generación de mutantes dobles de BPN'-v36		
Nombre del cebador	Secuencia del cebador	SEQ ID NO:
P6733	AACATTGCCTCCAGTGTTCCTTGTAAAGTGCAGAGCAGGGGC TTTAAT	SEQ ID NO:153
P6734	CTTACGGCGTAACACAAATTAAGCCCCCTGCTCTG	SEQ ID NO: 154
P6735	AGGGGCTTTAATTTGTGTACGCCGTAAGGCACGGACT	SEQ ID NO:155
P6736	TTAAAGCAGCAGTTGATTTTCGCTGTTGCATCTGGTGTCGT	SEQ ID NO:156
P6737	AGATGCAACAGCGAAATCAACTGCTGCTTTAAGTGCCGCA	SEQ ID NO:157
P6738	TTAAAGCAGCAGTTGATCGTGCTGTTGCATCTGGTGTCGT	SEQ ID NO:158
P6739	AGATGCAACAGCACGATCAACTGCTGCTTTAAGTGCCGCA	SEQ ID NO:159
P6740	AAACCCGTTTCAAGATTCTAATTCTCATGGCACACACGTC	SEQ ID NO:160
P6741	TGTGCCATGAGAATTAGAATCTTGAAACGGGTTTGTTCG	SEQ ID NO:161
P6742	AAACCCGTTTCAAGATGATAATTCTCATGGCACACACGTC	SEQ ID NO:162
P6743	TGTGCCATGAGAATTATCATCTTGAAACGGGTTTGTTCG	SEQ ID NO:163
P6744	AAGCGGCAGTGCGACACTTAAAGCAGCAGTTGATAAAGC	SEQ ID NO:164
P6745	TCAACTGCTGCTTTAAGTGTCGCACTGCCGCTTGGTGCTC	SEQ ID NO:165
P6746	CAAGCGGCAGTGTTGCACTTAAAGCAGCAGTTGATAA	SEQ ID NO:166
P6747	ACTGCTGCTTTAAGTGCAACACTGCCGCTTGGTGCTCCCA	SEQ ID NO:167

- [0373]** Cada reacción de amplificación por PCR contenía 30 pmol de cada cebador y 100 ng del molde de ADN original de BPN'-v36 (plásmido pHPLT-BPN'-v36) (véase la figura 4). Las amplificaciones se llevaron a cabo utilizando la ADN polimerasa Vent (NEB). La reacción PCR (20 µL) se calentó inicialmente a 95 °C durante 2,5 minutos seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 15 segundos, se dejó renaturalizar a 55 °C durante 15 segundos, y se extendió a 72 °C durante 40 segundos. Tras la amplificación, los fragmentos del gen 5' y 3' se purificaron con gel mediante el kit de purificación por bandas de gel QIAGEN®, se mezclaron (50 ng de cada fragmento), se mezclaron y se amplificaron por PRC una vez de nuevo utilizando los cebadores P4973 y P4950 para generar el fragmento de gen de longitud completa. Las condiciones de la PCR eran las mismas que las descritas anteriormente, excepto por la fase de extensión, que se llevó a cabo a 72 °C durante 2 minutos. El fragmento de ADN de longitud completa se purificó con gel mediante el kit purificación por bandas de gel QIAGEN®, se digirió por las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III y se ligó con el vector pHPLT-BPN' parcial opt que también se digirió con las mismas enzimas de restricción. Las mezclas de ligamiento se amplificaron utilizando la amplificación por círculo rodante en un kit Templiphi Illustra según la recomendación del fabricante (GE Healthcare) para generar ADN multimérico para la transformación en *Bacillus subtilis*. Para este propósito, se mezcló 1 µl de la mezcla de ligamiento con 5 µl del tampón de muestra, se calentó a 95 °C durante 3 minutos y se enfrió en hielo. Después, se añadieron 5 µl del tampón de reacción y 0,2 µl de la enzima a cada tubo, seguido de una incubación a 30 °C durante 10 horas. Los productos de la amplificación por círculo rodante se diluyeron 100 veces y se utilizaron para transformar células de *B. subtilis* (Δ aprE, Δ nprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo). Una alícuota de la mezcla de la transformación se colocó en placas LB que contenían leche descremada al 1,6 % y 10 µg/mL de neomicina y se incubaron durante toda la noche a 37 °C. Posteriormente, las colonias con halos se inocularon en 150 µl de medio LB que contenía 10 µg/mL de neomicina. Al día siguiente, los cultivos se congelaron con glicerol al 15 %, o se cultivaron en medio MBG para su análisis bioquímico tal como se ha descrito en el Ejemplo 2.
- [0374]** Se analizó el rendimiento de limpieza de las variantes utilizando un ensayo de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a 16 °C y pH 8, un ensayo de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a 16 °C y pH 7, y un ensayo de micromuestras de huevo en la Composición detergente 4 a 16 °C y pH 8. El contenido en proteínas se determinó utilizando el ensayo TCA. Todos los ensayos se llevaron a cabo tal como se ha descrito en el Ejemplo 1 y los Índices de rendimiento se calcularon en relación con la BPN'-v36 (es decir, BPN'-S24G-S53G-S78N-S101N-G128A-Y217Q) (con un valor de PI de 1,0).

[0375] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de aproximadamente 1,0 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en

A133V-S260N, N061S-S260P, P014T-S037T, S009T-K141F, S009T-K141R, S018F-S162L, S018L-Y021S, S018P-D120N, S018T-S162P, S018T-Y021N, S018Y-K213R, S161P-S162L, S161P-S260P, y T253A-S260P, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con posiciones de la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN' (SEQ ID NO:2) y un valor de PI mayor que el de la BPN' en este ensayo.

[0376] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de aproximadamente 0,9 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en A134T-S260G, I115V-N184Y, N025K-S037P, Q010L-S037P, Q019L-S260N, Q019L-S260P, S037P-T254S, y S161P-T253A, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la SEQ ID NO:2.

[0377] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI igual o mayor que 0,5 y menor que 0,9 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en A045S-S236G, G024A-S037W, I031V-S038W, N061D-S260I, Q010R-S037T, I115T-S183T, N025K-P129K, N025K-P129R, A045S-S236Y, y S162L-D181H, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la SEQ ID NO:2.

[0378] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de más de 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de más de 1,0 a aproximadamente 10, de más de 1,0 a aproximadamente 8, o de más de 1,0 a aproximadamente 5 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a pH 7 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en S018F-S162L, S018P-D120N, P014T-S037T, S009T-K141R, y S161P-S162L, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN', BPN'-v3, y BPN'-v36, y un valor de PI mayor que el de la BPN', BPN'-v3, y BPN'-v36 en este ensayo.

[0379] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de aproximadamente 1,0 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a pH 7 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en N061S-S260P, Q010L-S037P, S009T-K141F, S018L-Y021S, S018T-S162P, S018T-Y021N, S018Y-K213R, S037P-T254S, S161P-S260P, S161P-T253A, y T253A-S260P, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN' (SEQ ID NO:2) y un valor de PI mayor que el de la BPN' en este ensayo.

[0380] Se determinó que las siguientes variantes de BPN' tenían un valor de PI de aproximadamente 0,9 relativo a la BPN'-v3 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a pH 7 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN' (SEQ ID NO:2) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en A133V-S260N, A134T-S260G, I115T-S183T, I115V-N184Y, N061D-S260I, Q019L-S260N, y Q019L-S260P, donde las posiciones de la variante están numeradas por correspondencia con la SEQ ID NO:2.

[0381] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI igual o mayor que 0,5 y menor que 0,9 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a pH 7 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en A045S-S236G, G024A-S037W, Q010R-S037T, A045S-S236Y, I031V-S038W, N025K-S037P, S162L-D181H, y N025K-P129R, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la SEQ ID NO:2.

[0382] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de más de 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de más de 1,0 a aproximadamente 10, de más de 1,0 a aproximadamente 8, o de más de 1,0 a aproximadamente 5 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de huevo en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en I031V-S038W, P014T-S037T, S018F-S162L, S018P-D120N, y S162L-D181H, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN', BPN'-v3, y BPN'-v36, y un valor de PI mayor que el de la BPN', BPN'-v3, y BPN'-v36 en este ensayo.

[0383] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de aproximadamente 1,0 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de huevo en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en A133V-S260N, A134T-S260G, G024A-S037W, I115V-N184Y, N025K-P129K, N025K-P129R, N061D-S260I, Q019L-S260P, S009T-K141F, S009T-K141R, S018L-Y021S, S018T-S162P, S018T-Y021N, S018Y-K213R, S161P-S162L, S161P-T253A, y T253A-S260P, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN' (SEQ ID NO:2) y un valor de PI mayor que el de la BPN' en este ensayo.

[0384] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI igual o mayor que 0,8 e igual o menor que 0,9 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de huevo en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en A045S-S236G, A045S-S236Y, I115T-S183T, N025K-S037P, N061S-S260P, Q010L-S037P, Q010R-S037T, Q019L-S260N, S037P-T254S, y S161P-S260P, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la SEQ ID NO:2.

EJEMPLO 11

Composiciones detergentes líquidas para la colada

[0385] En este ejemplo, se proporcionan varias formulaciones para composiciones detergentes líquidas para la colada. Las siguientes composiciones detergentes líquidas para la colada de la presente invención se preparan tal como se muestra a continuación. En cada una de las siguientes formulaciones, al menos una variante de proteasa proporcionada en el presente documento se incluye en una concentración de aproximadamente un 0,0001 a aproximadamente 10 por ciento en peso. En otros aspectos alternativos, se pueden utilizar otras concentraciones, tal como lo determina el formulador, en función de sus necesidades.

Tabla 11-1: Composiciones detergentes líquidas para la colada					
Compuesto	Formulaciones				
	I	II	III	IV	V
LAS	24,0	32,0	6,0	3,0	6,0
NaC ₁₆ -C ₁₇ HSAS	-	-	-	5,0	-
C ₁₂ -C ₁₅ AE _{1,8} S	-	-	8,0	7,0	5,0
Propil dimetilamina C ₈ -C ₁₀	2,0	2,0	2,0	2,0	1,0
Óxido de alquil dimetilamina C ₁₂ -C ₁₄	-	-	-	-	2,0
C ₁₂ -C ₁₅ AS	-	-	17,0	-	8,0
CFAA	-	5,0	4,0	4,0	3,0
Alcohol graso etoxilado C ₁₂ -C ₁₄	12,0	6,0	1,0	1,0	1,0
Ácido graso C ₁₂ -C ₁₈	3,0	-	4,0	2,0	3,0
Ácido cítrico (anhidro)	4,5	5,0	3,0	2,0	1,0
DETPMP	-	-	1,0	1,0	0,5
Monoetanolamina	5,0	5,0	5,0	5,0	2,0
Hidróxido de sodio	-	-	2,5	1,0	1,5
1 N de solución acuosa de HCl	#1	#1	-	-	-
Propanodiol	12,7	14,5	13,1	10.	8,0
Etanol	1,8	2,4	4,7	5,4	1,0
DTPA	0,5	0,4	0,3	0,4	0,5
Pectina liasa	-	-	-	0,005	-
Amilasa	0,001	0,002	-		-

Tabla 11-1: Composiciones detergentes líquidas para la colada					
Compuesto	Formulaciones				
	I	II	III	IV	V
Celulasa	-	-	0,0002		0,0001
Lipasa	0,1	-	0,1	-	0,1
NprE (opcional)	0,05	0,3	-	0,5	0,2
PMN	-	-	0,08	-	-
Proteasa A (opcional)	-	-	-	-	0,1
Aldosa oxidasa	-	-	0,3	-	0,003
ZnCl ₂	0,1	0,05	0,05	0,05	0,02
Formiato de Ca	0,05	0,07	0,05	0,06	0,07
DETBCHD	-	-	0,02	0,01	-
SRP1	0,5	0,5	-	0,3	0,3
Ácido bórico	-	-	-	-	2,4
Xilen sulfonato de sodio	-	-	3,0	-	-
Cumeno sulfonato de sodio	-	-	-	0,3	0,5
DC 3225C	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
2-butil-octanol	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03
Blanqueador 1	0,12	0,10	0,18	0,08	0,10
Resto hasta 100 % perfume/tinte y/o agua					
#1: Añadir 1 N de solución acuosa de HCl para ajustar el pH puro de la fórmula en el intervalo desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 5.					

[0386] El pH de las formulaciones (I)-(II) de la Tabla 11-1 es de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, y el pH de las formulaciones (III)-(V) de la Tabla 11-1 es de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,5.

EJEMPLO 12

5 Composiciones detergentes líquidas para la vajilla a mano

[0387] En este ejemplo, se proporcionan varias formulaciones de detergente líquidas para la vajilla a mano. Las siguientes composiciones detergentes líquidas para la vajilla a mano de la presente invención se proporcionan a continuación. En cada una de las siguientes formulaciones, al menos una variante de proteasa proporcionada en el presente documento se incluye en una concentración de aproximadamente un 0,0001 a aproximadamente 10 por ciento en peso. En otros aspectos alternativos, se pueden utilizar otras concentraciones, tal como lo determina el formulador, en función de sus necesidades.

Tabla 12-1: Composiciones detergentes líquidas para la vajilla a mano						
Compuesto	Formulaciones					
	I	II	III	IV	V	VI.
C ₁₂ -C ₁₅ AE _{1,8} S	30,0	28,0	25,0	-	15,0	10,0
LAS	-	-	-	5,0	15,0	12,0
Sulfonato de parafina	-	-	-	20,0	-	-
Óxido de alquil dimetil amina C ₁₀ -C ₁₈	5,0	3,0	7,0	-	-	-
Betaína	3,0	-	1,0	3,0	1,0	-
poli-OH ácido graso amida C ₁₂	-	-	-	3,0	-	1,0

Tabla 12-1: Composiciones detergentes líquidas para la vajilla a mano						
Compuesto	Formulaciones					
	I	II	III	IV	V	VI.
poli-OH ácido graso amida C ₁₄	-	1,5	-	-	-	-
C ₁₁ E ₉	2,0	-	4,0	-	-	20,0
DTPA	-	-	-	-	0,2	-
Citrato trisódico dihidratado	0,25	-	-	0,7	-	-
Diamina	1,0	5,0	7,0	1,0	5,0	7,0
MgCl ₂	0,25	-	-	1,0	-	-
nprE (opcional)	0,02	0,01	-	0,01	-	0,05
PMN	-	-	0,03	-	0,02	-
Proteasa A (opcional)	-	0,01	-	-	-	-
Amilasa	0,001	-	-	0,002	-	0,001
Aldosa oxidasa	0,03	-	0,02	-	0,05	-
Cumenosulfato de sodio	-	-	-	2,0	1,5	3,0
PAAC	0,01	0,01	0,02	-	-	-
DETBCHD	-	-	-	0,01	0,02	0,01
Resto hasta 100 % perfume/tinte y/o agua						

[0388] El pH de las formulaciones (I)-(VI) de la Tabla 12-1 es desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 11.

EJEMPLO 13

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

[0389] En este ejemplo, se proporcionan varias formulaciones de detergente líquidas para el lavado de la vajilla de forma automática. Las siguientes composiciones detergentes líquidas para la vajilla a mano de la presente invención se proporcionan a continuación. En cada una de las siguientes formulaciones, al menos una variante de proteasa proporcionada en el presente documento se incluye en una concentración de aproximadamente un 10 0,0001 a aproximadamente 10 por ciento en peso. En otros aspectos alternativos, se pueden utilizar otras concentraciones, tal como lo determina el formulador, en función de sus necesidades.

Tabla 13-1: Composiciones detergentes para el lavado de la vajilla de forma automática líquidas					
Compuesto	Formulaciones				
	I	II	III	IV	V
STPP	16	16	18	16	16
Sulfato de potasio	-	10	8	-	10
1,2-propanodiol	6,0	0,5	2,0	6,0	0,5
Ácido bórico	-	-	-	4,0	3,0
CaCl ₂ dihidratado	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
No iónico	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
nprE (opcional)	0,1	0,03	-	0,03	-
PMN	-	-	0,05	-	0,06
Proteasa B (opcional)	-	-	-	0,01	-
Amilasa	0,02	-	0,02	0,02	-

Tabla 13-1: Composiciones detergentes para el lavado de la vajilla de forma automática líquidas					
Compuesto	Formulaciones				
	I	II	III	IV	V
Aldosa oxidasa	-	0,15	0,02	-	0,01
Galactosa oxidasa	-	-	0,01	-	0,01
PAAC	0,01	-	-	0,01	-
DETBCHD	-	0,01	-	-	0,01
Resto hasta 100 % perfume/tinte y/o agua					

EJEMPLO 14**Composiciones para la colada en pastillas y/o granuladas**

- 5 **[0390]** Este ejemplo proporciona varias formulaciones para detergentes para la colada en pastillas y/o granuladas. Las siguientes composiciones para la colada de la presente invención, que pueden estar en forma granulada o de pastilla, se proporcionan a continuación. En cada una de las siguientes formulaciones, al menos una variante de proteasa proporcionada en el presente documento se incluye en una concentración de aproximadamente un 0,0001 a aproximadamente 10 por ciento en peso. En otros aspectos alternativos, se pueden utilizar otras concentraciones, según lo determine el formulador, en función de sus necesidades.

Tabla 14-1: Composiciones para la colada en pastillas y/o granuladas					
Compuesto	Formulaciones				
	I	II	III	IV	V
Producto base					
C ₁₄ -C ₁₅ AS o TAS	8,0	5,0	3,0	3,0	3,0
LAS	8,0	-	8,0	-	7,0
C ₁₂ -C ₁₅ AE ₃ S	0,5	2,0	1,0	-	-
C ₁₂ -C ₁₅ E ₅ o E ₃	2,0	-	5,0	2,0	2,0
QAS	-	-	-	1,0	1,0
Zeolita A	20,0	18,0	11,0	-	10,0
SKS-6 (adición en seco)	-	-	9,0	-	-
MA/AA	2,0	2,0	2,0	-	-
AA	-	-	-	-	4,0
Citrato 3Na · 2H ₂ O	-	2,0	-	-	-
Ácido cítrico (anhidro)	2,0	-	1,5	2,0	-
DTPA	0,2	0,2	-	-	-
EDDS	-	-	0,5	0,1	-
HEDP	-	-	0,2	0,1	-
PB1	3,0	4,8	-	-	4,0
Percarbonato	-	-	3,8	5,2	-
NOBS	1,9	-	-	-	-
NACA OBS	-	-	2,0	-	-
TAED	0,5	2,0	2,0	5,0	1,00
BB1	0,06	-	0,34	-	0,14

Tabla 14-1: Composiciones para la colada en pastillas y/o granuladas					
Compuesto	Formulaciones				
	I	II	III	IV	V
Producto base					
BB2	-	0,14	-	0,20	-
Carbonato de Na anhidro	15,0	18,0	-	15,0	15,0
Sulfato	5,0	12,0	5,0	17,0	3,0
Silicato	-	1,0	-	-	8,0
nprE (opcional)	0,03	-	0,1	0,06	-
PMN	-	0,05	-	-	0,1
Proteasa B (opcional)	-	0,01	-	-	-
Proteasa C (opcional)	-	-	-	0,01	-
Lipasa	-	0,008	-	-	-
Amilasa	0,001	-	-	-	0,001
Celulasa	-	0,0014	-	-	-
Pectina liasa	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Aldosa oxidasa	0,03	-	0,05	-	-
PAAC	-	0,01	-	-	0,05
Resto hasta 100 % humedad y/o trazas*					
* Perfume, tinte, abrillantador / SRP1 / carboximetilcelulosa de Na / fotoblanqueante / MgSO ₄ / PVPVI / supresor de jabonaduras / polietilenglicol (PEG) de alto peso molecular / arcilla.					

EJEMPLO 15**Detergentes para la colada líquidos**

- 5 [0391] Este ejemplo proporciona varias formulaciones para detergentes para la colada líquidos. Las siguientes formulaciones de detergentes para la colada líquidas de la presente invención se muestran a continuación. En cada una de las siguientes formulaciones, al menos una variante de proteasa proporcionada en el presente documento se incluye en una concentración de aproximadamente un 0,0001 a aproximadamente 10 por ciento en peso. En otros aspectos alternativos, se pueden utilizar otras concentraciones, según lo determine el formulador, en función de sus necesidades.

Tabla 15-1: Detergentes para la colada líquidos						
Compuesto	Formulaciones					
	I	II	III	IV	V	VI
LAS	11,5	11,5	9,0	-	4,0	-
C ₁₂ -C ₁₅ AE _{2,85} S	-	-	3,0	18,0	-	16,0
C ₁₄ -C ₁₅ E _{2.5} S	11,5	11,5	3,0	-	16,0	-
C ₁₂ -C ₁₃ E ₉	-	-	3,0	2,0	2,0	1,0
C ₁₂ -C ₁₃ E ₇	3,2	3,2	-	-	-	-
CFAA	-	-	-	5,0	-	3,0
TPKFA	2,0	2,0	-	2,0	0,5	2,0
Ácido cítrico (anhidro)	3,2	3,2	0,5	1,2	2,0	1,2
Formiato de Ca	0,1	0,1	0,06	0,1	-	-

Tabla 15-1: Detergentes para la colada líquidos						
Compuesto	Formulaciones					
	I	II	III	IV	V	VI
Formiato de Na	0,5	0,5	0,06	0,1	0,05	0,05
ZnCl ₂	0,1	0,05	0,06	0,03	0,05	0,05
Cumeno sulfonato de Na	4,0	4,0	1,0	3,0	1,2	-
Borato	0,6	0,6	1,5	-	-	-
Hidróxido de Na	6,0	6,0	2,0	3,5	4,0	3,0
Etanol	2,0	2,0	1,0	4,0	4,0	3,0
1,2-propanodiol	3,0	3,0	2,0	8,0	8,0	5,0
Monoetanolamina	3,0	3,0	1,5	1,0	2,5	1,0
TEPAE	2,0	2,0	-	1,0	1,0	1,0
nprE (opcional)	0,03	0,05	-	0,03	-	0,02
PMN	-	-	0,01	-	0,08	-
Proteasa A (opcional)	-	-	0,01	-	-	-
Lipasa	-	-	-	0,002	-	-
Amilasa	-	-	-	-	0,002	-
Celulasa	-	-	-	-	-	0,0001
Pectina liasa	0,005	0,005	-	-	-	-
Aldosa oxidasa	0,05	-	-	0,05	-	0,02
Galactosa oxidasa	-	0,04	-	-	-	-
PAAC	0,03	0,03	0,02	-	-	-
DETBCHD	-	-	-	0,02	0,01	-
SRP 1	0,2	0,2	-	0,1	-	-
DTPA	-	-	-	0,3	-	-
PVNO	-	-	-	0,3	-	0,2
Blanqueador 1	0,2	0,2	0,07	0,1	-	-
Antiespumante de silicona	0,04	0,04	0,02	0,1	0,1	0,1
Resto hasta 100 % perfume/tinte y/o agua.						

EJEMPLO 16**Detergentes para el lavado de la vajilla de alta densidad**

- [0392] Este ejemplo proporciona varias formulaciones para detergentes de alta densidad para el lavado de la vajilla. Los siguientes detergentes para el lavado de la vajilla de alta densidad compactos de la presente invención se muestran a continuación. En cada una de estas formulaciones, al menos una variante de proteasa proporcionada en el presente documento se incluye en una concentración de aproximadamente un 0,0001 a aproximadamente 10 por ciento en peso. En otros aspectos alternativos, se pueden utilizar otras concentraciones, tal como lo determina el formulador, en función de sus necesidades.

Tabla 16-1: Detergentes para el lavado de la vajilla de alta densidad						
Compuesto	Formulaciones					
	I	II	III	IV	V	VI
STPP	-	45,0	45,0	-	-	40,0

Tabla 16-1: Detergentes para el lavado de la vajilla de alta densidad						
Compuesto	Formulaciones					
	I	II	III	IV	V	VI
3Na Citrato·2H ₂ O	17,0	-	-	50,0	40,2	-
Carbonato de Na	17,5	14,0	20,0	-	8,0	33,6
Bicarbonato	-	-	-	26,0	-	-
Silicato	15,0	15,0	8,0	-	25,0	3,6
Metasilicato	2,5	4,5	4,5	-	-	-
PB1	-	-	4,5	-	-	-
PB4	-	-	-	5,0	-	-
Percarbonato	-	-	-	-	-	4,8
BB1	-	0,1	0,1	-	0,5	-
BB2	0,2	0,05	-	0,1	-	0,6
No iónico	2,0	1,5	1,5	3,0	1,9	5,9
HEDP	1,0	-	-	-	-	-
DETPMP	0,6	-	-	-	-	-
PAAC	0,03	0,05	0,02	-	-	-
Parafina	0,5	0,4	0,4	0,6	-	-
nprE (opcional)	0,072	0,053	-	0,026	-	0,01
PMN	-	-	0,053	-	0,059	-
Proteasa B (opcional)	-	-	-	-	-	0,01
Amilasa	0,012	-	0,012	-	0,021	0,006
Lipasa	-	0,001	-	0,005	-	-
Pectina liasa	0,001	0,001	0,001	-	-	-
Aldosa oxidasa	0,05	0,05	0,03	0,01	0,02	0,01
BTA	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3
Policarboxilato	6,0	-	-	-	4,0	0,9
Perfume	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
Resto hasta 100 % humedad y/o trazas*						
* Abrillantador / tinte / SRP1 / carboximetilcelulosa de Na / fotoblanqueante / MgSO ₄ / PVPVI / supresor de jabonaduras / PEG de alto peso molecular / arcilla.						

[0393] El pH de las formulaciones (I)-(VI) de la Tabla 16-1 es desde aproximadamente 9,6 hasta aproximadamente 11,3.

EJEMPLO 17

5 Composiciones detergentes en pastillas

[0394] Este ejemplo proporciona diversas formulaciones detergentes en pastillas. Las siguientes composiciones detergentes en pastillas de la presente invención se preparan mediante la compresión de una composición detergente para el lavado de la vajilla granulada a una presión de 13 KN/cm² utilizando una prensa estándar rotativa de 12 cabezales. En cada una de las siguientes formulaciones, al menos una variante de proteasa proporcionada en el presente documento se incluye en una concentración de aproximadamente un 0,0001 a aproximadamente 10 por ciento en peso. En otros aspectos alternativos, se pueden utilizar otras concentraciones, tal como lo determina el formulador, en función de sus necesidades.

Tabla 17-1: Composiciones detergentes en pastillas								
Compuesto	Formulaciones							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
STPP	-	48,8	44,7	38,2	-	42,4	46,1	46,0
3Na Citrato·2H ₂ O	20,0	-	-	-	35,9	-	-	-
Carbonato de Na	20,0	5,0	14,0	15,4	8,0	23,0	20,0	-
Silicato	15,0	14,8	15,0	12,6	23,4	2,9	4,3	4,2
Lipasa	0,001	-	0,01	-	0,02	-	-	-
Proteasa B (opcional)	0,01	-	-	-	-	-	-	-
Proteasa C (opcional)	-	-	-	-	-	0,01	-	-
nprE (opcional)	0,01	0,08	-	0,04	-	0,023	-	0,05
PMN	-	-	0,05	-	0,052	-	0,023	-
Amilasa	0,012	0,012	0,012	-	0,015	-	0,017	0,002
Pectina liasa	0,005	-	-	0,002	-	-	-	-
Aldosa oxidasa	-	0,03	-	0,02	0,02	-	0,03	-
PB1	-	-	3,8	-	7,8	-	-	4,5
Percarbonato	6,0	-	-	6,0	-	5,0	-	-
BB1	0,2	-	0,5	-	0,3	0,2	-	-
BB2	-	0,2	-	0,5	-	-	0,1	0,2
No iónico	1,5	2,0	2,0	2,2	1,0	4,2	4,0	6,5
PAAC	0,01	0,01	0,02	-	-	-	-	-
DETBCHD	-	-	-	0,02	0,02	-	-	-
TAED	-	-	-	-	-	2,1	-	1,6
HEDP	1,0	-	-	0,9	-	0,4	0,2	-
DETPMP	0,7	-	-	-	-	-	-	-
Parafina	0,4	0,5	0,5	0,5	-	-	0,5	-
BTA	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	-
Policarboxilato	4,0	-	-	-	4,9	0,6	0,8	-
PEG 400-30 000	-	-	-	-	-	2,0	-	2,0
Glicerol	-	-	-	-	-	0,4	-	0,5
Perfume	-	-	-	0,05	0,2	0,2	0,2	0,2
Resto hasta 100 % humedad y/o trazas*								
* Abrillantador / SRP1 / carboximetilcelulosa de Na / fotoblanqueante / MgSO ₄ / PVPVI / supresor de jabonaduras / PEG de alto peso molecular / arcilla.								

[0395] El pH de las formulaciones (I) a (VII) de la Tabla 17-1 es de aproximadamente 10 a aproximadamente 11,5, y el pH de las formulación (VIII) de la Tabla 19-1 es de aproximadamente 8-10. El peso por pastilla de las formulaciones (I) a (VIII) de la Tabla 17-1 es desde aproximadamente 20 gramos hasta aproximadamente 30 gramos.

EJEMPLO 18**Detergentes líquidos para la limpieza de superficies duras**

5 [0396] Este ejemplo proporciona varias formulaciones para detergentes líquidos para la limpieza de superficies duras. Las siguientes composiciones detergentes líquidas para la limpieza de superficies duras de la presente invención se muestran a continuación. En cada una de estas formulaciones, al menos una variante de proteasa proporcionada en el presente documento se incluye en una concentración de aproximadamente un 0,0001 a aproximadamente 10 por ciento en peso. En algunos aspectos alternativos, se pueden utilizar otras concentraciones, tal como lo determina el formulador, en función de sus necesidades.

Tabla 18-1: Detergentes líquidos para la limpieza de superficies duras							
Compuesto	Formulaciones						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
C ₉ -C ₁₁ E ₅	2,4	1,9	2,5	2,5	2,5	2,4	2,5
C ₁₂ -C ₁₄ E ₅	3,6	2,9	2,5	2,5	2,5	3,6	2,5
C ₇ -C ₉ E ₆	-	-	-	-	8,0	-	-
C ₁₂ -C ₁₄ E ₂₁	1,0	0,8	4,0	2,0	2,0	1,0	2,0
LAS	-	-	-	0,8	0,8	-	0,8
Cumeno sulfonato de sodio	1,5	2,6	-	1,5	1,5	1,5	1,5
Isachem® AS	0,6	0,6	-	-	-	0,6	-
Na ₂ CO ₃	0,6	0,13	0,6	0,1	0,2	0,6	0,2
3Na Citrato·2H ₂ O	0,5	0,56	0,5	0,6	0,75	0,5	0,75
NaOH	0,3	0,33	0,3	0,3	0,5	0,3	0,5
Ácido graso	0,6	0,13	0,6	0,1	0,4	0,6	0,4
2-butil octanol	0,3	0,3	-	0,3	0,3	0,3	0,3
PVP DME-2000 ®	0,4	-	0,3	0,35	0,5	-	-
PVP	0,3	0,4	0,6	0,3	0,5	-	-
MME PEG (2000)	-	-	-	-	-	0,5	0,5
Jeffamine® ED-2001	-	0,4	-	-	0,5	-	-
PAAC	-	-	-	0,03	0,03	0,03	-
DETBCHD	0,03	0,05	0,05	-	-	-	-
nprE (opcional)	0,07	-	0,08	0,03	-	0,01	0,04
PMN	-	0,05	-	-	0,06	-	-
Proteasa B (opcional)	-	-	-	-	-	0,01	-
Amilasa	0,12	0,01	0,01	-	0,02	-	0,01
Lipasa	-	0,001	-	0,005	-	0,005	-
Pectina liasa	0,001	-	0,001	-	-	-	0,002
ZnCl ₂	0,02	0,01	0,03	0,05	0,1	0,05	0,02
Formiato cálcico	0,03	0,03	0,01	-	-	-	-
PB1	-	4,6	-	3,8	-	-	-
Aldosa oxidasa	0,05	-	0,03	-	0,02	0,02	0,05
Resto hasta 100 % perfume/tinte y/o agua							

El pH de las formulaciones (I) a (VII) en la Tabla 18-1 es desde aproximadamente 7,4 hasta aproximadamente 9,5.

EJEMPLO 19

Rendimiento de limpieza de variantes del polipéptido BPN'-v36

5 **[0397]** Las variantes del polipéptido BPN'-v36 que comprenden dos sustituciones de aminoácidos se construyeron por fusión de PCR estándar utilizando la variante de BPN'-v36 como una secuencia esqueleto u original. Para este fin, se amplificaron dos o tres fragmentos que se solapan parcialmente mediante cebadores mutagénicos preparados de tal manera que el cebador codificó una sustitución deseada. Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron tal como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 7. Se construyeron las
10 siguientes variantes mutantes dobles de BPN'-v36 (es decir, BPN'-v36 con las siguientes dos sustituciones de aminoácidos): Q019R-N025D, A001Y-Q275R, V004A-S249N, V004E-S260P, V004A-T55A, Y006F-S249C, Y006D-T55A, V008L-Q275R, Q010R-Q275K, L016Q-Q217H, H017R-T158A, S183D-Q206R, P210S-N212D, S018Y-V203A, S018K-V203I, Y021H-D259G, Y021H-D259R, K027R-N269D, K027R-N269T, S037P-S260F, S037T-S260P, D041E-N077D, D041G-N077E, G166V-S183T, N252S-L257H, V044A-Q206H, V044A-Q206K, V044A-Q206R, N076T-N212D, N076P-N212S, N077D-N252D, N077D-N252T, K141I-S248N, T158I-D259N, T158A-D259P, S161E-Q185H, K237M-H238R, G160A-D259G, G160R-D259V, G215R-D259R, G215D-D259V, N061D-Q206R, N061L-Q206H, S009L-N218S, S161E-S260T, Q019A-N109S, T022S-G166V, Y021H-N252H, P129S-K136R, T022S-T242S, N025K-H238R, N025D-Q185R, S037G-Q275H, K043R-N076S, K043N-Q217R, K043N-S163T, T055A-V147A, N061K-N252K, N062Y-G097D, Y021H-V084E, Y021H-S037E, N062Y-T244A, K027E-Y091F, A074S-P129Q, S249R-Q275R, I079V-Q217H, A098T-T158A, K027R-D120H, Q019R-Q185R, G131S-K265N, A133V-D259N, A144H-T244A, I035V-K043N, G160R-T244A, S161P-T253A, S163T-Q245L, K170R-D259G, S183T-S249R, N184Y-Y262N, V198L-D259G, A200T-H226L, Q206R-S260P, G211V-T244A, Q217R-T244A, L75I-N76D, S260P-Q275L, S260P-Q275R, Y262N-Q275R, V004A-Y006F, H017L-Q019A, N025D-V026A, N118G-V121A, V072F-L075I, S183T-R186K, V203A-Q217R, y S249R-Y262H. El rendimiento de
25 limpieza de cada una de estas variantes se evaluó en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a 16 °C y pH 8 y un ensayo de limpieza de micromuestras de huevo en la Composición detergente 4 a 16 °C y pH 8 tal como se ha descrito en el Ejemplo 1. Los resultados se proporcionan a continuación.

30 **[0398]** Se determinó que las siguientes variantes de proteasa BPN' tenían un valor de PI igual o mayor que 0,9 e igual o menor que 1,0 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a 16 °C y pH 8: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en S183T-S249R, N61D-Q206R, Y262N-Q275R, K43R-N76S, K170R-D259G, Y6F-S249C, Q19A-N109S, H17L-Q19A, Q19R-Q185R, S18Y-V203A, S161E-S260T, S18K-V203I, V4A-T55A, N252S-L257H, S249R-Y262H, N61L-Q206H, N184Y-Y262N, Q19R-N25D, A74S-P129Q, K27R-D120H, Y21H-N252H, K27R-N269D, A98T-T158A, I79V-Q217H, S9L-N218S, V4A-Y6F, S161P-T253A, V203A-Q217R, T22S-T242S, N76P-N212S, S37T-S260P, T55A-V147A, G160R-T244A, N25D-Q185R, G211V-T244A, A144H-T244A, Y21H-N252H, A1Y-Q275R, V198L-D259G, K141I-S248N, S183T-R186K, S161E-Q185H, P129S-K136R, K43N-S163T, S37G-Q275H, N62Y-T244A, y S260P-Q275R, donde las posiciones de aminoácidos de la variante
35 están numeradas por correspondencia con la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN' (SEQ ID NO:2) y un valor de PI mayor que el de la BPN' en este ensayo.

45 **[0399]** Se determinó que las siguientes variantes de subtilisina proteasa BPN' tenían un valor de PI igual o mayor que 0,5 y menor que 0,9 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 1 a 16 °C y pH 8: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Y21H-D259G, A133V-D259N, I79V-Q217H, S18K-V203I, T158A-D259P, N61K-N252K, K43N-Q217R, T158A-D259P, Q206R-S260P, A133V-D259N, V198L-D259G, N61K-N252K, S161E-S260T, G160A-D259G, K43N-Q217R, A1Y-Q275R, A200T-H226L, Q217R-T244A, S260P-Q275R, Q206R-S260P, T158I-D259N, Q217R-T244A, L75I-N76D, S161E-Q185H, Y21H-S37E, N109G-A114S-A128S, S249R-Q275R, T158I-D259N, Y21H-S37E, N76T-N212D, S260P-Q275L, G131S-K265N, V4A-S249N, N25D-Q185R, K43R-N76S, S183D-Q206R, Q10R-Q275K, K43N-S163T, Q10R-Q275K, N25D-V26A, G131S-K265N, S260P-Q275L, K141I-S248N, L16Q-Q217H, S249R-Q275R, K27R-N269T, P210S-N212D, L75I-N76D, S183D-Q206R, N118G-V121A, G215D-D259V, N76T-N212D, K27R-N269T, N62Y-G97D, V4E-S260P, G215D-D259V, K27E-Y91F, Y6D-T55A, N77D-N252T, V4E-S260P, Y6D-T55A, N25K-H238R, V44A-Q206H, L16Q-Q217H, V44A-Q206R, V44A-Q206H, y S37P-S260F, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están
50 numeradas por correspondencia con la SEQ ID NO:2.

60 **[0400]** Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de más de 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de más de 1,0 a aproximadamente 10, de más de 1,0 a aproximadamente 8, o de más de 1,0 a aproximadamente 5 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de huevo en la Composición detergente 4 a 16 °C y pH 8: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-

G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Y21H-D259G, S183T-S249R, N61D-Q206R, Y262N-Q275R, K043R-N076S, A133V-D259N, y I079V-Q217H, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN', BPN'-v3, y BPN'-v36, y un valor de PI mayor que el de la BPN', BPN'-v3, y BPN'-v36 en este ensayo.

[0401] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI igual o mayor que 0,5 y menor o igual que 1,0 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de huevo en la Composición detergente 4 a 16 °C y pH 8: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en K170R-D259G, S18K-V203I, Y6F-S249C, Q19A-N109S, H17L-Q19A, Q19R-Q185R, S18Y-V203A, N61D-Q206R, S161E-S260T, S18K-V203I, V4A-T55A, N252S-L257H, S249R-Y262H, N61L-Q206H, N184Y-Y262N, Q19R-N25D, S249R-Y262H, A74S-P129Q, T158A-D259P, H17L-Q19A, K27R-D120H, V4A-T55A, N61K-N252K, Y21H-N252H, K27R-N269D, K43N-Q217R, T158A-D259P, Q206R-S260P, K27R-N269D, A98T-T158A, I79V-Q217H, S9L-N218S, V4A-Y6F, S161P-T253A, V203A-Q217R, T22S-T242S, N76P-N212S, A133V-D259N, S37T-S260P, T55A-V147A, V198L-D259G, Q19R-Q185R, V4A-Y6F, Q19A-N109S, Y262N-Q275R, G160R-T244A, Q19R-N25D, N25D-Q185R, N61K-N252K, S161E-S260T, A98T-T158A, N61L-Q206H, G211V-T244A, S9L-N218S, A144H-T244A, A144H-T244A, S18Y-V203A, Y21H-N252H, A74S-P129Q, G160A-D259G, K43N-Q217R, A1Y-Q275R, A1Y-Q275R, A200T-H226L, Q217R-T244A, S260P-Q275R, Q206R-S260P, K141I-S248N, S183T-R186K, T158I-D259N, S37T-S260P, K27R-D120H, T22S-T242S, Q217R-T244A, S161E-Q185H, P129S-K136R, G211V-T244A, N76P-N212S, L75I-N76D, S161E-Q185H, Y21H-S37E, S249R-Q275R, G160A-D259G, K43N-S163T, T158I-D259N, Y21H-S37E, S37G-Q275H, S161P-T253A, N76T-N212D, S260P-Q275L, Y6F-S249C, N184Y-Y262N, G131S-K265N, V4AS249N, N25D-Q185R, N252S-L257H, K43R-N76S, S183D-Q206R, G160R-T244A, Q10R-Q275K, S37G-Q275H, K43N-S163T, Q10R-Q275K, N25D-V26A, P129S-K136R, G131S-K265N, S260P-Q275L, K141I-S248N, T22S-G166V, N62Y-T244A, L16Q-Q217H, S249R-Q275R, S260P-Q275R, K27R-N269T, P210S-N212D, L75I-N76D, S183D-Q206R, N118G-V121A, G215D-D259V, N76T-N212D, V4A-S249N, K27R-N269T, G166V-S183T, N62Y-G97D, V4E-S260P, G215D-D259V, K27E-Y91F, Y21H-D259R, Y6D-T55A, N77D-N252T, V4E-S260P, Y6D-T55A, N77D-N252T, Y21H-D259R, N25K-H238R, N77D-N252D, V44A-Q206H, L16Q-Q217H, V72F-L75I, S37P-S260F, V72F-L75I, N77D-N252D, V44A-Q206R, S163T-Q245L, V44A-Q206H, V44A-Q206R, S37P-S260F, G215R-D259R, V44A-Q206K, y V44A-Q206K, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

EJEMPLO 20

Rendimiento de limpieza de variantes del polipéptido BPN'-v36 adicionales

[0402] Las siguientes variantes de BPN'-v36 se sintetizaron en DNA 2.0 (Menlo Park, California) utilizando el plásmido pHPLT-BPN'-v36 que contenía el casete de expresión de BPN' que sirvió como molde de ADN (plásmido original) para la clonación: N109G-A128S-S224A, N109G-A128S-S224A-N243V, A88T-N109G-A116T-A128S-S224A-N243V, N61G-N109G-A128S-S224A, N61G-N109G-A128S-S224A-N243V, N61G-A88T-N109G-A116T-A128S-S224A-N243V, N109Q-A128S-S224A, N109Q-A128S-S224A-N243V, A88T-N109Q-A116T-A128S-S224A-N243V, N109S-A128S-S224A, N109S-A128S-S224A-N243V, A88T-N109S-A116T-A128S-S224A-N243V, N109M-A128S-S224A, N109M-A128S-S224A-N243V, A88T-N109M-A116T-A128S-S224A-N243V, N109G-A114S-A128S, N109G-A114S-A128S-N243V, A88T-N109G-A114S-A116T-A128S-N243V, N109G-A114S-A128S-S224A, N109G-A114S-A128S-S224A-N243V, N109G-A128S-S183V, N109G-A128S-S183L, N109G-A128S-S183L-S224A, N109G-A114S-A128S-S183L-S224A, A88T-N109G-A114S-A116T-A128S-S183L-S224A-N243V, N76D-N109G-A128S-S224A, N101Q-N109Q-A128S-S224A-N243V, N101Q-N109Q-A128S-P129S-S130T-S224A-N243V, N109G-A128S-P129S-S130T-S224A-N243V, S33T-A128S-N218S, S33T-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-N61G-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-N109G-A128S-G169A-N218S-N243V, S33T-S63G-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-N76D-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-S63G-N109G-A128S-G169A-N218S-N243V, I31L-S33T-S63G-N109G-A128S-G169A-N218S-N243V, S33T-N61G-S63G-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-N61G-A88T-N109G-A116T-A128S-N218S-N243V, S33T-N61G-S63G-N109G-A128S-G131H-G169A-N218S-N243V, S33T-N61P-S63G-N109G-A128S-G131H-G169A-N218S-N243V, S33T-N109G-A128S-N218S-S224A-N243V, S63G-N109Q-A128S-S224A-N243V, S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, N61P-S63G-N109Q-A128S-S224A-N243V, N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, A1G-N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, I31L-N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V-S249Q, S33T-T55P-N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, S33T-T55P-N61P-S63G-A88T-N109G-A116T-A128S-G131H-S224A-N243V, S33T-T55P-N61P-S63G-A88T-N109G-A116T-A128S-G131H-S224A-N243V-S249Q, A1G-I31L-S33T-T55P-N61P-S63G-A88T-N109G-A116T-A128S-G131H-S224A-N243V-S249Q, N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-G169A-S224A-N243V-S249Q, y A1G-I31L-S33T-T55P-N61P-S63G-A88T-N109G-A116T-A128S-G131H-G169A-S224A-N243V-S249Q.

[0403] Las variantes se cultivaron para la expresión de proteínas tal como se ha descrito en el Ejemplo 11. Se evaluó el rendimiento de estas variantes en el ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a 16 °C y pH 8, el ensayo de limpieza de micromuestras de huevo en la Composición detergente 4 a 16 °C y pH 8, y el ensayo AAPF tal como se ha descrito en el Ejemplo 1. Los resultados se proporcionan a continuación.

[0404] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de más de 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de más de 1,0 a aproximadamente 10, de más de 1,0 a aproximadamente 8, o de más de 1,0 a aproximadamente 5 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en N61P-S63G-N109Q-A128S-S224A-N243V, A88T-N109G-A114S-A116T-A128S-N243V, A88T-N109G-A114S-A116T-A128S-S183L-S224A-N243V, N109G-A128S-S183V, N109G-A128S-N243V-K256R, N109M-A128S-S224A, A88T-N109S-A116T-A128S-S224A-N243V, N109Q-A128S-S224A-N243V, A88T-N109M-A116T-A128S-S224A-N243V, N109S-A128S-S224A-N243V, A88T-N109G-A116T-N243V, N101Q-N109Q-A128S-S224A-N243V, N109G-A116T-N243V-K256R, N109G-A128S-P129S-S130T-S224A-N243V, y A88T-N109Q-A116T-A128S-S224A-N243V, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con posiciones de la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN', BPN'-v3, y BPN'-v36, y un valor de PI mayor que el de la BPN', BPN'-v3, y BPN'-v36 en este ensayo.

[0405] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI igual o mayor que 0,9 e igual o menor que 1,0 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a 16 °C y pH 8: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en G24S-G53S-N78S-G97A-N101S-A128S, G24S-G53S-N78S-G97A-N101S, S33T-T55P-N61P-S63G-A88T-N109G-A116T-A128S-G131H-S224A-N243V, S33T-N61G-S63G-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-S63G-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-T55P-N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-G169A-S224A-N243V-S249Q, S33T-N61G-A88T-N109G-A116T-A128S-N218S-N243V, S33T-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-N76D-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-N76D-N109G-A128S-N218S-N243V-S248N-K256R, S33T-N61G-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-A128S-N218S, A1G-N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V-S249Q, N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, N109G-A114S-A128S, N109G-A114S-A128S-S183L-S224A, N109G-A114S-A128S-S224A, N109G-A114S-A128S-S224A-N243V, A88T-N109G-A116T-A128S-S224A-N243V, N61G-A88T-N109G-A116T-A128S-S224A-N243V, N109G-A114S-A128S-N243V, N109G-A128S-S224A-N243V, N109G-A128S-S224A, N109G-A128S-S183L-S224A, N61G-N109G-A128S-S224A, N109G-A128S-S183L, S33T-N76D, N109S-A128S-S224A, N101Q-N109Q-A128S-P129S-S130T-S224A-N243V, S63G-N109Q-A128S-S224A-N243V, N109M-A128S-S224A-N243V, S63G-N109G, N109G-K256R, S63G-N76D, S33T-N109G-A128S-G169A-N218S-N243V, y S33T-N109G-A128S-N218S-S224A-N243V, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la SEQ ID NO:2.

[0406] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI igual o mayor que 0,5 y menor que 0,9 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a 16 °C y pH 8: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en I31L-S33T-S63G-N109G-A128S-G169A-N218S-N243V, A1G-I31L-S33T-T55P-N61P-S63G-A88T-N109G-A116T-A128S-G131H-G169A-S224A-N243V-S249Q, S33T-N61G-S63G-N109G-A128S-G131H-G169A-N218S-N243V, S33T-S63G-N109G-A128S-G169A-N218S-N243V, S33T-T55P-N61P-S63G-A88T-N109G-A116T-A128S-G131H-S224A-N243V-S249Q, S33T-N76D-A128S-N218S, N76D-N109G-A128S-S224A, y S33T-N61P-S63G-N109G-A128S-G131H-G169A-N218S-N243V, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la SEQ ID NO:2. Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de más de 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de más de 1,0 a aproximadamente 10, de más de 1,0 a aproximadamente 8, o de más de 1,0 a aproximadamente 5 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de huevo en la Composición detergente 4 a 16 °C y pH 8: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en S33T-T55P-N61P-S63G-A88T-N109G-A116T-A128S-G131H-S224A-N243V, S33T-N61G-S63G-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-S63G-N109G-A128S-N218S-N243V, N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-G169A-S224A-N243V-S249Q, S33T-N61G-A88T-N109G-A116T-A128S-N218S-N243V, S33T-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-A128S-N218S, A1G-N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V-S249Q, S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, N61P-S63G-N109Q-A128S-S224A-N243V, A88T-N109G-A114S-A116T-A128S-N243V, A88T-N109G-A114S-A116T-A128S-S183L-S224A-N243V, N109G-A114S-A128S, N109G-A114S-A128S-S183L-S224A, N109G-A114S-A128S-S224A, N109G-A114S-A128S-

S224A-N243V, A88T-N109G-A116T-A128S-S224A-N243V, N61G-A88T-N109G-A116T-A128S-S224A-N243V, N109G-A128S-S183V, N109G-A114S-A128S-N243V, N109G-A128S-N243V-S248A, N109G-A128S-S224A-N243V, N109G-A128S-N243V-K256R, N109G-A128S-S224A, N109G-A128S-S183L-S224A, N61G-N109G-A128S-S224A, N109M-A128S-S224A, A88T-N109S-A116T-A128S-S224A-N243V, N109M-A128S-S224A-N243V, S63G-A128S, A88T-N109G-A116T-N243V, N101Q-N109Q-A128S-S224A-N243V, N109G-A116T-N243V-K256R, N109G-A116T, S63G-N109G, A88T-N109G, N109G-K256R, N61G-N109G-N243V, S33T-N109G-A128S-G169A-N218S-N243V, S33T-N109G-A128S-N218S-S224A-N243V, N109G-A128S-P129S-S130T-S224A-N243V, y A88T-N109Q-A116T-A128S-S224A-N243V, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN', BPN'-v3, y BPN'-v36, y un valor de PI mayor que el de la BPN', BPN'-v3, y BPN'-v36 en este ensayo.

[0407] Se determinó que la siguiente variante de BPN'-v36 tenía un valor de PI igual o mayor que 0,5 e igual o menor que 1,0 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo de limpieza de micromuestras de BMI y huevo en la Composición detergente 4 a 16 °C y pH 8: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las sustituciones S33T-N76D-A128S-N218S, N76D-N109G-A128S-S224A y S063G-N76D, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

[0408] Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI de más de 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de más de 1,0 a aproximadamente 10, de más de 1,0 a aproximadamente 8, o de más de 1,0 a aproximadamente 5 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo proteolítico AAPF: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en G24S-G53S-N78S-G97A-N101S-A128S, I31L-S33T-S63G-N109G-A128S-G169A-N218S-N243V, A1G-I31L-S33T-T55P-N61P-S63G-A88T-N109G-A116T-A128S-G131H-G169A-S224A-N243V-S249Q, S33T-N61G-S63G-N109G-A128S-G131H-G169A-N218S-N243V, S33T-S63G-N109G-A128S-G169A-N218S-N243V, S33T-T55P-N61P-S63G-A88T-N109G-A116T-A128S-G131H-S224A-N243V, S33T-T55P-N61P-S63G-A88T-N109G-A116TA128S-G131H-S224A-N243V-S249Q, S33T-N61G-S63G-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-S63G-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-T55P-N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-G169A-S224A-N243V-S249Q, S33T-N61G-A88T-N109G-A116TA128S-N218S-N243V, S33T-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-N76D-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-N76D-N109G-A128S-N218S-N243V-S248N-K256R, S33T-N61G-N109G-A128S-N218S-N243V, S33T-N76D-A128S-N218S, S33T-A128S-N218S, A1G-N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V-S249Q, N61P-S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, S63G-N109Q-A128S-G131H-S224A-N243V, N61P-S63G-N109Q-A128S-S224A-N243V, A88T-N109G-A114S-A128S-N243V, A88T-N109G-A114S-A128S-S183L-S224A-N243V, N109G-A114S-A128S, N109G-A114S-A128S-S183L-S224A, N109G-A114S-A128S-S224A, N109G-A114S-A128S-S224A-N243V, A88T-N109G-A116T-A128S-S224A-N243V, N61G-A88T-N109G-A116T-A128S-S224A-N243V, N109G-A128S-S183V, N109G-A114S-A128S-N243V, N109G-A128S-N243V-S248A, N109G-A128S-S224A-N243V, N109G-A128S-N243V-K256R, N109G-A128S-S224A, N109G-A128S-S183L-S224A, N61G-N109G-A128S-S224A, N76D-N109G-A128S-S224A, N109M-A128S-S224A, N109G-A128S-S183L, S33T-N76D, A88T-N109S-A116T-A128S-S224A-N243V, N109Q-A128S-S224A-N243V, N109S-A128S-S224A, A88T-N109M-A116T-A128S-S224A-N243V, N101Q-N109Q-A128S-P129S-S130T-S224A-N243V, S63G-N109Q-A128S-S224A-N243V, N109M-A128S-S224A-N243V, S63G-A128S, N109S-A128S-S224A-N243V, A88T-N109G-A116T-N243V, N61S-N109G-N243V, N101Q-N109Q-A128S-S224A-N243V, N109G-A116T-N243V-K256R, A88T-N109G-A116T-T158S-N243V-K256R, N109G-A116T, S63G-N109G, A88T-N109G, N109G-K256R, N61G-N109G-N243V, S33T-N61P-S63G-N109G-A128S-G131H-G169A-N218S-N243V, S33T-N109G-A128S-G169A-N218S-N243V, S33T-N109G-A128S-N218S-S224A-N243V, N109G-A128S-P129S-S130T-S224A-N243V, y A88T-N109Q-A116T-A128S-S224A-N243V, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2. Tales variantes tienen una actividad proteolítica potenciada en comparación con la BPN', BPN'-v3, y BPN'-v36, y un valor de PI mayor que el de la BPN', BPN'-v3, y BPN'-v36 en este ensayo.

[0409] Se determinó que la siguiente variante de BPN'-v36 tenía un valor de PI igual o mayor que 0,5 e igual o menor que 1,0 relativo a la BPN'-v36 en un ensayo proteolítico AAPF: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende las sustituciones de aminoácidos G24S-G53S-N78S-G97A-N101S o S063G-N76D, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

EJEMPLO 21

Rendimiento de limpieza de las variantes de polipéptidos del polipéptido BPN'-v36 de las bibliotecas combinatorias basadas en el polipéptido BPN'-v36

- 5 **[0410]** Se sintetizaron dos bibliotecas combinatorias separadas (AJ1 y AJ2) mediante DNA2.0 (Menlo Park, California) y se proporcionaron como reacciones de ligamiento individuales. El plásmido pHPLT-BPN'-v36 (Figura 4) que contiene el casete de expresión de BPN' sirvió como molde de ADN (plásmido original) para la construcción de la biblioteca. En la tabla 21-1 se muestra una lista de posibles sustituciones y posiciones de aminoácidos para cada biblioteca. Las reacciones de ligamiento para cada biblioteca se utilizaron para transformar *B. subtilis*, y las variantes de la biblioteca se cultivaron para la expresión de proteínas tal como se describió en el Ejemplo 11. Se analizó el rendimiento de las variantes en el ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a 16 °C y pH 8 tal como se ha descrito en el Ejemplo 1.

Tabla 21-1: Posibles sustituciones para las bibliotecas combinatorias AJ1 y AJ2			
AJ1		AJ2	
Posición	Posibles sustituciones	Posición	Posibles sustituciones
S33	G, S	E54	E,Q
D60	D,G	D99	D,N
N62	N,L,S	D120	D,N
S63	S,R,L,N,G	D140	D,N
S125	S,A	E156	E,Q
Q217	Q,R,E,L,G	D197	D,N
M222	M,L,S	K12	K,T
		K27	K,S
		K43	K,T
		K141	K,Y
		K213	K,Q
		K237	K,A
		K256	K,Q

- 10 **[0411]** Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI igual o mayor que 0,5 y menor o igual que 1,0 relativo a la BPN'-v36 en el ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a 16 °C y pH 8: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en G024S-G053S-N078S-G097A-N101S (es decir, BPN'-v3), G024S-G053S-N078S-G097A-N101S-A128S (es decir, BPN'-v12), N062L, N062L-S063G, N062S, N062S-S063G-Q217L, N062S-S063L-Q217L, N062S-S063N, N062S-S063R, Q217E, S063G, S063G-Q217L, S063G-Q217L-M222S, S063L-Q217L, S063N, S063N-Q217L, D099N-K141Y-K213Q, D099N-K141Y-K256Q, K043T, K043T-K141Y-E156Q, N062L-Q217E, N062L-S063G-Q217E, N062L-S063L, N062L-S063N-Q217L, N062S-Q217L, N062S-S063G, N062S-S063L, N062S-S063N-Q217L, N062S-S063R-Q217E, Q217L, S063G-Q217E, S063N-Q217E, S063R, S063R-Q217E, S063R-Q217L), D099N-K141Y-K213Q, D099N-K141Y-K256Q, K043T, K043T-K141Y-E156Q, N062L-Q217E, N062L-Q217L, N062L-S063G-Q217E, N062L-S063L, N062S-Q217L, N062S-S063G, N062S-S063L, N062S-S063N-Q217L, Q217L, S063G-Q217E, S063N-Q217E, S063R, S063R-Q217E, y S063R-Q217L, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la SEQ ID NO:2. Nótese que una variante de proteasa que sea la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende las sustituciones de aminoácidos G024S-G053S-N078S-G097A-N101S es la BPN'-v3 (SEQ ID NO:4), ya que la G en la posición 24, la G en la posición 53, la N en la posición 78, y la N en la posición 101 de la SEQ ID NO:6 han sido sustituidas con S en cada una de las posiciones 24, 53, 78 y 101 de la SEQ ID NO:6. Además, la G en la posición 97 de la SEQ ID NO:6 ha sido sustituida por A. Por lo tanto, la secuencia resultante es la SEQ ID NO:4.
- 30 **[0412]** Se determinó que las siguientes variantes de BPN'-v36 tenían un valor de PI igual o mayor que 0,5 y menor que 0,9 relativo a la BPN'-v36 en el ensayo de limpieza de micromuestras de BMI en la Composición detergente 4 a pH 8 y a 16 °C: la secuencia de aminoácidos BPN'-S024G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q (SEQ ID NO:6) que comprende al menos un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en D099N, K141Y-E156Q, N062L-S063L-Q217L, N062L-S063N, N062L-S063N-Q217E, N062L-S063R, N062L-S063R-Q217L, N062S-Q217L, N062S-S063G-Q217E, N062S-S063G-Q217R, N062S-S063N-Q217L, N062S-S063R-Q217E, D060G-Q217L, D120N-K141Y-K213Q, K043T-D099N-D120N-K141Y, K043T-D099N-K141Y-K256Q, K043T-K237A, N062L-S063G-Q217R, N062L-S063G-S125A, N062L-S063L-Q217E, N062L-

S063N-S125A-Q217L, N062S-Q217R, N062S-S063L-Q217E, N062S-S063R-Q217L, S063G-M222S, S063G-Q217R, D120N-E156Q-K256Q, K141Y-D197N, N062L-Q217R, N062L-S063G-Q217L-M222S, N062L-S063L-Q217R, N062L-S063N-Q217R, N062S-Q217G, N062S-S063G-Q217G, N062S-S063G-Q217L-M222L, N062S-S063G-S125A-Q217L, N062S-S063N-Q217E, Q217G, S033G-N062S-S063G, S063G-Q217G, S063G-Q217L-M222L, S063G-S125A-Q217R, S063L-Q217R, S063N-M222S, S063N-Q217R, S063N-S125A-Q217L, S063R-Q217R, S063R-S125A-Q217L, D099N-E156Q-K256Q, E156Q, K012T-D099N-K213Q, K012T-K256Q, K043T-D099N-K141Y-K213Q, K043T-E156Q, K141Y-K213Q, N062L-Q217G, N062L-Q217L-M222L, N062L-Q217L-M222S, N062L-S063G-M222S, N062L-S063G-Q217L-M222L, N062L-S063G-Q217R-M222S, N062L-S063N-Q217L-M222S, N062L-S063N-S125A, N062L-S063R-S125A, N062L-S125A, N062S-S063G-M222S, N062S-S063G-Q217G-M222S, N062S-S063G-S125A, N062S-S063N-Q217L-M222L, N062S-S063N-S125A-Q217L, N062S-S063R-Q217G, N062S-S063R-Q217L-M222S, Q217G-M222S, Q217L-M222S, Q217R, S033G-S063G-Q217R, S063G-Q217E-M222S, S063G-S125A-Q217G, S063L-Q217E, S063N-Q217G, S063N-Q217G-M222S, S063N-Q217L-M222S, S063R-Q217L-M222S, y S063R-S125A, donde las posiciones de aminoácidos de la variante están numeradas por correspondencia con la secuencia de la SEQ ID NO:2.

15

REIVINDICACIONES

1. Variante de proteasa aislada, comprendiendo la variante una secuencia de aminoácidos presentando al menos un 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 y comprendiendo el conjunto de sustitución S101N-G128A-Y217Q, donde la variante presenta una actividad proteolítica potenciada y/o una actividad de limpieza en comparación con la actividad proteolítica y/o la actividad de limpieza de la proteasa BPN' presentando la secuencia de la SEQ ID NO:2, y cada posición de aminoácido de la variante está numerada por correspondencia con una posición de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 tal como está determinada por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la variante con la SEQ ID NO:2.
2. Variante según la reivindicación 1, donde la secuencia de aminoácidos variante comprende además la sustitución de aminoácidos X097A.
3. Variante según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la secuencia de aminoácidos variante tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:6.
4. Variante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la variante presenta una actividad proteolítica potenciada en comparación con la actividad proteolítica de la proteasa presentando la secuencia de la SEQ ID NO:4 o la SEQ ID NO:6.
5. Variante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 comprendiendo un conjunto de sustituciones seleccionado de:
 - S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
 - N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q;
 - S024G-N025G-S053G-N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q;
 - S024G-N025G-N061P-G097A-S101N-G128A-P210S-Y217Q;
 - S024G-N025G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 - N025G-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 - N025G-S038G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 - N025G-S053G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q;
 - N025G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 - N025G-S053G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 - N025G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 - N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 - N025G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q;
 - N061P-S101N-G128A-Y217Q;
 - S024G-N025G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 - S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 - S024G-N025G-S053G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q;
 - S024G-N025G-S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 - S024G-N025G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 - S024G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 - S024G-S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 - S024G-S053G-T055P-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 - S024G-S053G-T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 - S024G-S053G-T055P-N061P-S101N-G128A-Y217Q;
 - S053G-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 - S053G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q-S249N;
 - S053G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 - S053G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 - S053G-T055P-N061P-S101N-G128A-Y217Q;
 - S053G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 - T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 - T055P-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 - S024G-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 - S024G-N025G-N061P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 - S024G-N025G-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q;
 - S024G-N025G-S053G-T055P-S078N-S101N-G128A-Y217Q;
 - S024G-N025G-S053G-T055P-S101N-G128A-Y217Q;
 - S024G-N025G-T055P-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 - S024G-N061P-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 - S024G-S038G-S053G-S078N-S101N-G128A-Y217Q;
 - S024G-S053G-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
 - S024G-T055P-N061P-S078N-S101N-G128A-Y217Q;

- S024G-T055P-S078N-G097A-S101N-G128A-Y217Q;
S24G-N25G-N61P-G97A-S101N-G128A-Y217Q;
S24G-N25G-S53G-T55P-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
N61P-S78N-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
5 T55P-N61P-S78N-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-Y217Q;
S24G-N25G-T55P-G97A-S101N-G128A-Y217Q;
S24G-N25G-S53G-N61P-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
T55P-S78N-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
10 S53G-N61P-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-Y217Q;
S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
S78N-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-Y217Q;
S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-Y217Q;
15 S24G-N25G-S53G-T55P-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
S24G-N25G-S53G-T55P-S78N-G97A-S101N-G128A-Y217Q;
S24G-N25G-S53G-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
20 S24G-N25G-S78N-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-Y217Q;
T55P-S78N-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-Y217Q;
S24G-N25G-T55P-N61P-S78N-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
25 S24G-N25G-S53G-S78N-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-P129S-V203Y-Y217Q;
S53G-N61P-G97A-S101N-G128A-Y217Q;
S53G-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
S53G-T55P-S78N-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
30 S24G-N25G-S53G-S78N-G97A-S101N-G128A-Y217Q;
S24G-N25G-S53G-T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
S24G-N25G-T55P-S78N-A88V-G97A-S101N-G128A-Y217Q;
S24G-N25G-S53G-S78N-S87T-A88L-G97A-S101N-G128A-Y217Q-V203Y;
S24G-N25G-S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
35 T55P-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
S24G-N25G-S78N-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-Y217Q;
S53G-N61P-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
S53G-N61P-S78N-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
S53G-S78N-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
40 S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
S24G-N25G-S78N-S87T-A88L-S89G-G97A-S101N-G128A-V203Y-Y217Q;
S53G-T55P-N61P-L75S-N76Y-G97A-S101N-G128A-S130P-V203Y-Y217Q; y
G97A-S101N-G128A-Y217Q.
6. Ácido nucleico aislado comprendiendo una secuencia de polinucleótidos que codifica una variante de
45 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Ácido nucleico aislado según la reivindicación 6 presentando al menos un 80 % de identidad de secuencia
con la secuencia de polinucleótidos expuesta en la SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5, o una secuencia de
polinucleótidos complementaria de las mismas.
8. Vector de expresión comprendiendo al menos un ácido nucleico de la reivindicación 7, opcionalmente donde
50 el al menos un ácido nucleico se encuentra ligado de forma operativa a un promotor.
9. Célula huésped recombinante, comprendiendo: (a) un ácido nucleico de la reivindicación 6 o la reivindicación
7, o (b) un vector de expresión de la reivindicación 8;
10. Célula huésped recombinante según la reivindicación 9 donde dicha célula es una célula bacteriana, por
ejemplo, una célula de *Bacillus*, como una célula de *Bacillus subtilis*.
- 55 11. Método para producir una variante de proteasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,
comprendiendo el método cultivar una célula huésped recombinante de la reivindicación 10 en condiciones
propicias para producir la variante, y opcionalmente recuperar la variante del cultivo celular.
12. Composición comprendiendo una variante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, cuya composición no
es un producto de cuidado del hogar y de tejidos.

- 13.** Composición según la reivindicación 12 donde la composición es una composición detergente para limpiar una lente de contacto o una composición de limpieza útil en una aplicación de cuidado personal, y comprende de manera opcional al menos un mejorador y/o al menos un tensioactivo.
- 5 **14.** Composición según la reivindicación 12 o la reivindicación 13 donde la composición comprende una enzima adicional, seleccionada de manera opcional del grupo que consiste en una hemicelulasa, celulasa, amilasa, peroxidasa, proteasa, xilanasas, lipasa, fosfolipasa, esterasa, cutinasa, pectinasa, pectato liasa, mananasa, queratinasa, reductasa, oxidasa, fenoloxidasa, lipoxigenasa, ligninasa, pululanasa, tanasa, pentosanasa, malanasa, β -glucanasa, arabinosidasa, hialuronidasa, condroitinasa y lacasa.
- 10 **15.** Método para limpiar un artículo o una superficie que necesite limpiarse, comprendiendo el método poner en contacto el artículo o la superficie con una variante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una composición de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, y enjuagar de manera opcional el artículo o la superficie con agua.

FIGURA 1

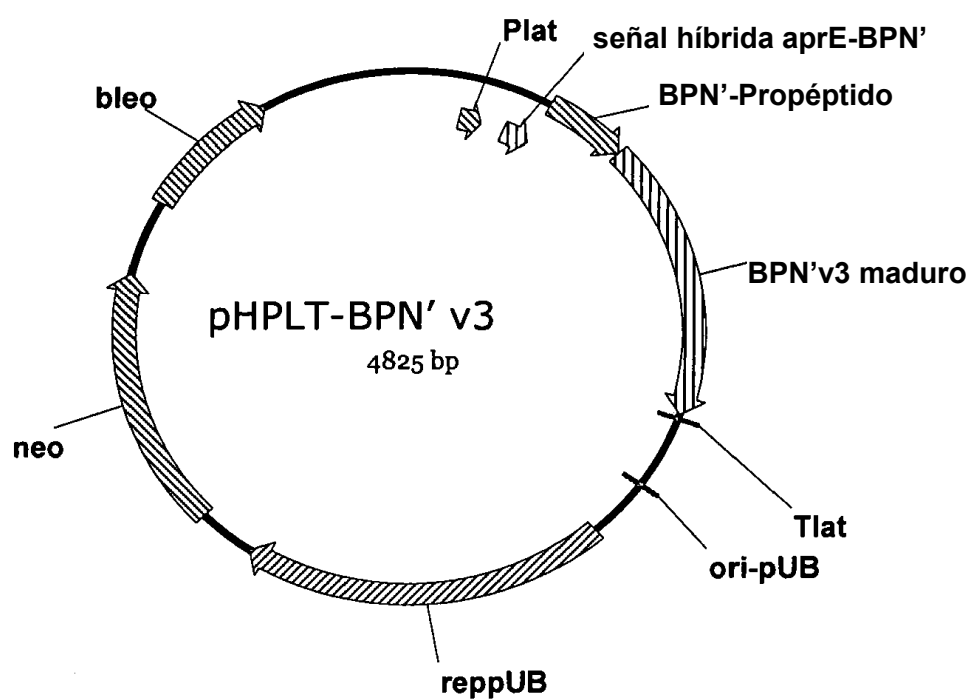


FIGURA 2

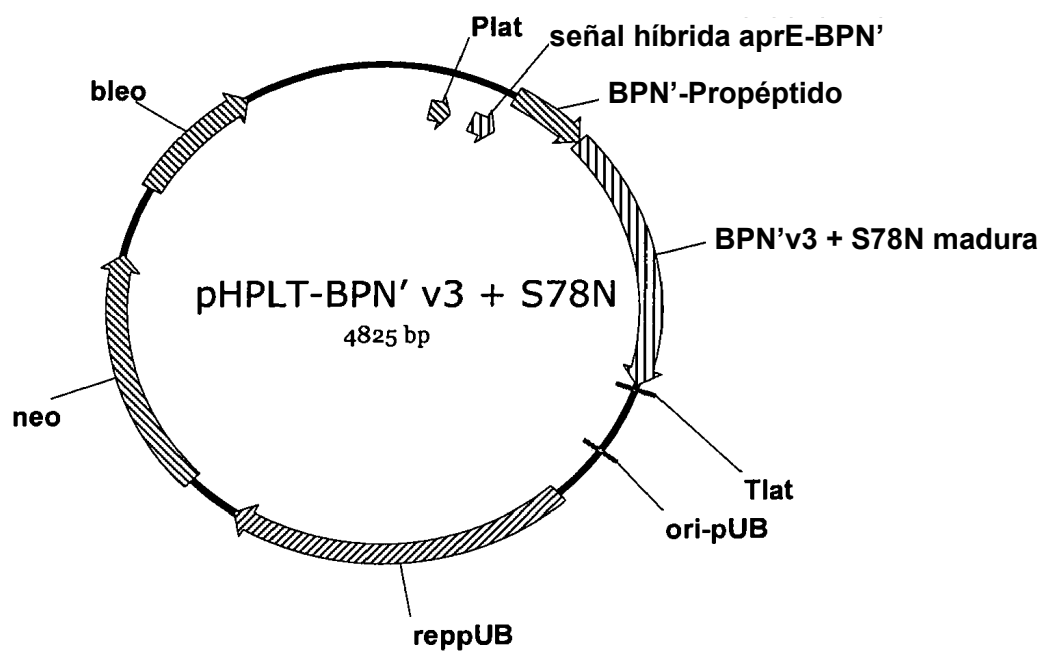


FIGURA 3

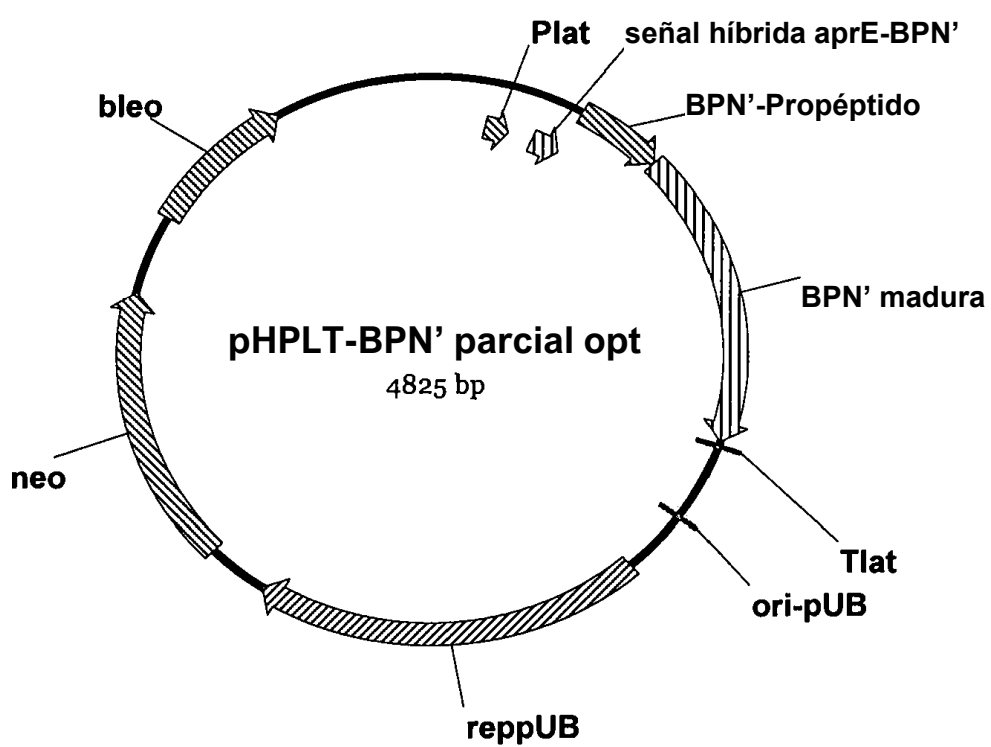


FIGURA 4

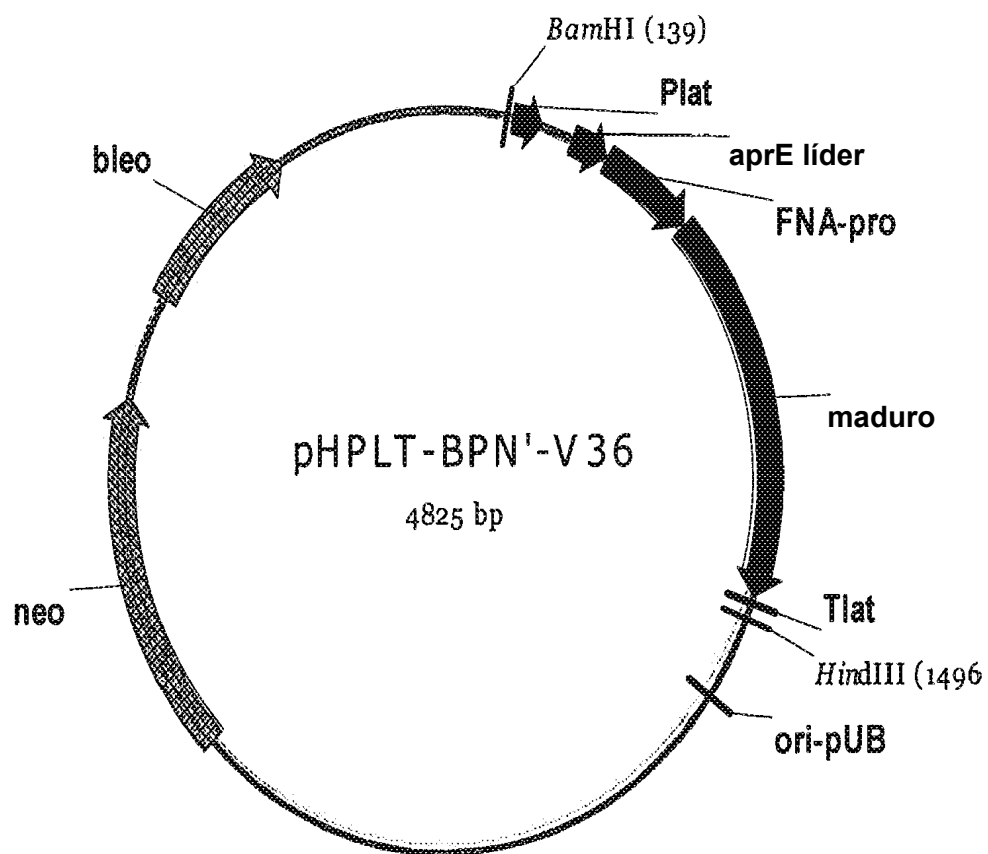


FIGURA 5

BPN'	1	AQSV	PYGV	SQ	IKAP	ALHS	QGYT	GSNV	KVAV	IDSG	IDSS	HPDL	KVAG	GGAS	MPSE	TNPF	QD
GG36	1	AQSV	PWGI	SRVQ	APAA	HNRG	LTGS	GVKV	VAVL	DTGI	S-TH	PDLN	IRGG	ASFP	VGEP	PST-Q	D
BPN'	61	NNSH	GTHV	AGTV	AALN	NSIG	VLGV	APSAS	LYAV	KVLG	ADSG	QYSW	IING	IEWA	IANNM	D	
GG36	59	GNGH	GTHV	AGTV	AALN	NSIG	VLGV	APSA	ELLYAV	KVLG	ASGS	SVSS	IAQG	LEWA	GNNGM	H	
BPN'																	161
GG36	121	VINM	SLGG	PSGS	AALKA	AVDK	KAVAS	GVVV	VVAA	AGNE	GTSG	SSST	VGY	PGKY	PSVI	AVGAV	
	119	VANL	SLGS	PS	ATLE	QAVN	SATSR	GVVV	VVAA	AGNS	SGAG	----	ISYP	AR	YANA	MAVGAT	
BPN'	181	DSSN	QRAS	FSQY	GPEL	DVMA	PGVS	IQST	LP	GNKY	GAYNGT	SMAS	PHVAGA	AALIL	SKHPN		
GG36	175	DQNN	NRAS	FSQY	GAGL	DIVA	PGVN	VQST	YP	GSTY	ASLNGT	SMAT	PHVAGA	AALVK	QKNPS		
BPN'	241	WTNT	QVRSSL	ENTTT	KLGD	SFY	GKGL	IN	VQAAA								
GG36	235	WSNV	QIRNHL	KNTAT	SLGST	NLY	GSG	LVNA	EAATR								

FIGURA 6

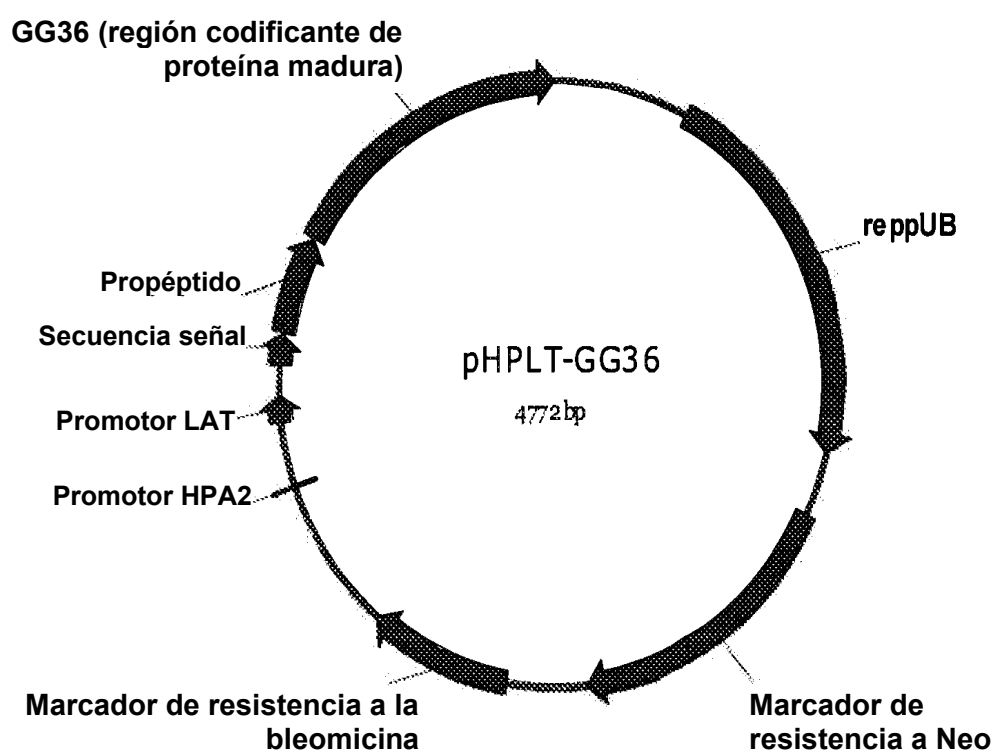


FIGURA 7

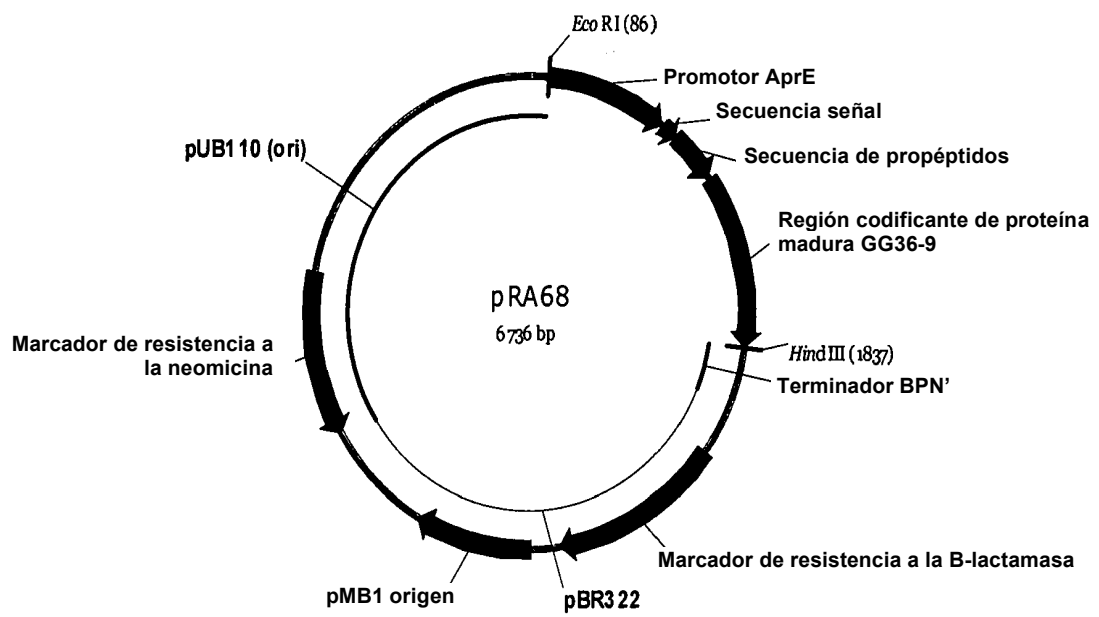


FIGURA 8

